



## UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

### TESIS DOCTORAL EN BIOQUIMICA

*“Caracterización farmacocinética, farmacodinámica y toxicológica del extracto glicoproteico rico en  $\beta$ -glucanos de *Grifola frondosa* (Maitake) administrado por vía oral e intravenosa en biomodelos animales.”*



### ***Farm Diego Máximo Aguilera Braico***

Directora: Dra. Gabriela A. Balogh - CONICET

Bahía Blanca, Argentina

2019



A la memoria de mi abuelo

*Don José Rubén Braico*



## *Agradecimientos*

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a quienes contribuyeron para la realización de mi Tesis doctoral.

A mi directora, la Dra. Gabriela A. Balogh, por permitirme acceder al ámbito científico de la investigación de la mano de las Ciencias biomédicas. Por su extraordinaria guía y sabiduría, sus grandes ideas, audacia y capacidad de innovar, su colaboración, dedicación, apoyo, paciencia, optimismo, ilusión y confianza demostrada en todo momento. Por ayudarme a crecer profesionalmente. ¡Gracias Gabi por tu guía y amistad!

A los licenciados Omar Jaure y Eliana Alonso, mis ex compañeros de mesada del Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales del Cerzos-CONICET, por compartir y enseñarme pacientemente sus técnicas en polimorfismo genético, en un clima de alegría y entusiasmo cuando recién me iniciaba en el camino de la investigación. A la Dra. María Marta Corte, por su colaboración con los estudios histológicos, y al Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-CONICET) de la UCA por haberme permitido desarrollar gran parte de mi proyecto en sus modernas instalaciones. Gracias a CONICET por apostar a este proyecto becándome para poder finalizar mis estudios doctorales.

A la Asociación Cape Code Inc. de USA por su generosa colaboración en la detección de los niveles plasmáticos y tisulares de  $\beta$ -glucanos para completar nuestros ensayos farmacocinéticos y de biodistribución oral e intravenosa de Maitake.

A mi abuela Rosa y a la memoria de mis abuelos José, Felipa y Máximo.

A mis padres Hugo y Noemí, quienes me marcaron el camino a seguir, y en parte les debo hoy quien soy.

A Cristian, mi gran compañero de vida, por su paciencia, apoyo, y consejos en esta etapa. Gracias por tu amor infinito y por acompañarme en este camino y en todos mis proyectos, alentando, elogiando y celebrando cada uno de mis logros. A Maximiliano, mi gran bendición, por permitirme imaginar un futuro lleno de esperanza y felicidad.

A mis canes, Bracco, Paris y Junior, que me alegran la vida y me colman de amor.

Por último, a Dios y a mi fiel amigo Jesús, por su guía y fortaleza en los momentos más duros y difíciles de mi vida. Por permanecer siempre a mi lado, y porque gracias a su infinita misericordia y bondad, hoy alcanzo una meta muy anhelada de mi vida profesional.

*A todos... ¡infinitas gracias!*



***“Clama a mí, y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tú no conoces”.***

Jeremías 33:3



## RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la población femenina mundial y una de las principales causas de muerte por cáncer. Algunos de los tratamientos convencionales para tratarlo (como la quimioterapia) generan efectos secundarios muy tóxicos, dado que suelen afectar a todas las células en división activa (sanas y tumorales). Por ello, son necesarios tratamientos específicos, con terapias dirigidas a las características moleculares del tumor y su microambiente.

Una aproximación a ello podría ser la búsqueda de compuestos naturales con capacidad inmunopotenciadora y toxicidad selectiva sobre células tumorales. Recientemente, se han descubierto actividades inmunomoduladoras y antitumorales en diversos hongos. Entre ellos, los  $\beta$ -glucanos de Fracción D de *Grifola frondosa* (Maitake) son capaces de generar respuestas inmunes innatas y adaptativas, ejerciendo efectos antitumorales.

Los beneficios terapéuticos reportados del tratamiento de la tumorigénesis mamaria con Fracción D de Maitake requieren profundizar aspectos farmacológicos y toxicológicos de sus moléculas bioactivas, para garantizar inocuidad y eficacia en la administración a un paciente. Por ello, los ensayos planteados en este trabajo tuvieron como finalidad elucidar aspectos toxicológicos, farmacodinámicos y farmacocinéticos de los  $\beta$ -glucanos de Fracción D. De este modo, esperamos realizar un aporte significativo al conocimiento farmacológico de estos compuestos bioactivos promoviendo una estrategia inmunoterapéutica y antitumoral novedosa, destinada a la prevención de la carcinogénesis mamaria por medio de la administración de compuestos naturales.

A través de nuestro trabajo aquí presentado, hemos demostrado en cultivos *in vitro* que Fracción D induce muerte apoptótica de células tumorales mamarias tanto murinas LM3 (hormono independientes) como humanas MCF-7 (hormono dependientes), mientras que no afecta la viabilidad de células mamarias normales MCF-10F. Hallamos que los  $\beta$ -glucanos del extracto actúan a través de receptores Dectina-1 para inducir apoptosis tumoral, y además son capaces de modificar el perfil de expresión de una amplia variedad genes con diversidad de funciones, entre ellos

genes específicos de apoptosis asociados a la supresión del fenotipo tumoral mamario, y genes asociados a procesos celulares cuya desregulación se vincula al desarrollo y progresión tumoral.

Nuestros estudios farmacocinéticos *in vivo* de administración oral e intravenosa en modelos murinos demostraron que Fracción D presenta más de un pico de concentración plasmática máxima. Posee alto volumen de distribución, y es captado principalmente a nivel gastrointestinal. Pese a su estructura voluminosa y alto peso molecular, es capaz de llegar a cerebro.

Demostramos que Fracción D previene el desarrollo de tumores mamarios en ratones hembra BALB/c, reduce la angiogénesis tumoral e incrementa la supervivencia total. Una dosis de 5 mg/kg/día administrada por 15 días es capaz de bloquear en más del 40% el proceso tumorigénico, mientras que, si el período de prevención se extiende a 50 días, la prevención tumoral ¡es del 100%! Su toxicidad aguda y subaguda es escasa, incluso a dosis 400 veces superior a la terapéutica, situándose la DL<sub>50</sub> por encima de los 2000 mg/kg.

En modelos murinos de inmunosupresión, hemos demostrado la capacidad de Fracción D de Maitake de restaurar poblaciones linfocitarias específicas en ganglios linfáticos, entre ellos granulocitos polimorfonucleares y LT/NK, además de inducir procesos de maduración celular.

Comparado con quimioterapia, Fracción D de Maitake aumenta la supervivencia total de los animales y reduce la malignidad de los tumores mamarios. Estos sorprendentes hallazgos nos permiten suponer que el componente bioactivo de Maitake podría llegar a emplearse como agente preventivo de tumorigénesis mamaria en una población de riesgo, induciendo supresión tumoral, bloqueando la invasividad y la metástasis, esto es, las principales causas de muerte por cáncer mamario.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasia in the world and one of the main causes of death among cancer women. Some of the conventional treatments for cancer are chemotherapy or radiotherapy, knowing that both generate very toxic side effects, since they usually affect all cells in active division (healthy or tumoral cells). Therefore, specific treatments are necessary, with therapies aimed at the molecular characteristics of the tumor and its microenvironment. An approach to this could be the search for natural compounds with immuno-potentiating capacity and selective toxicity on tumor cells. Recently, immunomodulatory and antitumor activities have been discovered in various fungi. Among them,  $\beta$ -glucans of Fraction D of *Grifola frondosa* (Maitake) are capable of generating innate and adaptive immune responses, exerting antitumor effects. The reported therapeutic benefits of treatment of breast tumorigenesis with D Fraction of Maitake require to deepen pharmacological and toxicological aspects of its bioactive molecules, in order to guarantee innocuousness and efficacy in the administration to a patient. Therefore, the trials proposed in this work aimed to elucidate toxicological, pharmacodynamic and pharmacokinetic aspects of  $\beta$ -glucans from D Fraction. In this way, we hope to make a significant contribution to the pharmacological knowledge of these bioactive compounds by promoting an immunotherapeutic and antitumor strategy novel agent, aimed at the prevention of mammary carcinogenesis through the administration of natural compounds. Through our work presented here, we have demonstrated in *in vitro* cultures that D Fraction induces apoptotic death of mammary tumor cells both murine LM3 (independent hormone) and human MCF-7 (hormone dependent), while not affecting the viability of normal MCF-10F mammary cells. We found that the  $\beta$ -glucans in the extract act through Dectin-1 receptors to induce tumor apoptosis, and are also capable of modifying the expression profile of a wide variety of genes with diverse functions, including apoptosis-specific genes associated with the suppression of the mammary tumor phenotype, and genes associated to cellular processes whose deregulation is linked to the development and tumor progression. Our *in vivo* pharmacokinetic studies on oral and intravenous administration in murine models showed that D Fraction presents more than one higher peak in the plasma concentration. It has a higher volume of tissue distribution and is captured mainly at the gastrointestinal level. Despite its voluminous structure and high molecular weight, it is able to reach the brain.



# ABREVIATURAS

**A** Amperio

**AAG** Ácido Acético glacial

**AAT** Antígenos Asociados a Tumor

**Ab** Anticuerpo

**Abs** Absorbancia

**Abs<sub>c</sub>** Absorbancia corregida

**Ab AF** Anticuerpo conjugado con Alexa Fluor

**Ab FITC** Anticuerpo conjugado con Isotiocianato de fluoresceína

**Ab PE** Anticuerpo conjugado con Ficoeritrina

**ABC** ATP Binding Cassette (Proteína transportadora de casetes dependiente de ATP)

**ABCG2** ATP Binding Cassette proteins Subfamilia G miembro 2

**AF** Alexa Fluor

**APC<sub>c</sub>** Antipéptido cíclico citrulinado

**APC** Célula Presentadora de Antígeno

**AV** Anexina V-FITC

**Bak-1** BCL2 Antagonist/Killer 1

**BCL2** Célula B-Linfoma 2

**BHE** Barrera hemato-encefálica

**BIOMED** Instituto de Investigaciones biomédicas

**Bp** Pares de bases

**BRCA1** Breast Cancer 1

**BRM** Modificadores de la Respuesta Biológica

**BSA** Albúmina de suero bovino

**°C** Grado centígrado o Celsius

**C3** Componente 3 del complemento

**CAA** Código Alimentario Argentino

**CaCl<sub>2</sub>** Cloruro cálcico

**CAV1** Caveolina 1

**CD** Células dendríticas

**CDK** Quinasa dependiente de ciclina

**cDNA** DNA complementario

**CE** Células esplénicas

**CF** Citometría de flujo

**CICUAL** Comité Institucional para el Cuidado y uso de animales de laboratorio

**CMTp** Cáncer de Mama Triple Negativo

**CO<sub>2</sub>** Dióxido de carbono

**CONICET** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**CR3** Receptor del complemento tipo 3

**CSM** Células Supresoras Mieloides

**CUL3** Culina 3

**CTLA-4** Antígeno 4 de linfocito T citotóxico

**Da** Dalton

**DAB** Diaminobencidina

**DL50** Dosis letal media o 50

**DMEM** Dulbecco's modified Eagle's medium

**DNA** Acido desoxirribonucleico

**dNTPs** Desoxirribonucleótidos tri-fosfatados

**DROSP** Drospirenona

**EDTA** Ácido Etilen Diamino Tetraacético

**EE** Etilnil Estradiol

**EGF** Factor de crecimiento epidérmico

**EGFR** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**ERK** Kinasas reguladas por señales extracelulares

**Primer F** Primer forward

**FACS** Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis

**FDA** Administración de Medicamentos y Alimentos

**FGFR-2** Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos

**FITC** Isotiocianato de fluoresceína

**Fr-D** Fracción D

**GEN 8q1.4** Cromosoma 8, Brazo Corto, Región 1, Sub-banda 4

**GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos/macrófagos

**GOPOD** Glucosa Oxidasa/Peroxidasa

**H** Hora

**H-E** Hematoxilina-Eosina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrógeno

**HCl** Ácido clorhídrico

**HER2/Neu/ErbB2** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

**IARC** Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

**IC50** Concentración inhibitoria media o 50

**ICAM-1** Molécula de adhesión intercelular-1

**IFN $\gamma$**  Interferón gamma

**IGFBP5** Proteína transportadora 5 del factor de crecimiento semejante a insulina

**IHQ** Inmunohistoquímica

**IL** Interleukina

**iNOS** Óxido Nítrico Sintetasa

**IV** Intravenosa

**IL** Interleuquina

**IP** Ioduro de propidio

**IRS** Score inmunoreactivo

**K** Potasio

**KDa** kiloDalton

**L** Litro

**LB** Linfocito B

$\lambda_{exc}$  Longitud de onda de excitación

$\lambda_{emisión}$  Longitud de onda de emisión

**LSP1** Lymphocyte-specific protein 1

**LT** Linfocito T

**LTh** Linfocito T colaborador

**LTreg** Linfocito T regulador

**MAP1K1** Proteína quinasa 1 activada por mitógenos 1

**MAT** Macrófagos asociados al tumor

**MEC** Matriz extracelular

**MEM** Minimun Essential Medium

**Min** minutos

**RT MMLV** Retrotranscriptasa Virus Leucemia Molones Murina

**MO** Microscopio óptico

**NaCl** Cloruro de sodio

**NADP** Nicotinamida Adenin dinucleótido fosfato

**NaOH** Hidróxido de sodio

**NF- $\kappa$ B** Factor nuclear kappa B

**NHI** Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos

**NK** Natural killer

**nm** Nanómetro

**p21WAF1** Inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina

**p27kip1** Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina

**OMS Organización** Mundial de la Salud

**PBS** Buffer fosfato salino

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PE** Ficoeritrina

**PFA** Paraformaldehído

**PI3K** Fosfatidilinositol-3-quinasa

**PM** Peso molecular

**Poli(A)** Poli (Adenina)

**Primer R** Primer reverse

**PTEN** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**R** Número de repiques

**RB** Reactivo de Bradford

**RE** Receptor de estrógeno

**RH** Receptor hormonal

**RNA** Ácido ribonucleico

**ROS** Especies Reactivas de Oxígeno

**RP** Receptor de progesterona

**Rpm** Revoluciones por minuto

**RT** Retrotranscriptasa

**SDS** Dodecilsulfato sódico

**Seg** Segundos

**SFB** Suero fetal bovino

**SI** Sistema inmunológico

**SPARC** Proteína secretada acídica y rica en cisteína

**SSC** Buffer salino de citrato de sodio

**T** Timina

**TBS** Buffer Tris salino

**T°C** Temperatura en grados centígrados

**TAE** Tris Acetato EDTA

**TEE** Tasa Estandarizada por Edad

**TEMED** N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

**TGF-β** Factor de crecimiento transformante beta

**TLR** Receptor toll-like

**TNFα** Factor de necrosis tumoral alfa

**TNRC9** Trinucleotide repeat containing 9

**TRIS** 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

**TRH** Terapia de Reemplazo Hormonal

**U** Unidades

**UCA** Universidad Católica Argentina (Ciudad Autónoma de Buenos Aires)

**UV-Vis** Ultravioleta-Visible

**V** Voltio

**Vf** Volumen final

**Vit C** Vitamina C

**VIH** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VEGF** Factor de crecimiento endotelial vascular

**VEGFR Receptor** del Factor de crecimiento endotelial vascular

**WB** Western blot



## UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis Doctoral en Bioquímica ha sido defendida y aprobada con fecha

...../...../....., mereciendo la calificación de .....(.....).



# INDICE

<b>I-INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
I.1 Generalidades del cáncer de mama .....	16
Etiología .....	17
Clasificación .....	19
I.2 Terapias antitumorales .....	23
Programas preventivos .....	24
I.3 Inmunoterapia .....	26
I.4 Antineoplásicos naturales .....	30
I.5 Rol antitumoral de los hongos medicinales.....	37
I.6 Empleo del extracto glicoproteico de <i>Grifola frondosa</i> rico en $\beta$ -glucanos .....	42
I.7 Efecto inmunomodulador de los $\beta$ -glucanos de Maitake .....	45
I.8 Rol antitumoral del extracto purificado de <i>Grifola frondosa</i> .....	47
<b>II-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
II.1 Planteamiento del problema .....	52
II.2 Hipótesis .....	54
II.3 Objetivos.....	54
II.3.1 Objetivos generales.....	54
II.3.2 Objetivos específicos .....	54
<b>III-MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>56</b>
III.1 EXTRACTO GLICOPROTEICO RICO EN $\beta$ -GLUCANOS (FRACTION D, USA) .....	57
III.2 ENSAYOS FISICOQUÍMICOS .....	58
III.A.2.1 Determinación de pH .....	58
III.A.2.2 Ensayo de solubilidad/polaridad .....	59
III.A.2.3 Cuantificación de $\beta$ -glucanos del extracto purificado .....	59
III.3 ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	63
III.3.1 Modelo experimental .....	63
III.3.2 Cultivo de células mamarias .....	63
III.3.3 Tratamiento de la línea tumoral MCF-7 .....	65
Condiciones de ensayo.....	66

III.3.4 Tratamiento de la línea mamaria normal MCF-10A .....	69
III.3.5 Tratamiento de la línea tumoral murina LM3 .....	70
III.3.6 Cuantificación de muerte celular por el método azul de tripán .....	74
III.3.7 Cuantificación de viabilidad celular por el método MTS .....	77
III.3.8 Estudio de viabilidad y muerte celular por microscopía Time Lapse .....	78
III.3.9 Cuantificación de apoptosis celular por el método enzimático TUNEL .....	79
III.3.10 Análisis estadístico de los resultados .....	80
III.4 ENSAYOS <i>IN VIVO</i> .....	81
III.4.1 Modelo experimental .....	81
III.4.2 Mantenimiento del modelo experimental .....	81
III.4.3 Administración oral del extracto purificado de <i>Grifola frondosa</i> .....	83
III.4.4 Administración oral de Tamoxifeno .....	84
III.4.5 Administración oral de Verapamilo .....	86
III.4.6 Administración oral de quimioterapia .....	86
III.4.7 Administración intravenosa del extracto purificado de <i>Grifola frondosa</i> .....	87
III.4.8 Administración intraperitoneal del extracto purificado de <i>Grifola frondosa</i> .....	87
III.4.9 Inspección clínica y conductual .....	88
III.4.10 Consumo alimentario .....	89
III.4.11 Peso corporal .....	89
III.4.12 Inducción tumoral mamaria.....	89
Descongelamiento de la línea celular .....	89
Recambio del medio de cultivo .....	90
Expansión celular .....	90
Preparación de las células para inoculación .....	91
Congelamiento celular para stock .....	91
III.4.13 Inmunosupresión por corticosteroides .....	92
III.4.14 Toxicidad en el modelo experimental .....	93
Toxicidad aguda .....	93
Toxicidad subaguda .....	94
III.4.15 Estudio de crecimiento tumoral y necrosis circundante.....	94
III.4.16 Determinación de metástasis hepática y/o pulmonar .....	94
III.4.17 Estudio de angiogénesis tumoral .....	94
III.4.18 Análisis de supervivencia.....	95
III.4.19 Sacrificio y remoción de órganos y tejidos.....	95
III.4.20 Preparación de los tejidos para microscopía.....	98
Deshidratación .....	99
Aclaramiento .....	99
Infiltración .....	99

Inclusión .....	100
III.4.21 Recolección de sangre periférica post mortem.....	102
Fórmula leucocitaria .....	102
Recuento leucocitario .....	104
III.4.22 Remoción y procesamiento de órganos linfoides .....	105
III.4.23 Estudios de citometría de flujo en poblaciones linfocitarias .....	107
III.5 ANALISIS DE LA EXPRESION GENICA .....	112
III.5.1 Aislamiento de RNA total de tejido mamario .....	112
Cuantificación espectrofotométrica .....	114
Calidad del RNA aislado .....	115
III.5.2 Síntesis de cDNA por retrotranscripción .....	118
III.5.3 Amplificación de genes target .....	120
III.6 ENSAYO DE MICROARREGLOS DE cDNA .....	125
Aislamiento de RNA.....	126
Amplificación.....	127
Etiquetado e hibridación de los microarreglos .....	128
Síntesis de las sondas fluorescentes .....	128
Cuantificación de las sondas .....	129
Hibridación y condiciones de lavado .....	130
Disoluciones de lavado .....	133
Análisis y revelado .....	134
III.7 ENSAYO FARMACOCINETICO Y BIODISTRIBUCIÓN TISULAR DE $\beta$ -GLUCANOS.....	135
Estudio en administración oral .....	135
Estudio en administración intravenosa .....	137
Ensayo de biodistribución en administración oral .....	138
Ensayo de biodistribución en administración intravenosa .....	138
<b>IV-RESULTADOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>140</b>
IV.1 RESULTADOS DE ESTUDIOS FISICOQUIMICOS .....	141
IV.1.1 pH.....	141
IV.1.2 Polaridad/solubilidad.....	142
Solubilidad de Maitake PRO4X .....	143
IV.1.3 Cuantificación de 1,3- $\beta$ -glucanos .....	144

IV.2 RESULTADOS DE ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	146
IV.2.1 Ensayo dosis-respuesta .....	146
IV.2.2 Microscopía Time Lapse .....	148
IV.2.3 Ensayo Tunel .....	150
IV.2.4 Microarreglos de cDNA.....	153
IV.2.5 RT-PCR gen BAK-1 .....	159
IV.2.6 Efecto de Maitake en células humanas sanas .....	161
IV.2.7 Efecto de Maitake en células tumorales humanas con bloqueo Dectina-1 .....	163
IV.2.8 Efecto de Maitake en células tumorales humanas con bloqueo cálcico .....	165
IV.2.9 Efecto de Maitake en células tumorales no humanas .....	166
Muerte tumoral humana vs murina .....	167
IV.2.10 Efecto del tratamiento quimioterápico en células tumorales murinas .....	168
Muerte tumoral murina inducida por quimioterapia vs muerte por Maitake.....	169
IV.3 RESULTADOS DE ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	171
IV.3.1 Toxicidad aguda .....	171
Mortalidad.....	171
Peso corporal .....	171
Consumo alimentario .....	172
Signos de toxicidad .....	174
Resultados hematológicos .....	181
Estudio de órganos internos .....	182
Expresión de genes específicos .....	188
IV.3.2 Toxicidad subaguda.....	190
Mortalidad.....	190
Peso corporal .....	190
Consumo alimentario .....	192
Signos de toxicidad .....	193
Resultados hematológicos .....	198
Estudio de órganos internos .....	199
Expresión de genes específicos .....	206
IV.3.3 Ensayo en humanos .....	208
IV.3.4 Efectos antitumorales de Maitake y Quimioterapia .....	214
Sobrevida de los animales .....	214
Crecimiento tumoral .....	215
Análisis tumoral macroscópico .....	216
IV.3.5 Prevención tumoral de Maitake .....	218
Desarrollo tumorigénico .....	218
Tamaño del tumor mamario .....	220

Histología tumoral .....	223
Metástasis hepática y pulmonar .....	224
Análisis macroscópico e histológico de hígado .....	226
Análisis macroscópico e histológico de pulmón.....	227
Necrosis de tejido tumoral .....	228
Angiogénesis del tumor mamario .....	229
Sobrevida de los animales .....	230
Expresión de genes específicos .....	231
<b>IV.3.6 Prevención tumoral Maitake + Tamoxifeno .....</b>	<b>235</b>
Sobrevida murina .....	235
Peso corporal .....	236
Parámetros hematológicos y bioquímicos .....	239
Desarrollo tumoral .....	240
Examen macroscópico del tumor mamario.....	245
Estudio de los órganos internos.....	248
<b>IV.3.7 Inmunorestauración inducida por Maitake .....</b>	<b>254</b>
Mortalidad y toxicidad.....	255
Peso corporal .....	255
Examen macroscópico hepático y esplénico .....	256
Análisis microscópico sanguíneo .....	259
Estudios de citometría de flujo de inmunorestauración .....	264
<b>IV.3.8 Farmacocinética de <math>\beta</math>-glucanos .....</b>	<b>285</b>
IV.3.8.1 Farmacocinética en administración oral .....	285
IV.3.8.2 Farmacocinética en administración intravenosa .....	290
<b>IV.3.9 Biodistribución de <math>\beta</math>-glucanos.....</b>	<b>299</b>
IV.3.9.1 Biodistribución en administración oral .....	300
IV.3.9.2 Biodistribución en administración intravenosa .....	302
<b>V-DISCUSSION .....</b>	<b>307</b>
<b>VI-CONCLUSIONES .....</b>	<b>334</b>
<b>VII-REFERENCIAS .....</b>	<b>338</b>
<b>VIII-PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES .....</b>	<b>364</b>

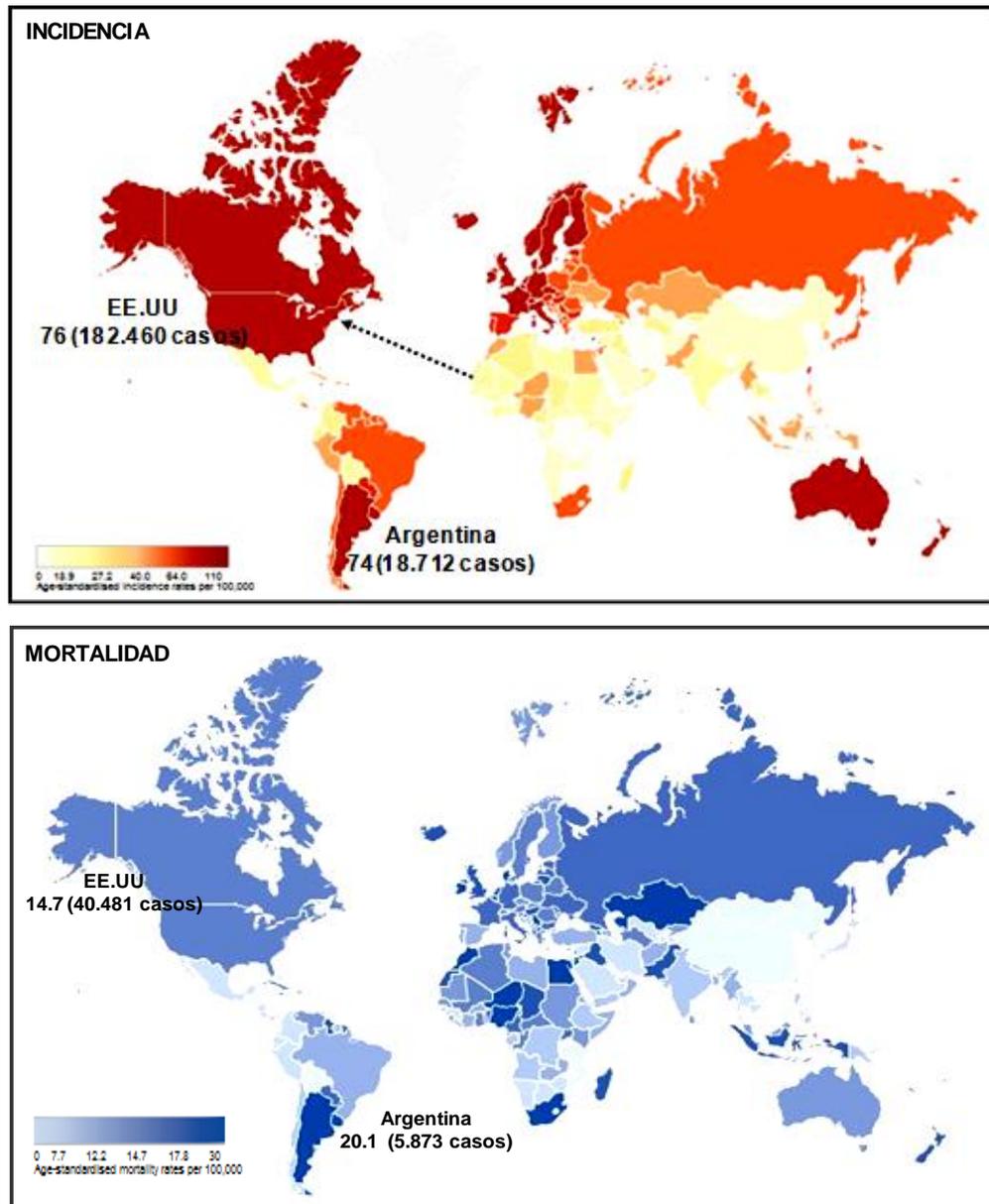


# **I- INTRODUCCION**



## I.1 Generalidades del cáncer de mama

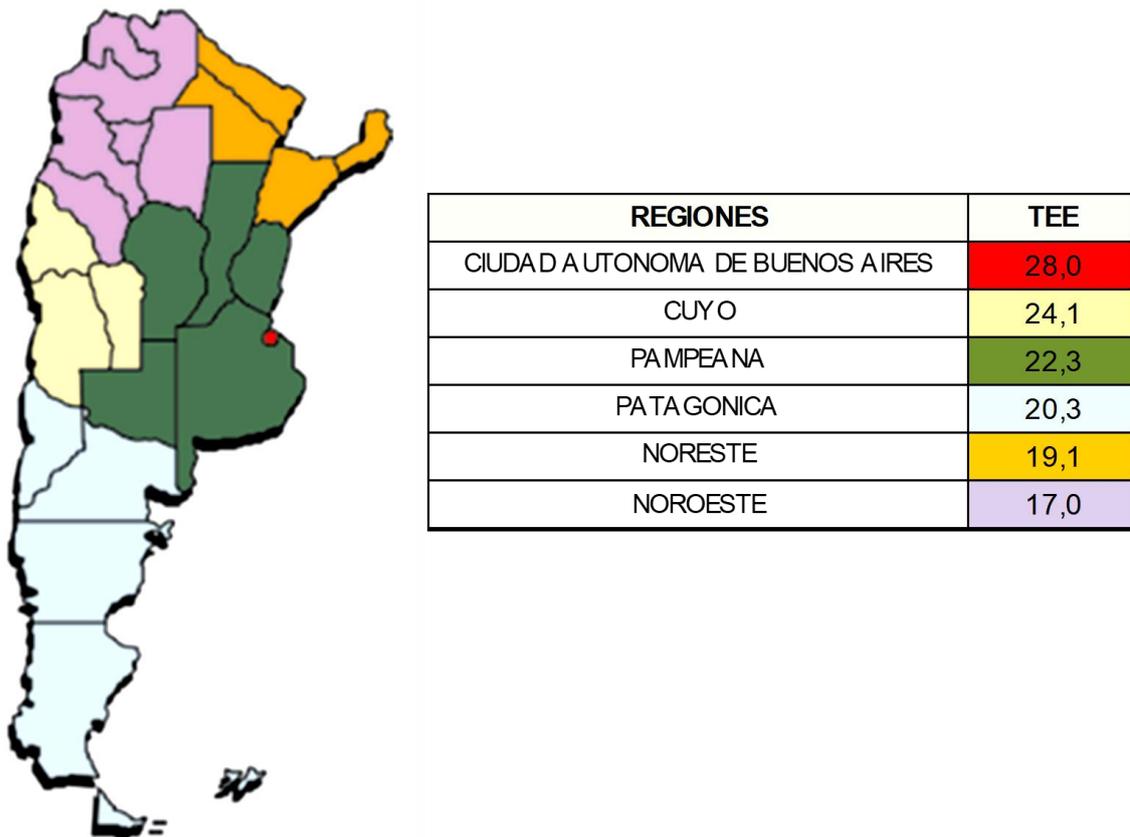
El cáncer de mama constituye un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la principal causa de muerte por neoplasia maligna en mujeres de países desarrollados y subdesarrollados. Anualmente, se producen 1.200.000 nuevos casos que implican más de 500.000 muertes, aunque la tasa de mortalidad varía ampliamente a nivel geográfico [1-4] (Fig.1.1).



**Figura 1.1.** Incidencia y mortalidad de cáncer de mama. Se indican los índices a nivel mundial de ambas tasas, las cuales se hallan estandarizadas por edad, por 100.000 mujeres (año 2008) [1]. El cáncer de mama representa un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres de países desarrollados y subdesarrollados.

Argentina es el país con mayor incidencia de cáncer mamario de América Latina -aproximadamente 17.000 nuevos casos diagnosticados anualmente [1]-. Ocupa el segundo lugar de mortalidad por esta causa: 21,8 defunciones cada 100.000 mujeres, alrededor de 5400 muertes anuales.

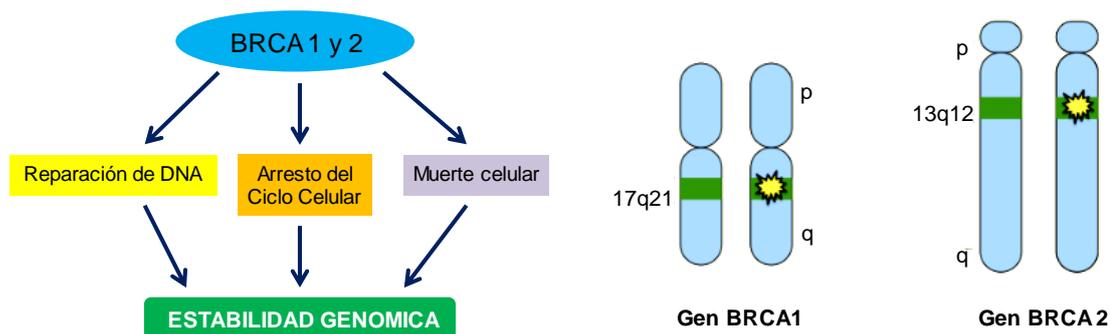
El primer lugar lo ocupa Uruguay (24,1/100.000) [5,6]. La ciudad de Buenos Aires (28,0/100.000) y la región cuyana (24,1/100.000) presentan las mayores tasas de mortalidad del país, mientras que las menores pertenecen a las provincias del Noroeste (17,0 /1000.000) (Fig.2.1) [5].



**Figura 2.1.** Mortalidad nacional por cáncer de mama. La misma se encuentra estandarizada por edad, por 100.000 mujeres (período 2003-2007) [5]. Argentina es el país con mayor incidencia de cáncer mamario de América Latina, y ocupa el segundo lugar de mortalidad con 5400 muertes anuales.

**Etiología.** La etiología del cáncer de mama no está completamente dilucidada, siendo multifactorial, con factores genéticos y ambientales [7,8]. La aparición esporádica de la enfermedad, es decir no atribuible esencialmente a una mutación heredada, representa más del 90% de los casos de esta neoplasia a nivel mundial [9]. Diversas investigaciones han demostrado la existencia de factores de riesgo asociados a una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad, como:

- **Nuliparidad o primoaparición tardía.** La ausencia de hijos o nacimiento de hijo primogénito después de los 30 años constituye un factor de riesgo. Por el contrario, el embarazo y amamantamiento en mujeres jóvenes o menores de 30 años genera protección de la enfermedad [10]. Probablemente, porque el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria durante la gestación reduciría la población de células troncales susceptibles de tornarse neoplásicas. Además, la exposición estrogénica durante la preñez podría generar efectos antitumorales. No obstante, la prolongación del ciclo estrogénico, como menarca temprana (antes de los 11 años) y menopausia tardía (después de los 54 años), se consideran factores de riesgo dada la mayor exposición hormonal [11,12].
- **Carga genética.** Aún no se conocen los genes asociados al cáncer de mama esporádico, pero diversos estudios de polimorfismos poblacionales han demostrado que FGFR2 (Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos), TNRC9 (Trinucleotide repeat containing 9), MAP1K1 (Proteína activada por mitógenos 1), gen 8q1.4 (cromosoma 8, brazo corto, región 1, subbanda 4) y LSP1 (Lymphocyte-specific protein 1) pueden presentar polimorfismos asociados al mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [11].
- **Cáncer mamario hereditario.** Menos del 5% de los casos de neoplasia mamaria se asocian a mutaciones del gen BRCA1 o BRCA2 (Fig. 3.1), siendo estas más frecuentes en la población judía Ashkenazi. Eventualmente pueden vincularse a mutaciones de p53 o PTEN. Tanto BRCA1 como BRCA2 son genes supresores de tumores que codifican proteínas para el proceso de reparación del DNA, de modo que una mutación o delección del gen causaría la pérdida de su función, incrementando el riesgo de desarrollar tumorigénesis. Este tipo de tumores no expresan RE, RP y se acompañan de una alta incidencia de tumores ováricos [11-14].



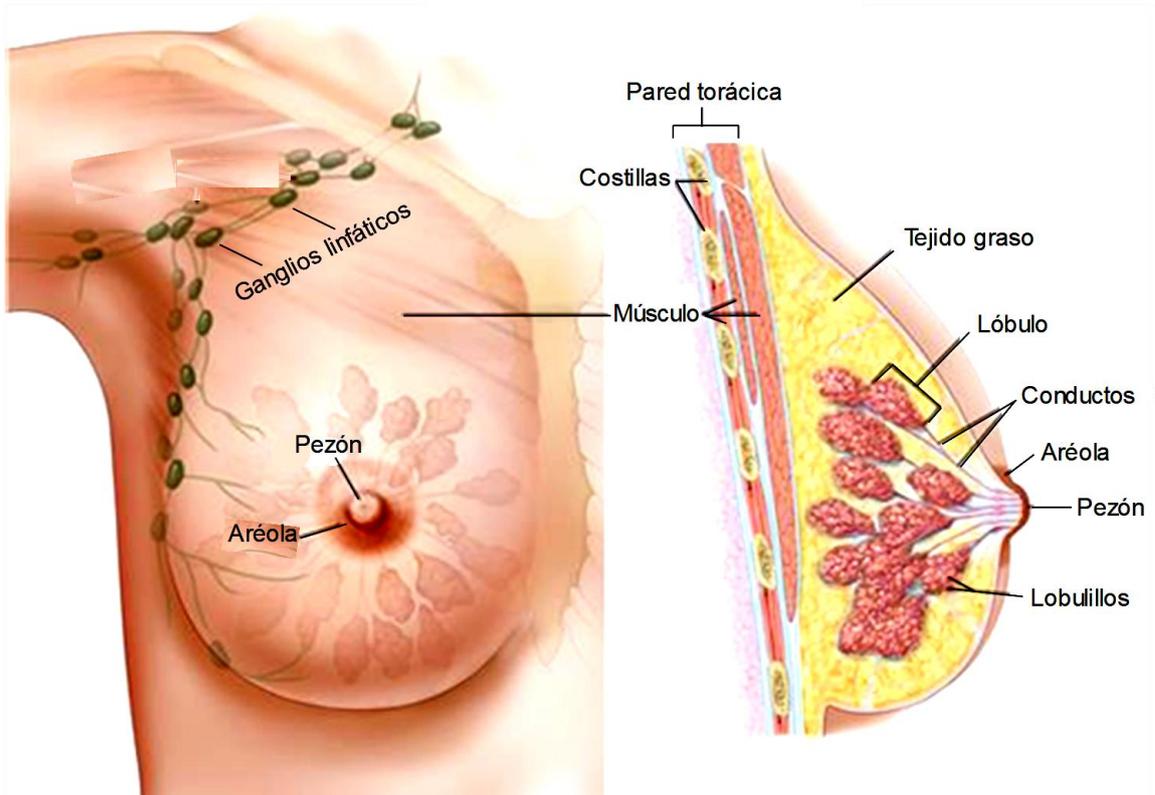
**Figura 3.1.** Mutaciones génicas BRCA 1 y BRCA2. Ambos son genes supresores tumorales asociados a la reparación de DNA, de modo que su mutación incrementaría el riesgo de desarrollar la enfermedad. Pero menos del 5% de los casos de cáncer mamario se asocian con mutaciones de estos genes.

- **Antecedentes familiares y personales.** Por cada familiar de primer grado (madre, hermana o hija) con antecedentes de la enfermedad, existe casi el doble de riesgo de desarrollar cáncer mamario respecto de las mujeres que no presentan tal condición [13]. También se ve aumentado el riesgo de contraer la enfermedad en mujeres con antecedentes de patología benigna (hiperplasia ductal o lobulillar), incrementándose notablemente en el caso de hiperplasias atípicas [13,15].
  
- **Terapia hormonal.** Diversos estudios han vinculado la terapia con estrógenos y progestágenos a un mayor riesgo de padecer cáncer mamario [11]. La terapia hormonal por más de 5 años incrementa la probabilidad de padecer la enfermedad [12], riesgo que se mantiene hasta 5 años después de suspender el tratamiento, al cabo de los cuales el riesgo se asemeja al de las mujeres que nunca recibieron terapia hormonal [16]. La metabolización de estrógenos por vía de la enzima 2-4 hidroxilasa o de la 16 $\alpha$  hidroxilasa da lugar a metabolitos catecol estrógenos que generan quinonas muy reactivas capaces de formar aductos, los cuales actúan como carcinógenos químicos induciendo mutaciones o inestabilidad genómica [11].
  
- **Estilo de vida.** Existen de factores de riesgo controlables como sobrepeso, consumo de alcohol y estrés.
  
- ❖ **Obesidad.** La obesidad en la posmenopausia es un factor de riesgo importante, con una probabilidad hasta 2 veces mayor de desarrollar la enfermedad comparado con mujeres premenopáusicas, en las cuales se presenta una relación inversa entre obesidad y neoplasia mamaria. En la postmenopausia, el tejido graso de la mujer obesa se convierte en la única fuente de estrógenos mediante la aromatización de la androstenediona, dando lugar a elevadas concentraciones de estrógeno libre [16].
  
- ❖ **Consumo de alcohol.** Su ingesta puede generar acetaldehído, carcinógeno primario en animales [16].
  
- ❖ **Tabaquismo.** Se ha sugerido que compuestos químicos del tabaco como benzopireno, aminas aromáticas y nitrosaminas podrían estar implicados en la carcinogénesis mamaria [16].

**Clasificación.** Al hablar de *carcinoma*, el término alude a la naturaleza epitelial de las células cancerosas. En el caso del cáncer mamario, se trata en realidad de un adenocarcinoma, ya que las células cancerosas mamarias son glandulares. No obstante, como estas células glandulares derivan de células epiteliales, se acepta el término carcinoma para designar a los tumores mamarios.

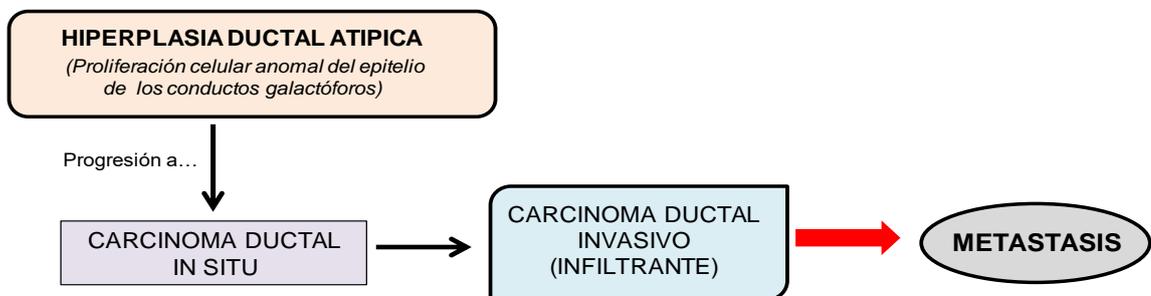
El carcinoma mamario se inicia básicamente como una proliferación anormal y desordenada de células epiteliales fundamentalmente de los ductos o lobulillos mamarios, reconociéndose dos tipos principales: **carcinoma ductal**, muy frecuente [17], originado en los conductos galactóforos que transportan leche de la glándula mamaria

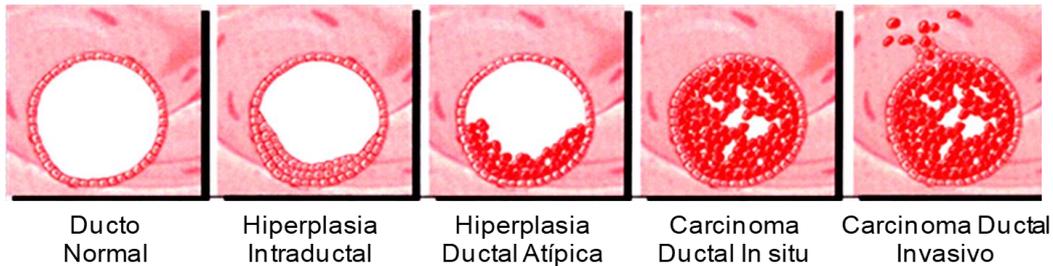
al pezón; y **carcinoma lobulillar**, originado en los lobulillos que producen leche materna (Fig. 4.1).



**Figura 4.1.** *Glándula mamaria femenina.* Se ilustra la anatomía glandular mediante un corte sagital (derecha). El carcinoma mamario se inicia básicamente como una proliferación anormal y desordenada de células epiteliales, fundamentalmente de los ductos o lobulillos mamarios. La imagen fue adaptada de [www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq](http://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq).

La progresión de carcinoma ductal a carcinoma metastásico se esquematiza a continuación [17-20] (Fig. 5.1).

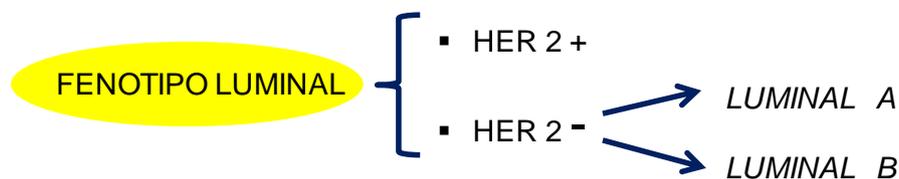




**Figura 5.1.** Progresión de carcinoma ductal a carcinoma metastásico. El carcinoma ductal se origina en los conductos galactóforos que transportan leche de la glándula mamaria al pezón. La imagen fue adaptada de Stuart K, et al 2005 [17].

El cáncer de mama no se considera una única enfermedad, sino varias neoplasias compuestas de diversos subtipos tumorales con distintos orígenes celulares, cambios somáticos y etiologías [21]. La patología es histológicamente diversa y clínicamente variable, al igual que su pronóstico. Sin embargo, en casi todos los tipos tumorales, existe un inmunofenotipo dominante que permite la clasificación molecular en función de la presencia o ausencia de distintos tipos de receptores hormonales:  $RE\alpha$ , RP y HER-2/Neu/Erb-B2 [22-27], tal como se indica a continuación (Tabla 1).

➤ **Fenotipo luminal.** Es Positivo para  $RE\alpha$  y RP, expresa citoqueratinas luminales. Se subdivide en HER-2 positivo y HER-2 negativo. Este último se subdivide, a su vez, en **luminal A** (de bajo índice proliferativo) y **luminal B** (altamente proliferativo).



➤ **Fenotipo HER-2 sobre expresado.** Es negativo para  $RE\alpha$  y RP, pero positivo para HER-2.

➤ **Fenotipo Basal (triple negativo).** Es negativo para  $RE\alpha$ , RP y HER-2. Algunos tumores del fenotipo Basal sobre expresan EGFR (Receptor del Factor de crecimiento epidérmico), pudiendo resultar beneficiosa la terapia con inhibidores tirosin quinasa de EGFR en pacientes con este inmunofenotipo. El fenotipo basal suele ser el de peor pronóstico [26] por la carencia de blancos terapéuticos, mientras que el luminal A presentaría un mejor pronóstico [4,24].

➤ **Fenotipo Normal-like.** Es negativo para RE y RP. Presenta alta expresión de genes asociados al tejido adiposo y a otros tipos de estroma celular, por lo que su perfil de expresión génica resulta similar al del tejido mamario no canceroso.

**Tabla 1.1.** Clasificación molecular del cáncer mamario. Para esta clasificación se toma en consideración la presencia o ausencia de RE, RP y HER-2 [22-27]. Tengamos en cuenta que el cáncer de mama no se considera una única enfermedad, sino varias neoplasias compuestas de diversos subtipos tumorales con distintos orígenes celulares, cambios somáticos y etiologías.

CLASIFICACION MOLECULAR DEL CANCER MAMARIO					
SUBTIPO		RE	RP	HER-2	AGRESIVIDAD
LUMINAL	A	+	+ / -	-	BAJA
	B	+	+ / -	+	
BASAL		-	-	-	ALTA
HER-2 SOBREENPRESADO		-	-	+	MUY ALTA
NORMAL LIKE		-	-		

Varios estudios han demostrado que pacientes con cáncer mamario que presentan el subtipo negativo para receptores hormonales (como triple negativo) responden mejor a la quimioterapia que los del subtipo positivo para los mismos receptores. Dado que el CMTN (Cáncer de mama triple negativo) suele ser el carcinoma más agresivo, resulta lógico suponer que debería recibir un tratamiento más agresivo. Sin embargo, hasta el momento no existe una recomendación consensuada al respecto, de modo que la búsqueda de nuevos fármacos y combinaciones con diferentes quimioterápicos resultaría fundamental para el tratamiento del CMTN [28,29].

Si bien la supervivencia de algunas pacientes con los tipos de cáncer mamario más agresivos puede verse mejorada mediante el desarrollo de nuevas terapias [27], es frecuente que algunos tipos tumorales desarrollen mecanismos de resistencia a drogas postratamiento, promoviendo el desarrollo de metástasis y deterioro de la calidad de vida del paciente. Aun no se conoce con exactitud el mecanismo de resistencia a drogas generado por los tumores, pero se cree que guardaría relación con la sobreexpresión de proteínas transportadoras tipo "ABC" ("ATP-Binding Cassette proteins") de la membrana de las células cancerosas, que expulsarían las drogas desde el interior celular a modo de bombas dependientes de ATP [30,31].

## **I.2 Terapias antitumorales**

Un factor que determina los resultados del tratamiento anticarcinogénesis mamaria en cualquier población es la detección de la neoplasia en las primeras etapas de la enfermedad, cuando los tumores son pequeños y potencialmente curables, lo cual redundaría en menor mortalidad [32], siempre y cuando la detección precoz se acompañe de procedimientos diagnósticos y terapéuticos eficientes y oportunos [33].

La supervivencia para cáncer mamario está directamente asociada a la extensión de la enfermedad: a mayor estadio neoplásico, menor eficacia terapéutica, y más mutilante el tratamiento para el paciente [34]. Los abordajes terapéuticos incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia endócrina y terapia dirigida [27]. La cirugía y la radioterapia tienen una acción local, mientras que el resto de las terapias poseen efectos a nivel sistémico [34].

No obstante, la elección del tratamiento adecuado depende fundamentalmente de la clasificación del tumor tomando en consideración su estadio y tamaño, tipo y grado histológico, estado ganglionar, niveles de receptores hormonales RE, RP y HER-2, estado de salud general, edad del paciente, estado endocrino-hormonal, así como su voluntad y libre decisión [27-29,34,35]. El tratamiento de la enfermedad es multidisciplinario, requiriendo la participación de diversas especialidades médicas. Las intervenciones quirúrgicas iniciales pueden llegar a requerir de esquemas radioterapéuticos sistémicos y regionales pre o post cirugía [34].

En el caso de tumores mamarios locales que no han hecho metástasis, suele realizarse cirugía (mastectomía o tumorectomía), acompañada de quimio, hormono o radioterapia adyuvante, a fin de reducir el riesgo de recidivas [36]. Esta última emplea radiaciones de alta energía que se emiten directamente sobre el tumor a fin de matar las células cancerosas [37]. En la hormonoterapia se busca inhibir la acción hormonal o reducir sus niveles con la finalidad de impedir el crecimiento celular. La quimioterapia sistémica combinada con cirugía suele ser el tratamiento más utilizado, ya que interrumpe el crecimiento de células cancerosas causando su muerte. Las drogas quimioterapéuticas más empleadas en el cáncer de mama son: Ciclofosfamida, Metotrexato y Doxorubicina.

En el caso de enfermedad metastásica, la terapéutica persigue más bien fines paliativos, teniendo por objeto mejorar la calidad de vida del paciente y prolongarla. En general, la tasa media de supervivencia es baja, aunque algunos pacientes pueden sobrevivir por más tiempo [36]. El tratamiento suele dividirse en quimioterapia estándar y terapia dirigida. La radioterapia y/o la cirugía sólo se utilizan en casos muy puntuales, cuando existe metástasis dolorosa, dolor localizado o hemorragia mamaria. Mientras que las terapias dirigidas implican hormonoterapia, terapia inmunológica y terapia anti-angiogénica [38].

La hormonoterapia (ej. tamoxifeno, raloxifeno) bloquea a los receptores de estrógenos (RE) reduciendo los niveles estrogénicos en el organismo. También inhibe a la enzima

aromatasa, encargada de convertir los andrógenos adrenales en estrógenos endógenos (letrozole, anastrozole y exemestane) [39,40].

En pacientes con tumores que sobre expresan HER-2, suele emplearse quimioterapia combinada con el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, el cual puede unirse de forma selectiva al receptor HER-2 bloqueando la proliferación de células cancerosas [39]. Por otra parte, Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que deriva del VEGF (“*vascular endothelial growth factor*”) murino, es capaz de inhibir la proliferación del endotelio y privar del suministro de sangre y vasos a las células tumorales [41,42].

Las mujeres con mayor riesgo de contraer cáncer de mama, ya sea por antecedentes familiares significativos, por mutación en los genes BRCA1 o BRCA2, o por padecer carcinoma ductal o lobulillar *in situ*, podrían reducir las probabilidades de contraer la enfermedad a través de:

- ❖ **Quimio prevención.** El tratamiento con el agente anti estrogénico Tamoxifeno bloquea los efectos del estrógeno en el tejido mamario [43].
- ❖ **Mastectomía profiláctica.** La extirpación de una o ambas glándulas mamarias disminuiría el riesgo de contraer la neoplasia hasta un 97%.
- ❖ **Ovariectomía profiláctica.** La remoción de los ovarios antes de la menopausia, reduce el riesgo de contraer la enfermedad en más del 50%; probablemente por extirpar las principales fuentes de estrógeno del organismo.

**Programas preventivos.** Los Estados Unidos cuentan con el Programa Nacional para la Detección Temprana del Cáncer de seno y de Cuello Uterino (*National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program*), el cual provee pruebas de detección temprana y servicios de diagnóstico gratuitos o a costo muy reducido para mujeres de bajos ingresos, sin seguro médico o médicamente sub-atendidas. El programa proporciona mamografías y pruebas diagnósticas para mujeres cuyos resultados de detección sugieren anomalías, consultas quirúrgicas y referencias a tratamientos [44].

Argentina, pese a ser uno de los países más afectados por el cáncer de mama, tanto en incidencia como en mortalidad, no tiene operativos los programas de prevención y control de la enfermedad [5]. Para la IARC (Agencia Internacional para Investigación del Cáncer) que integra la OMS, el impacto del cáncer en los países subdesarrollados, se ve agravado por el difícil acceso a la detección temprana y al tratamiento de la enfermedad. La sobrevivencia se ve comprometida cuando no existe articulación entre un programa de detección precoz, la confirmación del diagnóstico y un tratamiento oportuno y eficaz [32].

Desde el año 1999, Argentina ha procurado la implementación de programas de detección precoz del Cáncer de Mama. En 2003, por Resolución del Ministerio de Salud

de la Nación N°59/03 se creó el Subprograma Nacional de Detección Temprana de Cáncer de Mama que buscaba reducir la tasa de mortalidad por la enfermedad. Para ello, proponía mamografías bianuales gratuitas a mujeres entre 50 y 70 años, a modo de tamizaje masivo, con acceso a tratamiento en la totalidad de los tumores detectados. Sin embargo, este Subprograma nunca fue implementado, pese a su actual vigencia.

A nivel provincial, 13 jurisdicciones argentinas cuentan con programas regionales de prevención de cáncer mamario, siendo distinta la situación de los programas de una provincia a otra. Las provincias de Mendoza, Córdoba y Tucumán cuentan con un mayor nivel de institucionalización y funcionamiento de sus programas de prevención, mientras que las demás provincias no cuentan con una estructura administrativa capaz de llevarlos adelante. La razón principal es que el personal a cargo suele estar contratado a tiempo parcial y realizar múltiples actividades, por lo cual no rige una institucionalización que otorgue continuidad administrativa y ejecutiva a tales programas preventivos [5].

En 2010 se creó el Instituto Nacional del Cáncer, y entró en vigencia el único anexo de la ley 26.606 que fija al mes de octubre como: "Mes Nacional de Concientización del Cáncer de Mama". Sin embargo, la promoción para que participen masivamente mujeres en tamizaje o screening, son esporádicas, no sistemáticas y oportunistas. Las actividades de concientización se realizan casi exclusivamente en el mes octubre con las campañas masivas de lucha contra el Cáncer de Mama [5], cuyas actividades principales suelen ser charlas informativas, iluminación de edificios, caminatas y repartición de folletos.

En 2010, el grupo de investigación liderado por la Dra. Gabriela Balogh (Investigadora Adjunta de CONICET), realizó el primer estudio del país sobre polimorfismos poblacionales [36], con el fin de medir el riesgo de cáncer mamario de origen hereditario, investigando las mutaciones en 16 regiones diferentes del gen BRCA 1 a través de la técnica de STRs ("*Short Tandem repeat sequences*"). Se observó que la mutación más prevalente ocurría en el exón 11 de dicho gen (68,75%) [45]. Dado que la sobrevivencia de las pacientes con cáncer de mama aumenta cuando la enfermedad es detectada y tratada en estadios tempranos, resulta fundamental identificar pacientes de alto riesgo no-enfermas mediante exámenes genéticos, representando una ventaja importante a la hora de tomar medidas preventivas oportunas y eficaces. Si bien este tipo de pruebas genéticas no se realiza con frecuencia en la mayoría de los países latinoamericanos, en otros como Estados Unidos, Canadá, Polonia, Israel y muchos países de Europa Occidental, integran la batería de estudios para evaluar pacientes con riesgo de desarrollar cáncer de mama hereditario [14].

### **I.3 Inmunoterapia**

La inmunoterapia como tratamiento contra el cáncer mamario fue siempre limitada dada la creencia de la escasa o nula inmunogenicidad de los tumores mamarios. No obstante, recientes investigaciones han refutado esta idea al comprobar la inmunogenicidad de los subtipos más agresivos del cáncer de mama como el Triple Negativo. Los ensayos clínicos de vacunas y otros agentes inmunoterápicos han arrojado resultados prometedores, abriendo una nueva alternativa para el tratamiento de la enfermedad [46], al punto de considerar a la inmunoterapia como preparada para modificar el esquema terapéutico de ciertas neoplasias mamarias [47].

Cada vez es mayor la evidencia experimental y clínica sobre el rol activo del sistema inmune en el control de la tumorigénesis y su progresión, como así también de los mecanismos moleculares que permiten al tumor evadir el control inmunológico y proliferar [48]. Por ello, la inmunoterapia se ha venido desarrollando en los últimos años como abordaje terapéutico capaz de complementar los tratamientos antineoplásicos convencionales (cirugía, quimioterapia, radioterapia). Esto en parte debido a la persistente búsqueda de modalidades terapéuticas que mejoren las terapias convencionales, y en parte debido al mayor conocimiento de la participación del sistema inmune en el control de las neoplasias mamarias [49]. Combinar nuevos abordajes inmunoterápicos con quimioterapia y radioterapia resultaría prometedor para optimizar el tratamiento del cáncer mamario [50], ya que es probable que las inmunoterapias resulten más exitosas cuando se hallen combinadas. Además, el mayor beneficio de la inmunoterapia probablemente dependa de la aplicación de estrategias terapéuticas adecuadas al subtipo y etapa de la neoplasia mamaria [47].

La Inmunomodulación positiva tiene por finalidad activar al sistema inmune para que responda efectivamente a la presencia de antígenos asociados al tumor (AAT) –que generalmente no se logra reconocer como extraños-, o que elimine la tolerancia inmune a dichos antígenos [51]. Actualmente, se reconocen dos tipos de Inmunoterapia:

- **Inmunoterapia pasiva**, por transferencia de anticuerpos o células *in vitro* dirigidos contra el tumor.
- **Inmunoterapia activa**, a través de la estimulación *in vivo* del sistema inmune para que genere una respuesta específica contra los antígenos tumorales.

Ambas modalidades pueden estar directamente dirigidas contra los antígenos tumorales (Inmunoterapia inespecífica), o producir una activación general del sistema inmune (Inmunoterapia específica) [49].

Respecto, del escape tumoral, se han identificado diversas proteínas implicadas en los mecanismos de inmunoevasión como:

- ❖ Factores de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ , VEGF, IL-6 o IL-10).
- ❖ Expresión de Galectina-17.

Tales mecanismos inmunoevasores, permitirían al tumor escapar del ataque del sistema inmune a través de la activación de células reguladoras [37], entre ellas:

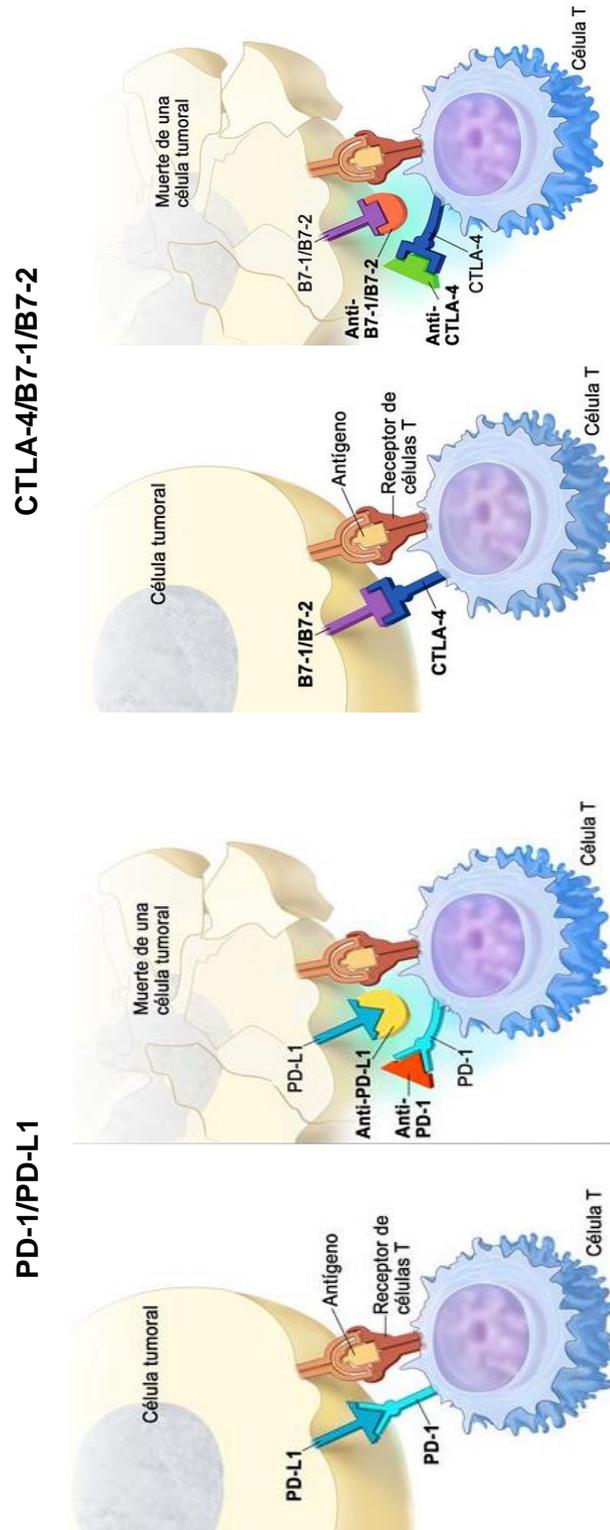
- Linfocitos T reguladores (LTreg), suprimen la respuesta antitumoral inmunitaria mediante:
  - Bloqueo de Linfocitos T efectores (LTh, LB) promoviendo su apoptosis,
  - Inhibición de la producción de citoquinas generadas por células *Natural Killer* (NK).
  - Modificación de la expresión antigénica de células dendríticas (CD) para volverse tolerantes.
- Células Supresoras Mieloides (CSM). Son poblaciones inmaduras de macrófagos, granulocitos y otras células mieloides, que en el microambiente tumoral pueden ser inducidas para generar un fenotipo tumoral por acción de factores de crecimiento como VEGF y GM-CSF.
- Macrófagos asociados al tumor (MAT). Se vinculan con la angiogénesis tumoral a través de la producción de VEGF, promoviendo el ingreso de células tumorales al torrente sanguíneo en metastización. Pueden remodelar la matriz extracelular al generar proteasas y suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral efectora atrayendo Linfocitos T reg al microambiente tumoral o mediante la producción de ROS, y quineurinas (productos de la enzima 2,3-dioxigenasa, metabolizadora del triptófano) asociadas a la apoptosis de Linfocitos T en un microambiente deplecionado de triptófano.
- Células dendríticas (CD). Son células presentadoras de antígenos que en la madurez inducen una respuesta inmunitaria antitumoral antígeno-específica mediada por Linfocitos T, pero durante la inmadurez podrían generar tolerancia y facilitar el escape tumoral. Factores de crecimiento tumorales como VEGF, GM-CSF, IL-6 o IL-10 pueden impedir la maduración y diferenciación de células dendríticas [48].

De los mecanismos inmunoevasores descritos, los Linfocitos T reg resultarían los de mayor relevancia, pudiendo constituir un potencial blanco terapéutico [52]. Por ello, muchas estrategias inmunoterápicas apuntan a deplecionar los Linfocitos Treg, mediante el diseño de anticuerpos monoclonales contra epítopes específicos de la superficie celular de estos LTreg, como anti-CTLA-4 (Ipilimumab) [49].

Otras líneas de investigación se encaminan hacia la posibilidad de bloquear células dendríticas inmaduras o promover su diferenciación y maduración [48]. Un importante avance en Inmunoterapia activa se dio con el cultivo de notables cantidades de CD a partir de precursores monocitarios frente a GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) e IL-4 [49].

Diversas estrategias inmunoterápicas apuntan al desarrollo de vacunas proteicas dirigidas puntualmente contra el antígeno asociado a tumor (AAT), pero sin dañar células sanas. Estas vacunas, al proporcionar una fuente exógena de AAT, inducen respuestas inmunes contra los tumores mamarios que expresan el AAT. Actualmente, se halla en la etapa final de ensayo clínico la vacuna NeuVax diseñada para el subtipo mamario HER-2, pero con expresión media a baja del receptor, la cual podría emplearse como adyuvante luego de completar la terapia estándar. Esta vacuna posee un péptido inmunogénico derivado del receptor HER-2 y se halla combinada con un estimulante inmunitario como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos) [47]. Hasta el momento, era posible tratar con trastuzumab los subtipos de neoplasias mamarias que sobre expresan receptores HER-2 [53], pero este anticuerpo monoclonal no permite obtener buenos resultados para concentraciones bajas o moderadas del receptor HER-2. Se espera que la vacuna pueda estimular el sistema inmune para atacar células tumorales que expresan HER-2 luego de completar la terapia estándar.

Otra estrategia en desarrollo apunta a inhibir ciertos ligandos o receptores denominados “checkpoints” o “puntos de control inmunológico”, cuya finalidad es impedir respuestas inmunitarias exageradas o inadecuadas permitiendo conservar la tolerancia a los propios antígenos. Desafortunadamente, los *checkpoints* han sido aprovechados por células tumorales para evadir el sistema inmune, lo cual sería una de las principales deficiencias de la Inmunoterapia antitumoral. Los receptores *checkpoints* mejor conocidos y de mayor relevancia clínica son PD-1 (en células tumorales)/PD-L1 (células sanas), y CTLA-4 (células sanas)/B7-1/B7-2 (células tumorales) (Fig. 6). Ambos ligandos cumplen funciones de regulación negativa sobre los Linfocitos T. El bloqueo de los *checkpoints* por anticuerpos inhibidores permitiría potenciar la vigilancia inmunológica contra las células tumorales, generando mayor eficiencia antitumoral de Linfocitos T y del sistema inmune [54]. Inhibidores específicos contra los *checkpoints*, como anti-CTLA-4 (Ipilimumab) y anti-PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab), han demostrado un gran potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama, encontrándose actualmente en etapa clínica de investigación [55].



**Figura 6.1.** Puntos de control inmunitario PD-1/PD-L1 y CTLA-4/B7-1/B7-2. Los mismos han sido propuestos como diana de la inmunoterapia antitumoral mamaria. El bloqueo de estos ligandos promueve la destrucción tumoral por acción de los Linfocitos T, mientras que su activación inhibe el efecto antitumoral de dichos Linfocitos T, facilitando la inmunoevasión tumoral y su escape del sistema inmune. Imagen adaptada de <https://www.cancer.gov/español/publicaciones>.

#### **I.4 Antineoplásicos naturales**

La medicina natural ha sido empleada a lo largo de toda la Historia de la Humanidad para el tratamiento de las enfermedades. Desde la Antigüedad eran conocidos los efectos benéficos de muchas plantas, destinadas a la cura y prevención de ciertas enfermedades, pero fueron griegos y romanos quienes sistematizaron, a través de sus escritos, el estudio de plantas medicinales [56].

Durante el siglo pasado, la notable expansión del sector químico-farmacéutico y la producción de compuestos sintéticos y semisintéticos, dio lugar a un incremento de las reacciones adversas y colaterales, además de un alto costo de adquisición de productos medicinales. Por este motivo, en las últimas décadas se ha producido una tendencia generalizada a retomar el empleo de productos naturales, consumidos como suplementos dietarios en un número cada vez mayor de países. Estas sustancias, que exhiben propiedades farmacológicas para un amplio espectro de enfermedades, han demostrado inocuidad en comparación con medicamentos sintetizados químicamente [57,58].

El fármaco antitumoral “ideal” sería aquel capaz de eliminar selectivamente las células tumorales sin dañar las sanas, pudiendo derivar de agentes naturales con baja toxicidad, como los extractos fúngicos y/o las plantas medicinales. Hoy en día existe un gran interés por el estudio de compuestos naturales de toxicidad selectiva que cumplan estas características [59-61]. Desde esa perspectiva, la naturaleza representa una fuente inagotable de principios bioactivos con acción antineoplásica.

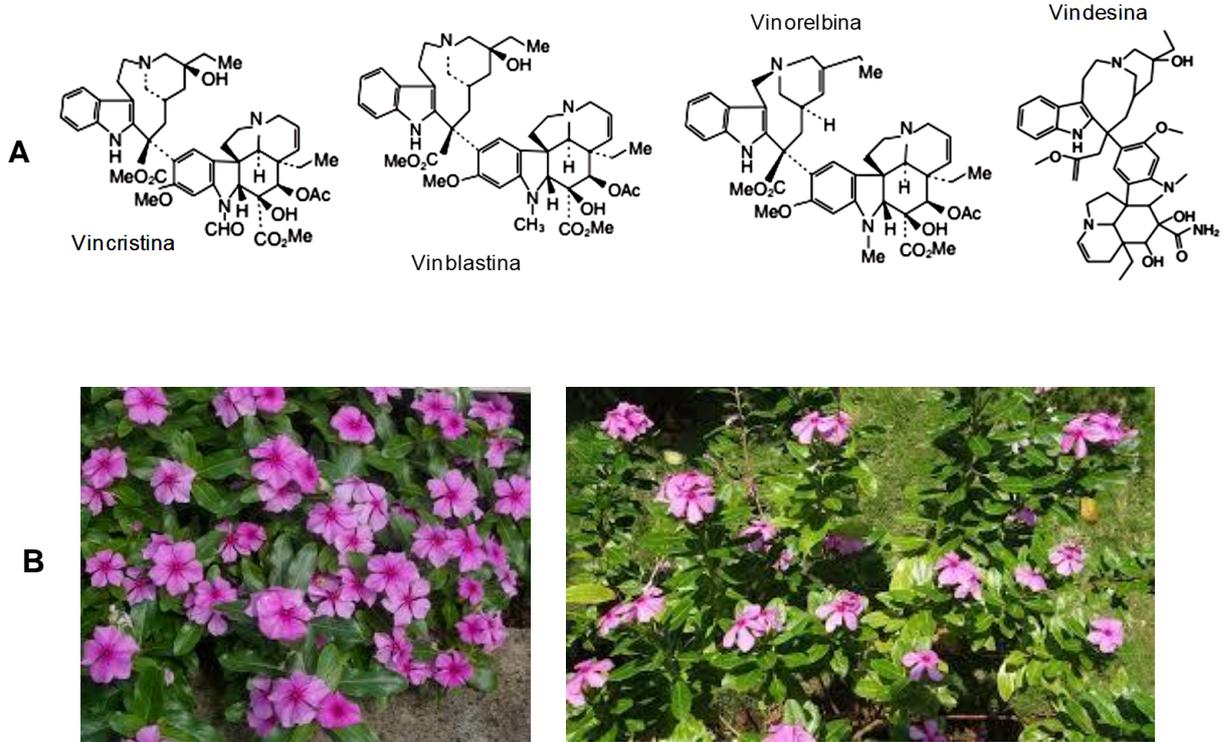
Por milenios, el hombre ha utilizado las plantas medicinales para el tratamiento del cáncer, reportándose más de 3000 especies con tal fin, aunque muchas veces han sido vistas con escepticismo por las características propias de la patología neoplásica. No obstante, dos tercios de los medicamentos oncológicos actualmente disponibles en el mercado se asocian con fuentes naturales, proviniendo directa o indirectamente del reino vegetal, ya sea por semisíntesis –para lograr mayor bioactividad y/o menor toxicidad- o por síntesis imitando precursores naturales [62-64].

A partir de 1955, el NIH (Instituto Nacional de Salud de EE.UU) ha evaluado más de 400.000 sustancias sintéticas y naturales con algún efecto antitumoral [65], siendo los alcaloides de la Vinca las primeras drogas vegetales antineoplásicas aisladas. Entre ellas,

- Vincristina, en leucemia linfocítica aguda infantil, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer cervicouterino;
- Vinblastina, en linfoma de Hodgkin, cáncer de ovario y carioepitelioma.

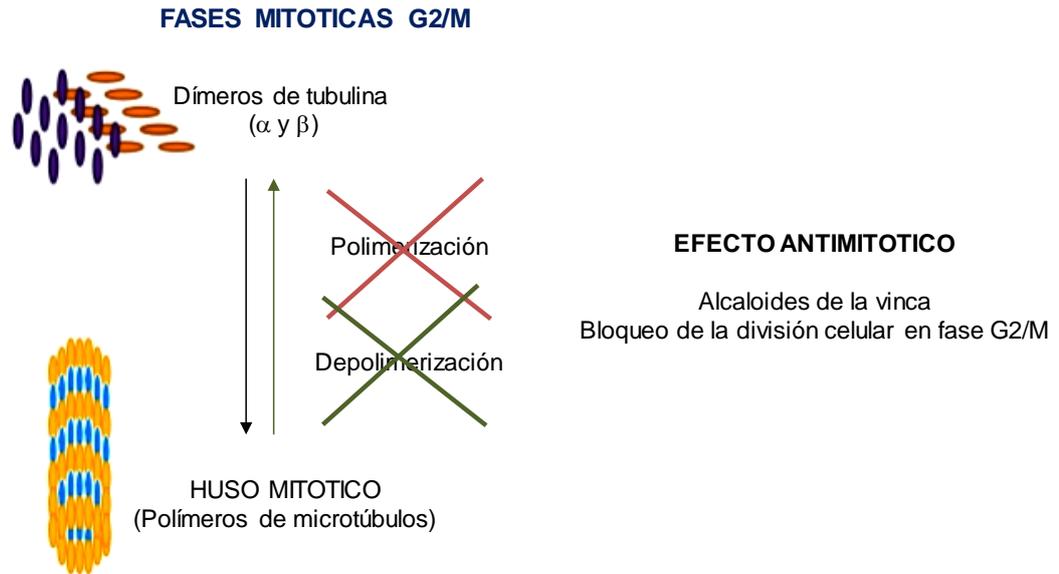
Ambas drogas fueron obtenidas de la planta medicinal *Catharanthus roseus* (Fig. 7.1), tradicionalmente utilizada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes.

Por modificaciones químicas posteriores de estas drogas (semisíntesis) se obtuvo Vinorelbina -para cáncer avanzado de ovario- y Vindesina –para cáncer de pulmón-, compuestos aprobados en Europa como antineoplásicos [62].



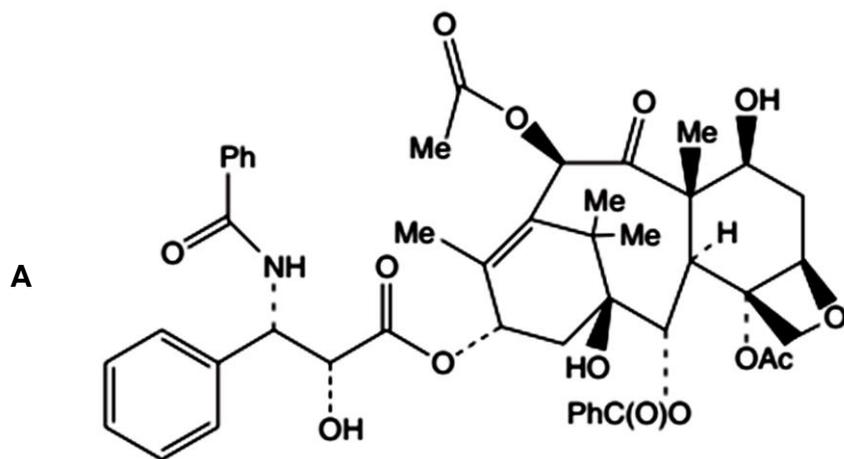
**Figura 7.1.** Alcaloides de la especie vegetal *Catharanthus roseus*. **A)** Estructura química de los alcaloides Vincristina y Vinblastina, tomado de Vega Avila E, et al 2006 [62], a partir de los cuales por se obtuvo por semisíntesis Vinorelbina y Vindesina, aprobados en Europa como antineoplásicos. **B)** *Catharanthus roseus* en su hábitat natural. La especie es nativa de Madagascar y fue utilizada tradicionalmente por varias culturas. Las imágenes proceden de [https://cdn.pixabay.com/photo/2014/04/19/10/05/catharanthus-roseus-327880\\_640.jpg](https://cdn.pixabay.com/photo/2014/04/19/10/05/catharanthus-roseus-327880_640.jpg)

Las células en división activa cuentan con microtúbulos que resultan esenciales para la formación del huso durante la mitosis, además de mantener la forma, adherencia, motilidad y transporte celular. Los alcaloides de la vinca pueden unirse a la tubulina bloqueando la polimerización de sus dímeros para formar microtúbulos. Por otra parte, el complejo tubulina-alcaloide es capaz de unirse a los microtúbulos causando detención celular en la fase M del ciclo (Fig. 8.1) [62].



**Figura 8.1.** Mecanismo antimitótico de los alcaloides de la Vinca. Los alcaloides son capaces de unirse a la tubulina bloqueando la polimerización de sus dímeros para la formación de microtúbulos. Además, el complejo tubulina-alcaloide puede unirse a los microtúbulos causando detención celular en la fase M del ciclo. Esquema adaptado de <https://image.slidesharecdn.com/2014-10seom-141027022817-conversion-gate02/95/201410-efecto-de-vinflunina-sobre-la-angiogenesis-y-la-tem-3-638.jpg?cb=1414376950>

Otro notable ejemplo de antineoplásico natural es el Paclitaxel, aislado de la corteza del árbol Tejo (*Taxus brevifolia*) (Fig. 9.1). En la actualidad, se lo obtiene por síntesis química, siendo capaz de detener el ciclo celular tumoral en mitosis [64].

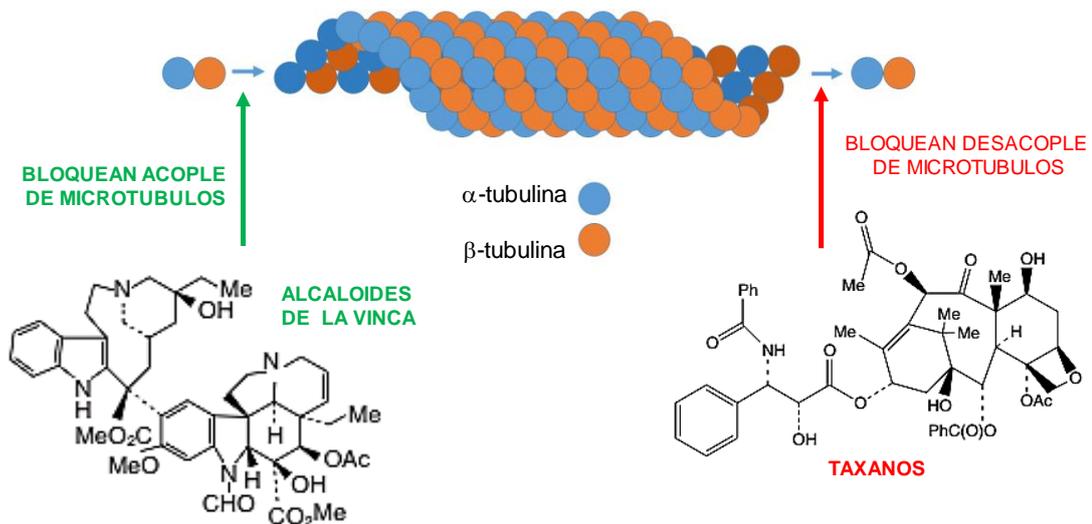


B



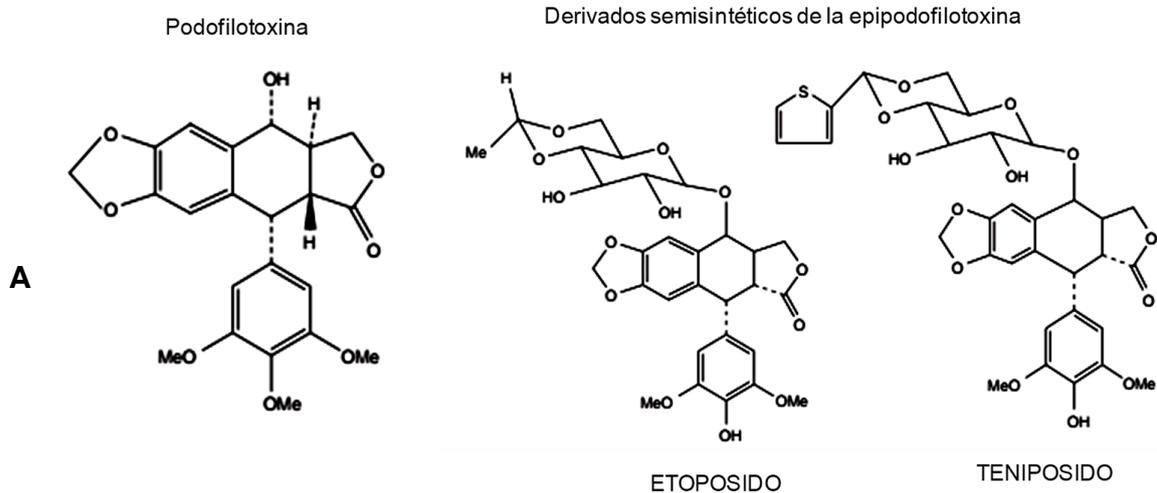
**Figura 9.1.** Paclitaxel derivado de *Taxus brevifolia*. **A)** Estructura química del antineoplásico paclitaxel, tomado de Vega Avila E, et al 2006 [62]. **B)** *Taxus brevifolia* en su hábitat natural. La especie arbórea es nativa del Noroeste del Pacífico, en Norteamérica, de cuya corteza (derecha) se obtienen los taxanos. Las imágenes fueron tomadas de <http://cdn.c.photoshelter.com/img-get/I0000UrNmaMtBulQ/s/600/600/SX718.jpg>

El mecanismo de acción de los taxanos (paclitaxel y docetaxel) implica la unión a los microtúbulos -que son flexibles- convirtiéndolos en estructuras estáticas (Fig. 10.1), con lo cual bloquean la división y causan apoptosis en el punto G2/M del ciclo celular. Dado que las células cancerosas se dividen con mayor frecuencia que las sanas, los taxanos atacan primero a las células tumorales, pudiendo afectar también a las células normales en división activa, como linfocitos y células del cabello, generando inmunodepresión, alopecia y náuseas [62].



**Figura 10.1.** Mecanismo de acción de Taxanos y Alcaloides de la Vinca. Los alcaloides de la vinca pueden unirse a la tubulina bloqueando el acople de los microtúbulos, mientras que los taxanos se unen a los microtúbulos convirtiéndolos en estructuras estáticas. Imagen adaptada de [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Microtubules\\_and\\_alkaloids.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Microtubules_and_alkaloids.png).

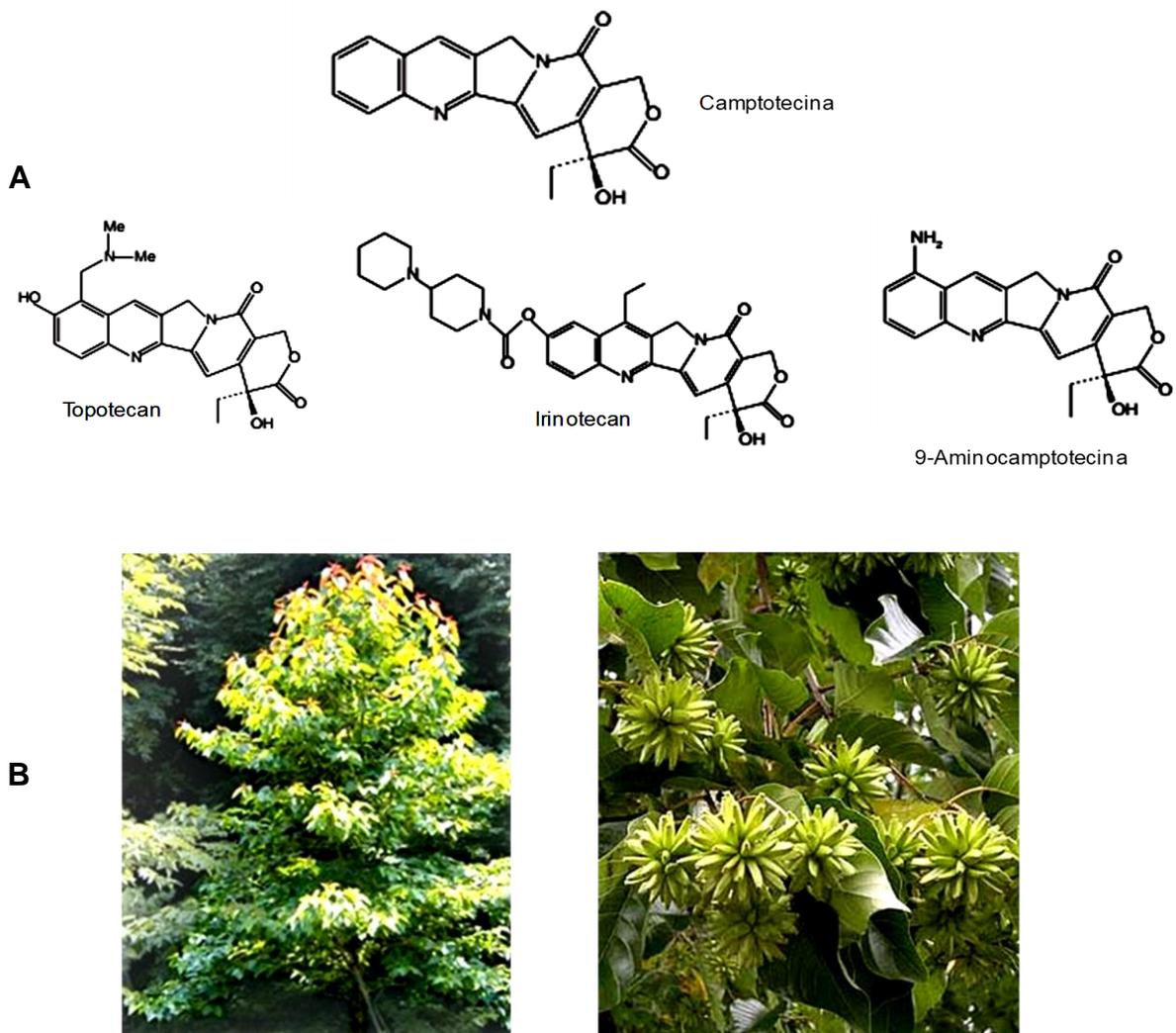
Por su parte, los productos de semisíntesis *etopósido* 8-19 y *tenipósido* 20-25 derivan del compuesto natural epipodofilotoxina, un isómero de *podophyllotoxina*, con actividad antitumoral, obtenida de las hojas de varias especies vegetales del género *Podophyllum*, de extensa historia medicinal en las culturas americana y asiática para el tratamiento del cáncer de piel [64] (Fig. 11.1).



**Figura 11.1.** *Podofilotoxina* derivada de *Podophyllum peltatum*. **A)** Estructura química de los antitumorales podofilotoxina y de los derivados semisintéticos de la epipodofilotoxina, etopósido y tenipósido, tomado de Vega Avila E, et al 2006 [62]. **B)** *Podophyllum peltatum* en su hábitat natural. La especie es nativa de los bosques caducifolios del Este de Norteamérica, de cuyas hojas se pueden aislar Etopósido y Tenipósido. La imagen fue tomada de <http://3.bp.blogspot.com/shr5yZmsmxk/UFfaHwiiwel/AAAAAAAAOwY/QTdKqwxLJL4/s1600/materia-medica-homeopatica-vijnosky-PODOPHYLLUM-Peltatum-Podofilo.jpg>

La *Podofilotoxina* se une a la tubulina impidiendo la polimerización de los microtúbulos, mientras que Etopósido y Tenipósido son inhibidores de la enzima *Topoisomerasa II*. Esta enzima resulta esencial para la replicación y transcripción del DNA y la recombinación y segregación cromosómica; corrige los errores del DNA y restaura la cadena a su configuración espacial adecuada. Los alcaloides de la *Podofilotoxina* forman un triple complejo con la enzima y la cadena de DNA impidiendo la restauración posterior de la cadena original al bloquear la unión de la doble hélice del DNA. Como resultado, el DNA no puede replicarse y queda impedida la mitosis celular [62].

Los agentes antitumorales Topotecan, Irinotecan y 9-Aminocamptotecina son derivados semisintéticos de Camptotecina, alcaloide de tipo indólico que se aísla del árbol ornamental *Camptotheca accuminata*, nativo de China y Tíbet (Fig. 12.1). El uso como antineoplásico de los productos Irinotecan (Campostar) y Topotecan (Hycamptin) fue aprobado en la década del 90 en EE.UU [65].

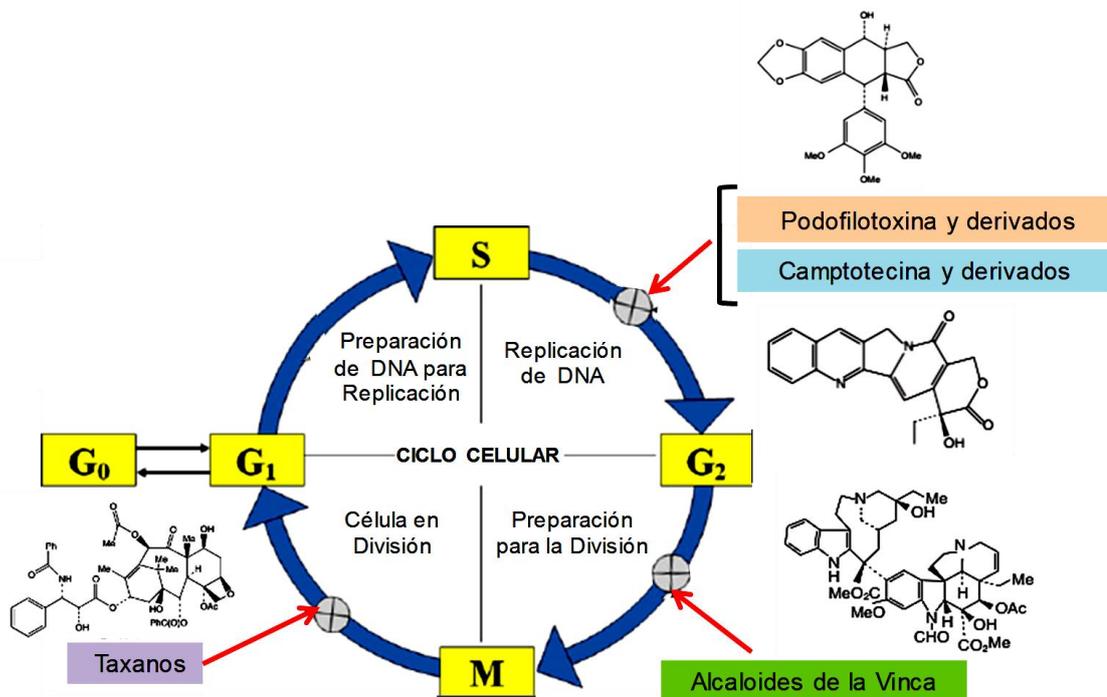


**Figura 12.1.** *Camptotecina* de la especie arbórea *Camptotheca accuminata*. **A)** Estructura química de los antitumorales semisintéticos derivados de Camptotecina, Topotecan, Irinotecan y

9-Aminocamptotecin, tomado de Vega Avila E, et al 2006 [62]. **B)** *Camptotheca acuminata*, árbol ornamental nativo de China Central y el Tíbet del cual se obtiene el alcaloide Camptotecina. Tomada de [http://commons.hortipedia.com/images/d/df/Camptotheca\\_acuminata\\_PDB.jpg](http://commons.hortipedia.com/images/d/df/Camptotheca_acuminata_PDB.jpg)

El mecanismo de acción de los análogos de la Camptotecina implica la formación de complejos con la enzima topoisomerasa I, clave en el desenrollamiento del DNA previamente a la transcripción o replicación, presente en altos niveles en los tumores malignos. El complejo Camptotecina-Topo I inhibe la síntesis de DNA y RNA, y la exposición prolongada a estas drogas causa daño irreparable al DNA y muerte celular [62].

Las fases de ciclo celular afectadas por los antineoplásicos de origen vegetal ya descritos se resumen en la Fig. 13.1.



**Figura 13.1.** Etapas del ciclo celular target de antitumorales vegetales. Se resumen los mecanismos de acción de taxanos, alcaloides de la Vinca, podofilotoxina, camptotecina y derivados. imagen fue adaptada de [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Microtubules\\_and\\_alkaloids.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Microtubules_and_alkaloids.png)

La OMS, ha reconocido la importancia de la Medicina Natural Tradicional, por lo cual creó a finales de los 70 el Programa de Medicina Tradicional. Para ello, recomienda a los países miembros el desarrollo de políticas públicas que promuevan la inclusión de la medicina tradicional y de la medicina alternativa en los sistemas de atención de la salud [66]. Propone también un mayor control sobre las plantas medicinales, ya que solo

25 países cuentan con legislaciones específicas sobre el uso de hierbas medicinales para fines terapéuticos [66].

No solo los fármacos vegetales representan un importante mercado económico, también las hierbas medicinales comercializadas como suplementos dietarios o medicinas naturales conforman un mercado importante. A pesar del origen natural y la baja toxicidad de algunas especies, estos productos no son totalmente inocuos, y pueden resultar tóxicos si no se utilizan correctamente o son ingeridos en grandes dosis [63,64,67].

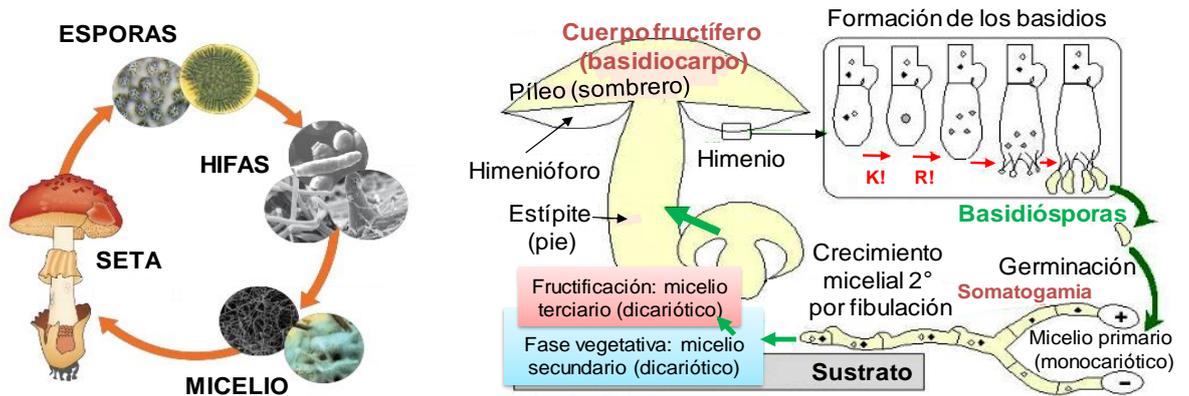
### **I.5 Rol antitumoral de los hongos medicinales**

Durante siglos, las plantas fueron utilizadas como fuente de drogas y medicamentos vegetales por el hombre, quedando relegado el uso de los hongos para tales fines. Sin embargo, la situación parece estar revirtiéndose, a tal punto que es el Reino Fungi el cual promete constituirse como fuente de productos farmacéuticos y medicinales para futuras investigaciones. Este Reino representa una fuente natural de medicamentos beneficiosos y no tóxicos [68], y los metabolitos biológicamente activos constituyen un campo de estudio amplio y prometedor, hoy escasamente investigado. Los usos terapéuticos van desde antimicrobianos, antivirales, antifúngicos y citostáticos hasta enzimas reguladoras del crecimiento [69,70]. Además, algunos producen sustancias anticancerígenas conocidas como aflatoxinas [71,72].

El continente asiático cuenta con una larga tradición en el consumo de setas, no solo por sus cualidades alimenticias sino por su valor medicinal reconocido desde hace milenios [73]. Su inclusión como suplemento alimentario mejora significativamente la condición fisiológica y el pronóstico de los pacientes con cáncer, dados los efectos benéficos a nivel hematológico e inmune [68].

La mayor parte de los hongos medicinales y/o comestibles pertenecen a la División *Basidiomycota* o *Ascomycota*. Ambos incluyen una fase de reproducción sexual micelial que sucede sobre leños o en forma subterránea dando como resultado grandes cuerpos carnosos (cuerpos fructíferos) que crecen sobre la tierra: basidiocarpos (en el caso de los basidiomicetes) y ascocarpo (en los ascomicetes). Los cuerpos fructíferos liberan esporas al medio (análogas a las semillas de una planta) a través de las cuales tiene lugar la próxima generación. Cuando las esporas germinan, forman hifas que originan el micelio, dando lugar al cuerpo fructífero [74] (Fig. 14.1).

**CICLO BIOLÓGICO BASIDIOMICOTA**



**Figura 14.1.** Ciclo biológico de un Basidiomicota típico. Estos incluyen una fase de reproducción sexual micelial sobre leños o en forma subterránea generando cuerpos fructíferos o basidiocarpos, los cuales liberan esporas al medio que originan la próxima generación. Imagen adaptada de <https://inmunosetas.files.wordpress.com/2012/02/ciclo-basidios1.jpg>

La medicina tradicional oriental ha empleado por miles de años especies como Maitake (*Grifola frondosa*), Reishi (*Ganoderma lucidum*), Chaga (*Inonotus obliquus*), Shiitake (*Lentinus edodes*), entre otros [75] (Fig. 15.1). En cambio, la aceptación en Occidente ha sido mucho menor, a causa del riesgo de adquirir enfermedades y su posible toxicidad [76,77].

**Shiitake (*Lentinus edodes*)**



**Coriolus versicolor**



**Agaricus blazei**



**Maitake (*Grifola frondosa*)**



**Chaga (*Inonotus obliquus*)**



**Reishi (*Ganoderma lucidum*)**



**Figura 15.1.** Especies medicinales más conocidas. Estas especies de hongos empleadas por milenios en medicina tradicional oriental, mientras que la aceptación en Occidente ha sido mucho menos frecuente. La actividad antineoplásica de algunas especies ha sido lo que más atrajo la atención científica.

La actividad antineoplásica del Reino Fungi fue lo que atrajo la atención de los científicos en los últimos años [68], reportándose efectos antitumorales en metabolitos derivados de *Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis*, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* y *Polyporus umbellatus* [73,79], como así también en más de 200 especies de basidiomicetes [68] (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Hongos con actividad antitumoral. Esta actividad biológica atrajo fuertemente la atención de los científicos en los últimos años. La Tabla resume las especies del Reino Fungi que resultan más eficaces según el tipo de neoplasia. Adaptado de Chatterjee S, et al 2011 [68].

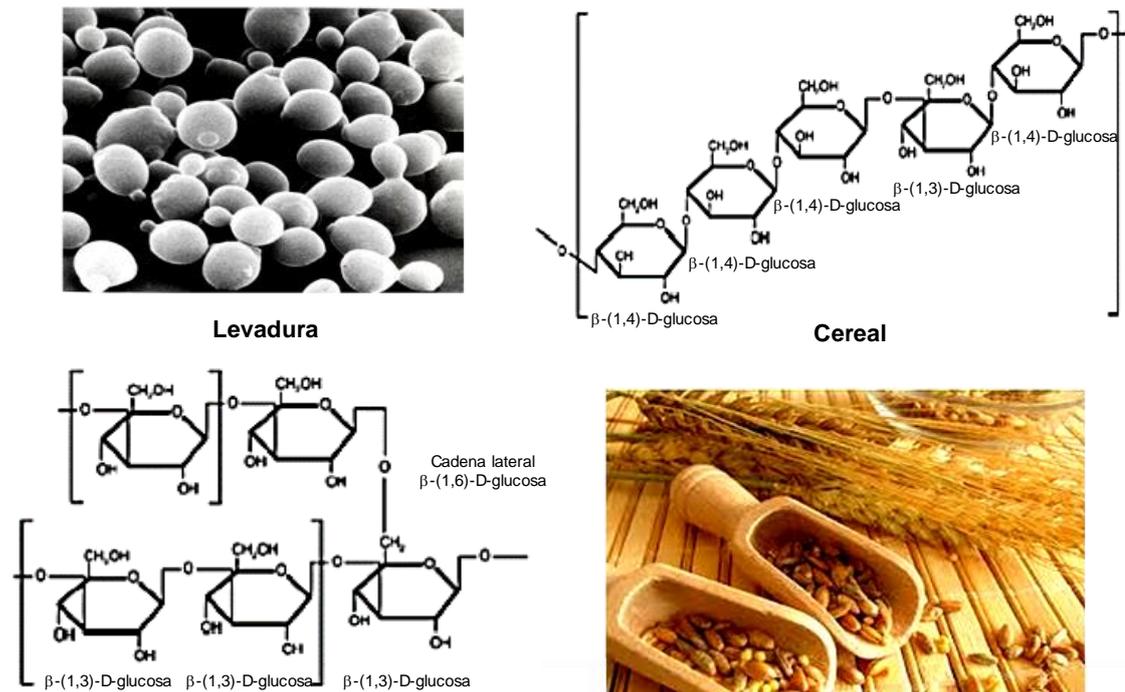
ESPECIE FUNGICA	EFICACIA TERAPEUTICA
<i>Agaricus sylvaticus</i>	CANCER COLORECTAL
<i>Coriolus versicolor</i>	CANCER DE PULMON DE CELULAS NO PEQUEÑAS
<i>Ganoderma lucidum</i>	CANCER AVANZADO
<i>Grifola frondosa</i>	CANCER DE MAMA, PULMON, PROSTATA, HIGADO Y CANCER GASTRICO
<i>Inotus obliquus</i>	TUMOR
<i>Lampteromyces japonicus</i>	CARCINOMA DE EHRlich
<i>Lentinula edodes</i>	CANCER DE COLON, CANCER DE ESTOMAGO
<i>Lepista inversa</i>	LEUCEMIA LINFOCITICA / CANCER DE PULMON DE LEWIS
<i>Omphalatus olearius</i>	CRECIMIENTO DE CELULAS CANCEROSAS
<i>Phellinus linteus</i>	CRECIMIENTO, ANGIOGENESIS E INVASIVIDAD DE CELULAS DE CANCER DE MAMA
<i>Phyllinus rimosus</i>	LINFOMA ASCITICO DE DALTON
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	CARCINOMA ASCITICO DE EHRlich
<i>Schizophyllum commune</i>	CANCER CERVICAL
<i>Agaricus blazei</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Boletus edulis</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Calvatia gigantea</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Flammulina velutipes</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Lyophyllum decastes</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Pholiota nameko</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Pleurotus spodoleucus</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Sparassis crispa</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)
<i>Tricholoma matsutake</i>	SARCOMA 180 (TUMOR INDIFERENCIADO DE RATAS ALBINAS)

Actualmente, se están estudiando agentes inmunoterápicos capaces de identificar y destruir células cancerosas previniendo la tumorigénesis [59], persistiendo la búsqueda de un fármaco "ideal" que reúna esas características. Por ello, numerosos agentes inmunoactivadores aislados de plantas y hongos superiores abren la puerta al desarrollo de fármacos novedosos para tratar las afecciones que alteran el normal equilibrio del sistema inmunológico [56].

Metabolitos fúngicos con actividad inmunopotenciadora, pueden constituirse en antitumorales de gran utilidad clínica [68]. La propiedad de modular en forma positiva o negativa el sistema inmune, o de activar los mecanismos de defensa del huésped, podría ayudar a mantener un buen estado de salud, de modo que los agentes

inmunopotenciadores o inmunoactivadores podrían representar una herramienta terapéutica adicional al uso de la quimioterapia convencional en pacientes inmunodeficientes [56].

Muchas especies fúngicas presentan moléculas con actividad biológica (Tabla 3.1), pero los polisacáridos de estructura compleja son un denominador común entre ellos y algunas hierbas vegetales, siendo los compuestos más potentes y estudiados por sus efectos antitumorales e inmunomoduladores demostrados [74]. Por lo general, los  $\beta$ -glucanos de cereales resultan beneficiosos para las actividades metabólicas, mientras que los derivados de hongos y levaduras son inmunoestimulantes [80-81] (Fig. 16.1).



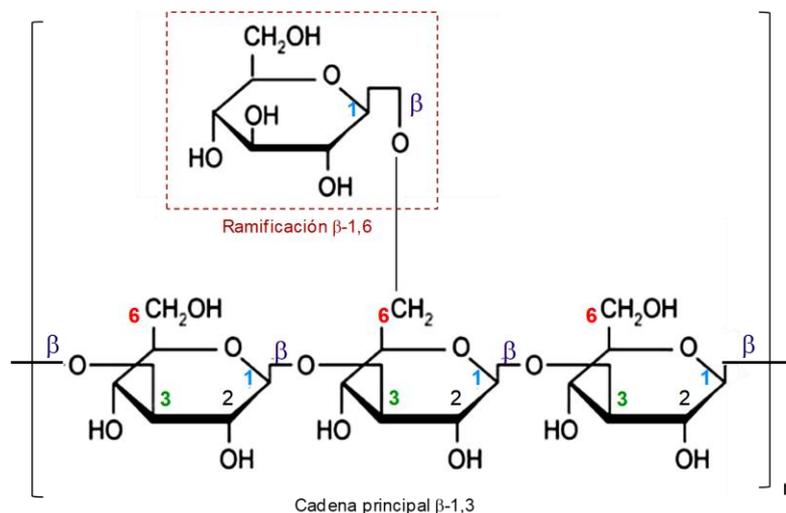
FUENTE	ESTRUCTURA DEL $\beta$ -GLUCANO	
CEREALES	$\beta$ -(1,3) / $\beta$ -(1,4)-glucano lineal	
BACTERIAS	$\beta$ -(1,3)-glucano lineal	
LEVADURAS	$\beta$ -(1,3)-glucano con largas ramificaciones $\beta$ -(1,6)	
HONGOS SUPERIORES	$\beta$ -(1,3)-glucano con cortas ramificaciones $\beta$ -(1,6)	

**Fig. 16.1.**  $\beta$ -glucanos procedentes de distintas fuentes. Se indica la estructura química de los mismos. Por lo general, los  $\beta$ -glucanos de cereales resultan beneficiosos para actividades metabólicas, mientras que los de hongos y levaduras son inmunoestimulantes. Adaptado de Volman JJ, 2009 [81].

**Tabla 3.1.** *Metabolitos biológicamente activos de hongos comestibles.* Dichos metabolitos han sido identificados en los últimos años. Los polisacáridos de estructura compleja representan los compuestos más potentes y estudiados por sus efectos antitumorales e inmunomoduladores. Adaptado de Illana-Esteban C, et al 2008 [73].

METABOLITOS FUNGICOS	ESPECIES
<i>B-GLUCANOS</i>	AGARICUS BLAZEI GANODERMA LUCIDUM
<i>FRACCION D (B-GLUCANO)</i>	GRIFOLA FRONDOSA
<i>LENTINANO (B-GLUCANO)</i>	LENTINULA EDODES
<i>SCHIZOPHYLLANO (B-GLUCANO)</i>	SCHIZOPHYLLUM COMMUNE
<i>POLISACARIDO K (KRESTINA, PSP)</i>	TRAMETES VERSICOLOR
<i>POLISACARIDOS (PACHYMARANO)</i>	PORIA COCOS

Los polisacáridos micóticos han demostrado ser potentes inmunomoduladores con actividad específica sobre linfocitos T y células presentadoras de Antígeno, con aplicaciones en inmunopatologías como cáncer o VIH [82]. Estos polisacáridos son  $\beta$ -glucanos con una cadena lineal central de D-glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,3 con ramificaciones laterales de glucosa  $\beta$ -1,6 (Fig. 17) de distintos tamaños, capaces de modular el sistema inmune a través de la promoción de la actividad fagocítica, la activación leucocitaria o la producción de citoquinas, lo cual podría conferir la actividad antitumoral [83,84].



**Figura 17.1.** *Estructura monomérica del polímero  $\beta$ -D-glucano.* Este presenta una cadena principal  $\beta$ -1,3 con ramificaciones  $\beta$ -1,6. En color celeste, verde y rojo se indican los carbonos N°1, 3 y 6 respectivamente, que intervienen en los enlaces glicosídicos. La imagen fue adaptada de [http://adaptogeno.com/beta/Imagenes/maitake\\_clip002.gif](http://adaptogeno.com/beta/Imagenes/maitake_clip002.gif).

Los  $\beta$ -glucanos fúngicos pueden afectar las etapas de promoción y progresión tumoral mejorando la capacidad antioxidante del huésped, regulando positivamente las enzimas de fase I y II de la transformación metabólica y la desintoxicación de agentes mutágenos. Sus efectos citotóxicos podrían bloquear la angiogénesis tumoral o la activación de células no inmunes supresoras de tumores [69].

Los polisacáridos pueden ser aislados del cuerpo fructífero, del micelio o del medio de cultivo líquido del micelio, existiendo gran similitud en los diferentes métodos extractivos [85].

### **1.6 Empleo del extracto glicoproteico de *G. frondosa* rico en $\beta$ -glucanos**

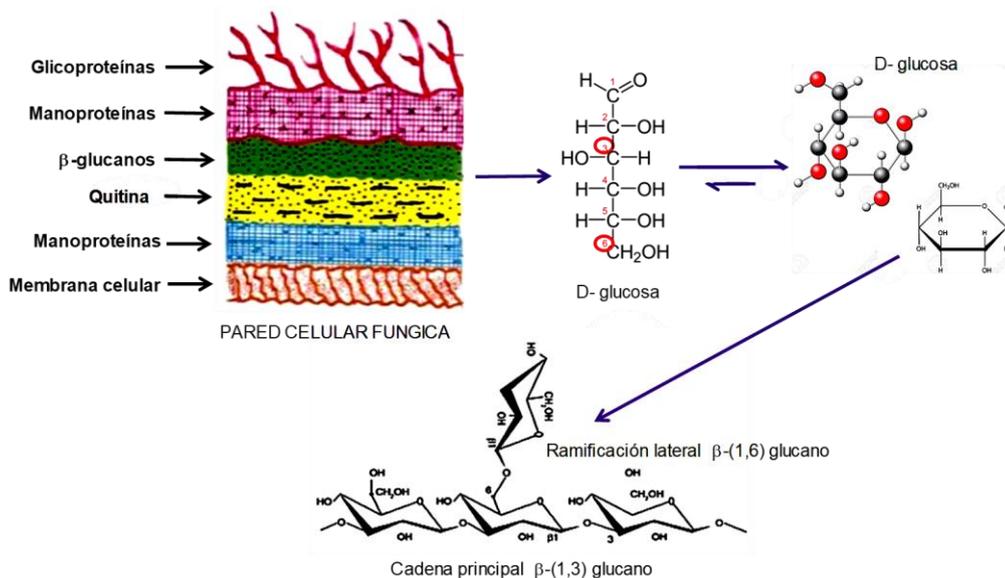
*Grifola frondosa*, más conocido como Maitake (Fig. 18.1), es un hongo comestible y medicinal ampliamente conocido y respetado en países de Oriente desde hace miles de años [86]. Pertenece a la División *Basidiomycota*, Familia *Meripilaceae*, Orden *Polyporales*; crece como parásito sobre la base de árboles caducifolios y coníferas de los bosques templados de Asia, Europa, y este de Norteamérica. Presenta basidiocarpos anuales de gran tamaño que pueden llegar a medir hasta un metro de diámetro y pesar 20 kg. Estos están ramificados y formados por numerosos sombreros pequeños con forma de abanico, encontrándose imbricados [73].



**Figura 18.1.** *Grifola frondosa* (Maitake) en su hábitat natural. Este hongo comestible y medicinal, pertenece a la División *Basidiomycota*, Familia *Meripilaceae*, Orden *Polyporales*. Crece como parásito sobre la base de árboles caducifolios y coníferas de los bosques templados de Asia, Europa, y este norteamericano. Imagen tomada de [https://en.wikipedia.org/wiki/Grifola\\_frondosa](https://en.wikipedia.org/wiki/Grifola_frondosa).

A nivel nutricional, ejemplares frescos de *G. frondosa* presentan un 80% de contenido acuoso, mientras que un 22-27% de peso seco corresponde a proteínas, 50-60% a carbohidratos y 4% a grasas. Posee vitaminas C, D y B (B1, B2, B6), niacina, y ácido fólico. Entre sus minerales, predominan K, P y Mg, siguiéndoles Zn, Na, Fe y Ca. Como azúcares libres cuenta con glucosa, trehalosa y manitol. En la formación del basidiocarpo se identificó mayoritariamente ácido málico, pero también ácido láctico, acético, fórmico, cítrico, succínico, oxálico, fumárico y piroglutámico. Se determinó además la presencia de una lectina (N-acetilgalactosamina) capaz de aglutinar eritrocitos [73].

A comienzos de los '80, el micólogo japonés Hiroaki Nanba identificó una fracción presente en el micelio, pero también en el cuerpo fructífero de *G. frondosa* que presentaba mayor actividad antitumoral e importante efecto inmunomodulador [87,88] cuando era administrada por vía oral e intravenosa, a la cual denominó Fracción-D [89,90]. Puesto que podía ser inmunomodulador eficaz por vía oral, esta característica lo volvía sumamente fácil de administrar comparado, por ejemplo, con los extractos de Shiitake (Lentinan) cuyo efecto solo era óptimo en administración endovenosa [61]. Durante la década del '90, Nanba y Kubo lograron una mayor purificación del extracto Fracción D, logrando obtener la Fracción MD, con actividad biológica superior [90], quedando evidenciado el importante efecto antitumoral de *G. frondosa* [91-94]. Fracción D es insoluble en ácido, soluble en álcali y extraíble con agua caliente. A partir de *G. frondosa*, se aisló un polisacárido formado por una cadena principal  $\beta$ -1,3-D-glucosa con ramificación  $\beta$ -1-6-D-Glucosa por cada tres residuos de  $\beta$ -1-3 -D-glucosa [95] (Fig. 19.1).



**Figura 19.1.** Estructura química de  $\beta$ -glucanos 1,3 y 1,6 de *Grifola frondosa* (Maitake). El extracto glicoproteico posee  $\beta$ -glucanos de cadena principal  $\beta$ -1,6 con ramificaciones  $\beta$ -1,3, y  $\beta$ -glucanos de cadena principal  $\beta$ -1,3 con ramificaciones  $\beta$ -1,6. Además de proteínas de alto peso molecular cercano al 1.000.000 Da. Imagen tomada y adaptada de Balogh GA, 2012 [98].

Los glucanos son polisacáridos formados exclusivamente por unidades de D-glucosa unidas a través de enlaces glicosídicos  $\alpha$  o  $\beta$ , siendo los  $\beta$ -glucanos los de mayor potencial terapéutico [96,97]. El extracto purificado de Fracción D posee  $\beta$ -glucanos de cadena principal  $\beta$ -1,6 con ramificaciones  $\beta$ -1,3 y también  $\beta$ -glucanos de cadena principal  $\beta$ -1,3 con ramificaciones  $\beta$ -1,6; además cuenta con proteínas de alto peso molecular cercano al 1.000.000 Da [89,90].

Se ha propuesto que el alto peso molecular y la elevada complejidad estructural de los  $\beta$ -glucanos se correlacionaría con su mayor efecto antitumoral, siendo que las moléculas con cadena principal  $\beta$ -1,3 y ramificaciones  $\beta$ -1,6 presentarían mayor actividad biológica [96,97]. Además, la presencia de complejos de proteoglicanos daría lugar a un mayor efecto antitumoral que el de glucanos libres [97]. Tomando esto en consideración, es probable que la combinación  $\beta$ -1,6 y  $\beta$ -1,3 de glucanos, las numerosas ramificaciones de la cadena principal y el alto peso molecular de las proteínas puedan conferir la importante actividad antitumoral e inmunomoduladora reportada en Fracción D de Maitake [89,90].

En 1998, la FDA de EE.UU aprobó una solicitud de investigación de nuevos fármacos para la realización de un estudio piloto sobre los efectos de Fracción D de Maitake en pacientes con cáncer avanzado de mama y próstata [99].

Mientras que, en nuestro país, el Código Alimentario Argentina (CAA) incorporó correctamente a las especies fúngicas en el año 2012, incluyendo a *G. frondosa*, a través de las Resoluciones 92/12 y 287/12 que modificaban los artículos 1249 y 1249 bis del CAA sobre denominación, definición, clasificación, géneros, especies permitidas y especificaciones de hongos. Con anterioridad a dicha fecha, los hongos se hallaban erróneamente clasificados como "plantas aclorofilicas", pero a partir de las referidas modificaciones, Maitake quedó específicamente reconocido en el Artículo 1249 del CAA como hongo comestible de cultivo, permitiendo su comercialización en todo el ámbito del territorio nacional [100].

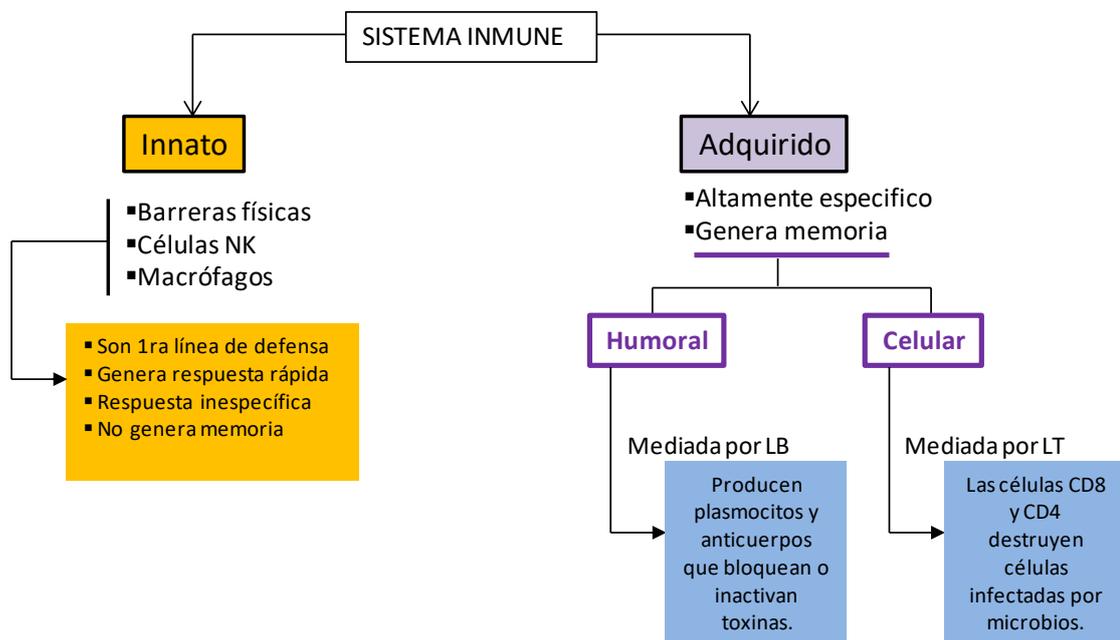
La actividad biológica de Fracción D no solo es antitumoral, dado que también se le adjudican efectos terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes, osteoporosis, síndrome de fatiga crónica, estreñimiento y artritis reumatoidea entre otras [101]. Se reportó acción antiviral (gripe, VIH, Hepatitis B), antibacteriana, antiparasitaria y antifúngica [102], y capacidad de controlar la candidiasis vaginal, además de ejercer acción antioxidante [103]. Puede actuar como antihipertensivo [104] y protector hepático [90]. La amplia gama de efectos terapéuticos sugiere la posibilidad de que Fracción D contenga múltiples principios activos, además de moléculas de  $\beta$ -glucanos, no habiéndose reportados efectos tóxicos al respecto. La seguridad en el consumo como suplemento nutricional ha sido confirmada por Consumer Product Testing Co. (New Jersey, USA) [74,105].

El producto comercial Maitake Fracción D es de venta libre en USA y Europa. Sus fabricantes recomiendan una dosis diaria de extracto de entre 0,5 mg/kg y 1 mg/kg de

peso corporal para ser empleado como suplemento dietario e inmunomodulador, lo cual equivaldría a aproximadamente 35-70 mg diarios de  $\beta$ -glucanos de Fracción D, recomendándose su ingesta 20 minutos antes de las comidas o con el estómago vacío para la obtención de mejores resultados [99].

### I.7 Efecto inmunomodulador de los $\beta$ -glucanos de Maitake

Numerosos compuestos fúngicos –como  $\beta$ -glucanos, proteoglicanos, proteínas- han sido estudiados en los últimos años debido a su capacidad para estimular o inhibir componentes específicos del sistema inmune [112] (Fig. 20.1).



**Figura 20.1.** *Respuesta inmunológica innata y adquirida.* El esquema resume características básicas y componentes principales de ambos tipos de respuesta inmune. El sistema inmunitario puede dividirse desde el punto de vista funcional en inmunidad innata (primera línea de defensa) y adaptativa (entra en acción cuando la inmunidad innata falla, elabora respuestas específicas contra una infección, guarda memoria de esta e impide la reinfección).

Los efectos inmunomoduladores de  $\beta$ -glucanos en el sistema inmune de mamíferos, involucra respuestas inmunes innatas y adaptativas, pudiendo atribuirse dichos efectos a que siendo un polisacárido que el organismo no puede sintetizar, el sistema inmune lo reconoce como extraño, generando respuestas innatas y adaptativas [113] que contribuyen al bloqueo de la progresión tumoral.

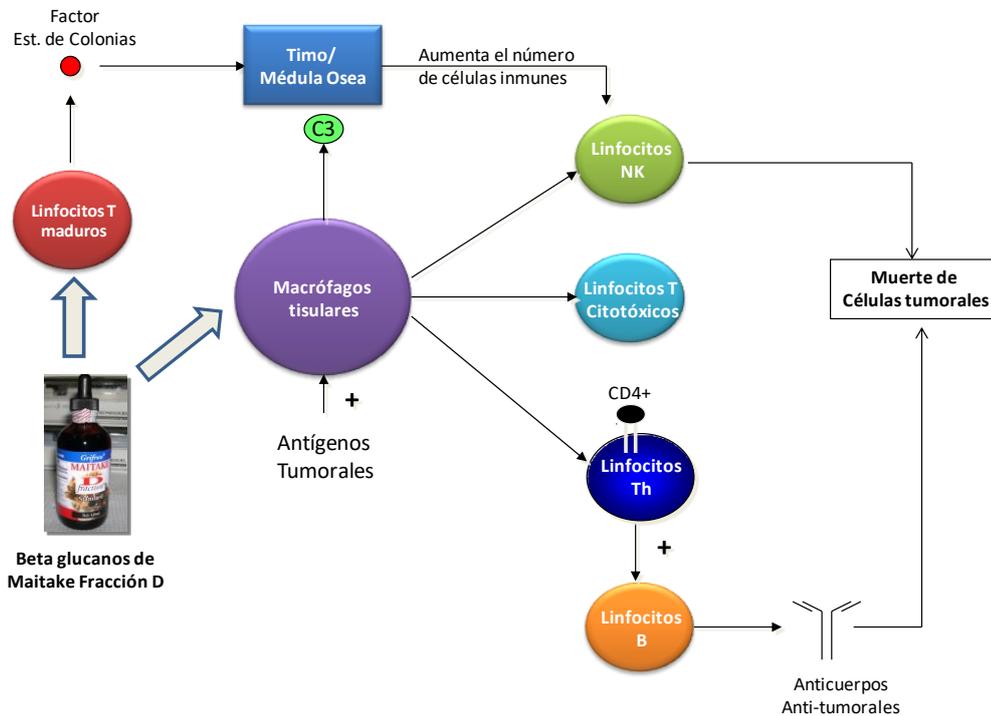
Las células Natural Killer, que forman parte de la inmunidad innata o primera línea de defensa al nacer, constituyen la principal arma de inmunovigilancia contra el desarrollo

tumoral [86], liberando IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF al cumplir su función de lisar células tumorales. La inmunidad innata también está compuesta por monocitos-macrófagos y por neutrófilos, que al reconocer agentes extraños y fagocitarlos, ponen en acción diversas enzimas como la óxido nítrico sintetasa (iNOS), la cual da lugar a intermediarios bactericidas [112].

Los macrófagos secretan citoquinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), capaces de modular respuestas innatas y adaptativas, activando a su vez a otros macrófagos, neutrófilos, NK y Linfocitos T. La actividad tumoricida de las NK se ve potenciada por IL-2, IL-12 e interferones [114]. Linfocitos T y NK producen a su vez IFN- $\gamma$  que refuerza la activación de los macrófagos.

La respuesta innata inducida por  $\beta$ -glucanos de Fracción D, involucra la activación del receptor proteico Dectina-1, que tras reconocer a estos polisacáridos desencadena eventos de fagocitosis y liberación de citoquinas [115,116].

El extracto Fracción D de Maitake activa a los macrófagos (Fig. 21.1) para que secreten IL-1 $\beta$  [89,117], IL-12 [105,116] y TNF- $\alpha$  [119], y estimula la expresión de la óxido nítrico sintetasa [120]. La IL-1 $\beta$ , además de estimular los macrófagos, promueve la citotoxicidad de Linfocitos T esplénicos, incrementando su actividad bactericida [117].



**Figura 21.1.** Inmunidad innata inducida por  $\beta$ -glucanos de Maitake. El extracto glicoproteico activa a los macrófagos para que secreten IL-1 $\beta$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , y estimula la expresión de la óxido nítrico sintetasa. La respuesta innata inducida por  $\beta$ -glucanos involucra la activación del receptor proteico Dectina-1, lo cual desencadena eventos de fagocitosis y liberación de citoquinas.

Maitake es capaz de estimular a las células NK tanto *in vitro* como *in vivo* [105], a través del incremento de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en ratones [105,121]. Además, en macrófagos se estimula la secreción de IL-12 asociada a la activación de NK mediante la mayor unión a perforinas en las células target, incrementando la lisis tumoral [105,121]. Se ha sugerido que las células NK se auto activan por el IFN- $\gamma$  liberado por ellas mismas [105]. La mayor activación de NK fue confirmada por aumento de la expresión de CD69 –marcador de activación de NK- presente en la superficie de dichas células [122]. Estudios clínicos posteriores en pacientes con cáncer, revelaron que el tratamiento con Fracción D estimulaba y mantenía normal la actividad de NK en sangre periférica [123].

En la inmunidad adquirida, que presenta como características principales la especificidad y la memoria [124], Fracción D de Maitake disminuye la expresión del marcador CD69 de activación de los Linfocitos B, y estimula a los Linfocitos Th, específicamente a los Linfocitos Th1 de ganglio linfático [105,119], presentando efectos sobre el balance de los Linfocitos Th1/ Linfocitos Th2 [119].

Se ha reportado que la carcinogénesis implica un importante desbalance LTh1/ LTh2, con disminución progresiva de LTh1 (principales inductores de LTc) y aumento de LTh2 [125]. Fracción D de Maitake es capaz de revertir ese desbalance al polarizar la respuesta LTh hacia LTh1 por estimulación de la secreción de IL-12 e IL-18 cruciales para la activación de LTh1, y bloqueo de la liberación de IL-1 de importancia para la activación de LTh2 [119].

### **1.8 Rol antitumoral del extracto purificado de *G. frondosa***

Los  $\beta$ -glucanos son BRM (Modificadores de la Respuesta Biológica) que, a diferencia de las drogas convencionales de la quimioterapia, son capaces de activar el sistema inmunológico y bloquear el desarrollo tumoral. Se ha reportado que las fracciones obtenidas de *G. frondosa* pueden detener o enlentecer el crecimiento tumoral y prevenir la metástasis, además de potenciar los efectos benéficos de la quimioterapia y reducir sus efectos tóxicos (algias, alopecia y náuseas) [126].

Estudios *in vivo* con animales, demostraron una mayor inhibición del desarrollo tumoral al combinar Maitake con el agente quimioterápico Mitomicina-c, respecto del empleo solo de Mitomicina-c [127]. También se reportó que la administración de Fracción D promueve la recuperación de la hematopoyesis de médula ósea luego del tratamiento con el quimioterápico Doxorubicina.

Estudios *in vitro* demostraron que Fracción MD de Maitake reduce el descenso de viabilidad celular de médula ósea a causa de la Doxorubicina [128]. Además, mejora el efecto terapéutico, disminuyendo la mielosupresión y nefrotoxicidad causada por el cisplatino, a la vez que aumenta la actividad antitumoral y anti metastásica de este último, reduciendo la pérdida de peso corporal y el descenso de los niveles de células

inmunocompetentes (macrófagos, células dendríticas y células natural killer) causado por el Cisplatino [129].

Fracción D es capaz de inducir apoptosis tumoral en cáncer mamario [130], renal [131], gástrico [132] y prostático [133], disminuyendo la viabilidad de células tumorales mamarias por aumento de la apoptosis de forma dosis-dependiente, mediante incremento en la expresión del gen Bak-1 y citocromo C, proteínas que participan de la vía apoptótica [130].

La angiogénesis tumoral o formación de nuevos vasos sanguíneos tumorales, permite a las células cancerosas acceder al torrente sanguíneo, lo cual juega un rol clave en el potencial metastásico del cáncer [134]. Dicho proceso es fuertemente estimulado por VEGF. Se ha reportado que un extracto acuoso de Maitake puede inhibir *in vivo* e *in vitro* la angiogénesis inducida por VEGF [135], cuyos efectos en el endotelio son mediados por el receptor VEGFR mediante una vía que incluye la fosforilación de la quinasa ERK y la activación de VEGFR. VEGF también activa a la NADPH oxidasa del endotelio generando ROS, el cual está implicado en la vía de transducción de VEGFR, por lo cual se ha sugerido que el mecanismo de Maitake que inhibe la angiogénesis, implicaría la supresión de ROS y la fosforilación de las ERKs, de manera dosis-dependiente [135].

Fracción D es capaz de bloquear el desarrollo de metástasis [136], y potenciar el sistema inmunológico, lo cual podría contribuir a la eliminación de las células tumorales de la circulación sanguínea y linfática. Se ha reportado que la inhibición metastásica se correlaciona con un aumento de los niveles de IL-12 a través de células presentadoras de antígenos (APC), activación de natural killer e inhibición de la expresión del endotelio vascular de ICAM-1, molécula asociada con la adhesión tumoral [137].



## **II- HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



## II.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer mamario es la neoplasia más frecuente en la población femenina mundial y una de las principales causas de muerte por cáncer [1,2]. De los 4 subtipos reconocidos, el Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN) presenta un patrón de alta incidencia entre las mujeres de la población afroamericana y latina, no así entre las caucásicas [28]. Representando una de las neoplasias de peor pronóstico, su tratamiento es uno de los más dificultosos por el desconocimiento de sus blancos terapéuticos [4]. Hasta ahora, la quimioterapia juega un papel clave en el tratamiento del CMTN, desplegándose muchos esfuerzos para buscar combinaciones de drogas quimioterápicas con otros fármacos [28,29].

La quimioterapia tradicional se basa en el empleo de drogas que bloquean el desarrollo incontrolado de células anormales [138,139]. Sin embargo, conlleva una elevada toxicidad sobre el tejido normal [140], ya que, al valerse de la mayor sensibilidad al tratamiento de las células en división activa, afecta también a las células normales que se dividen rápidamente [141], causando alopecia, mielosupresión, mucositis, náuseas, vómitos [142]. También se han reportado efectos colaterales como cardiotoxicidad [143-145] y neuropatía periférica [146]. Se ha observado que muchos pacientes con cáncer experimentan dolor, ansiedad y trastornos del estado anímico [147,148]. Existen reportes que demuestran deterioro cognitivo leve en pacientes con cáncer de mama luego del tratamiento quimioterápico [149]. Eventualmente, los tumores suelen presentar mecanismos de resistencia a los antineoplásicos [30,31].

Por lo general, se imparten terapias idénticas a pacientes con un tipo y etapa clínica particular de la enfermedad, pese a que cada uno puede representar una fisiopatología molecular determinada y requiera terapias más específicas [150]. En cada caso, existen muchas condiciones oncogénicas específicas interactuando entre sí para modificar el fenotipo [39]. Por ello, es necesario un tratamiento personalizado del cáncer, con terapias dirigidas a las características moleculares del tumor y a su microambiente [151]. La terapia dirigida representa una estrategia novedosa con menos efectos adversos [145] en comparación a las terapias tradicionales citotóxicas no específicas, que promete mayor selectividad, menor daño a las células normales y mejor calidad de vida [150].

Consideramos que una aproximación a ello podría consistir en la búsqueda de compuestos inmunopotenciadores derivados de fuentes naturales, con toxicidad selectiva y específica sobre células tumorales. A su vez, que tengan capacidad para prevenir la metástasis y la recidiva tumoral mientras activan el Sistema Inmunológico. De hecho, cada vez hay mayor evidencia experimental y clínica sobre la participación del sistema inmunológico en el control de la progresión tumoral [38], conociéndose los fenómenos celulares y moleculares involucrados en la respuesta inmune antitumoral [39].

La Inmunoterapia dirigida contra tumores, tiene por objeto restablecer la eficiencia de una respuesta inmune antitumoral [152]. Investigaciones recientes han demostrado que las Inmunoterapias son capaces de lograr respuestas antitumorales duraderas en pacientes con cáncer metastásico [150,153].

Por ello, el desarrollo de agentes capaces de potenciar los mecanismos defensivos del huésped (inmunoestimuladores o inmunopotenciadores), representaría una herramienta terapéutica adicional a la quimioterapia convencional. Muchas sustancias de este tipo han sido aisladas de plantas y hongos superiores, abriendo la puerta para el desarrollo de fármacos novedosos en el tratamiento de alteraciones de la respuesta inmune [49].

Recientemente, se han descubierto actividades inmunomoduladoras y antitumorales en diversos hongos [154,155]. Estos han sido consumidos durante siglos en países asiáticos por sus efectos benéficos sobre la salud y la longevidad [156,157]. Uno de los hongos comestibles y medicinales más valorados en Japón desde hace miles de años es *Grifola frondosa* [73], que posee efecto inmunomodulador [158]. Los  $\beta$ -glucanos solubles presentes en Fracción D de *G. frondosa* son capaces de generar respuestas inmunes innatas y adaptativas que contribuyen a su actividad antitumoral [159].

Los beneficios terapéuticos reportados por nuestro grupo de investigación al estudiar el tratamiento de la carcinogénesis mamaria con  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake [160], exige la profundización de aspectos farmacológicos y toxicológicos de las moléculas con actividad biológica presentes en el extracto para garantizar inocuidad y eficacia en la administración a un paciente. Por ello, conocer el perfil farmacocinético, farmacodinámico y toxicológico de los  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake, representa un aspecto crucial para justificar su utilización como agente terapéutico y las posibles interacciones con otros compuestos.

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* planteados en esta tesis doctoral, han tenido como finalidad principal elucidar aspectos toxicológicos, farmacodinámicos y farmacocinéticos de los  $\beta$ -glucanos presentes en Fracción D de Maitake. Nuestra meta es realizar un aporte significativo al conocimiento farmacológico de estos compuestos promoviendo una estrategia inmunoterapéutica y antitumoral novedosa, destinada a la prevención de la carcinogénesis mamaria mediante la administración de compuestos con actividad biológica provenientes de fuentes naturales.

## II.2 HIPOTESIS

Considerando resultados previos de nuestro grupo de investigación y reportes de la literatura científica mundial, planteamos como principal hipótesis de trabajo que **los  $\beta$ -glucanos de la Fracción D de Maitake PRO4X ejercerían su acción terapéutica por medio de dos posibles mecanismos moleculares de acción: un mecanismo directo, que involucraría la citólisis tumoral a través de la activación de un receptor específico de membrana; y un mecanismo indirecto, que implicaría la activación y/o diferenciación de poblaciones específicas de células inmunes destinado a limitar la proliferación tumoral descontrolada, "benignizando" el núcleo primario de la carcinogénesis mamaria.**

## III.3 OBJETIVOS

### III.3.1 Objetivos generales

Los objetivos generales de este trabajo son investigar los efectos antitumorales e inmunoactivadores de Fracción D de Maitake a través del desarrollo de experimentos *in vivo* (con ratones albinos) e *in vitro* (con líneas celulares mamarias normales y tumorales). Además, buscamos comparar los efectos terapéuticos de Fracción D de Maitake con:

- Drogas quimioterápicas convencionales (Doxorrubicina/Ciclofosfamida) en el tratamiento *in vivo* e *in vitro* de la tumorigénesis mamaria.
- Agentes antiestrogénicos típicos (Tamoxifeno) empleados como preventivos de la carcinogénesis mamaria.

### III.3.2 Objetivos específicos

- ***Demostrar seguridad e inocuidad en la administración del extracto glicoproteico purificado de Maitake.*** Para cumplir este objetivo desarrollamos ensayos *in vivo* de toxicidad aguda y subaguda en modelos experimentales murinos.
- ***Investigar si Fracción D de Maitake ejerce su efecto terapéutico a través de un mecanismo directo de muerte específica de células tumorales.*** Para ello, determinamos muerte celular en cultivos *in vitro* de células tumorales humanas y murinas post tratamiento con el extracto purificado de Maitake PRO4X (Mushroom Wisdom, Inc de New Jersey, USA).

- ***Demostrar si Fracción D presenta toxicidad selectiva in vitro.*** Para ello, determinamos los efectos de Maitake sobre cultivos de células mamarias normales.
- ***Comparar los efectos de prevención tumoral de Maitake vs Tamoxifeno.*** Para ello, trabajamos con un modelo murino de administración de drogas al cual le indujimos posteriormente tumorigénesis mamaria.
- ***Investigar si los posibles mecanismos directos de Maitake sobre la muerte celular tumoral involucran la participación de receptores transmembrana Dectina-1 y canales cálcicos como activadores de vías moleculares de acción mediadas por segundos mensajeros.*** Para ello, evaluamos los efectos *in vitro* de Maitake en la muerte de células tumorales mamarias, tratadas conjuntamente con un inhibidor de receptores Dectina-1 (Laminarina) y un bloqueante de canales Cálculos tipo L (Verapamilo).
- ***Determinar si el extracto glicoproteico de Maitake puede restaurar poblaciones linfocitarias específicas en un modelo experimental murino de inmunosupresión.*** Para ello, se indujo inmunosupresión murina con corticoides (Dexametasona) y se administró posteriormente Maitake, e inhibidores cálcicos (Verapamilo). La inmunorestauración en órganos linfoides murinos se investigó por citometría de flujo.

## **III- MATERIALES Y METODOS**



### III.1 EXTRACTO GLICOPROTEICO RICO EN $\beta$ -GLUCANOS (FRACTION D, USA)

Para la realización de los ensayos experimentales de este trabajo, empleamos el extracto glicoproteico purificado derivado del hongo medicinal *Grifola frondosa*, el cual se comercializa como *Maitake D Fraction PRO4X* (extracto etanólico). El mismo se elabora bajo procedimientos estandarizados de la compañía Mushroom Wisdom, Inc (New Jersey, USA).

El extracto purificado Fracción D de Maitake PRO4X presenta una concentración de  $\beta$ -glucanos cuatro veces superior a su antecesor comercial denominado Maitake Standard (Fig. 1.3), el cual contenía Fracción D 25 mg/ml, mientras que Maitake PRO4X posee 100 mg/ml de Fracción D. Se desconoce la composición química exacta de estos extractos glicoproteicos, pero ambos contienen aproximadamente 30% de proteoglucano activo, correspondiente a una mezcla de  $\beta$ -glucanos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6.



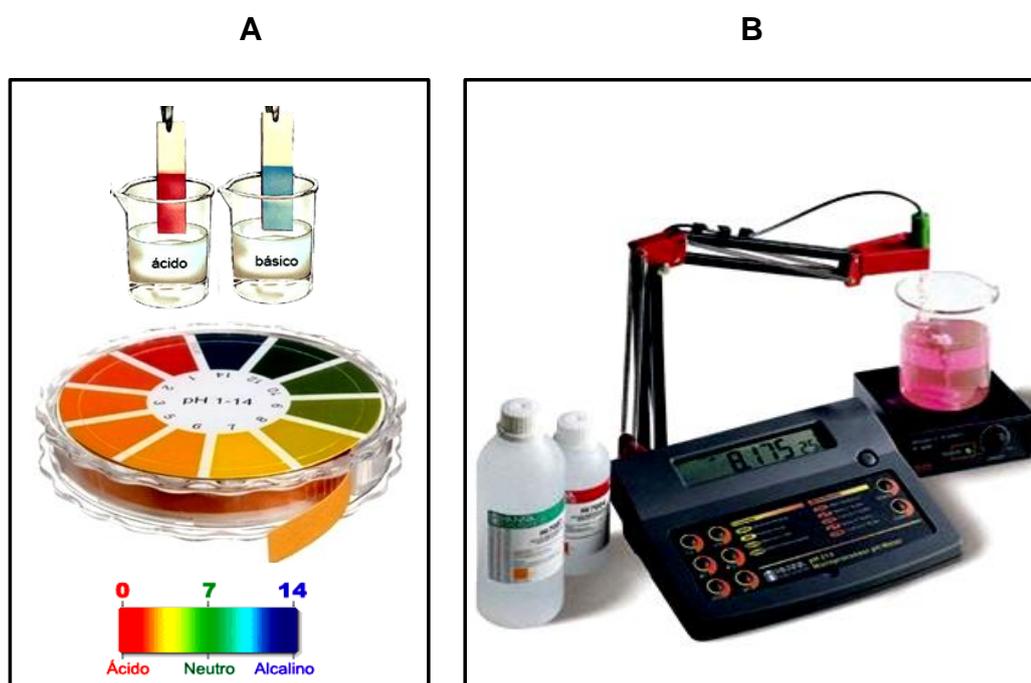
**Figura 1.3.** Presentaciones comerciales del extracto purificado de *Grifola frondosa*. Tanto la presentación previa del extracto (Maitake Estándar, izquierda), como la actual (Maitake PRO4X, derecha), pertenecen a la compañía Mushroom Wisdom, Inc (New Jersey, USA). La presentación actual Maitake PRO4X del extracto de *G. frondosa*, posee una concentración de  $\beta$ -glucanos cuatro veces superior a su predecesor comercial Maitake Standard.

El rótulo del producto Maitake D-Fraction® PRO4X (presentación de 60 ml) declara contener 6 gramos de Fracción D. Esto representaría 1,8 gramos de proteoglucano activo (30% del contenido total) correspondientes a  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos. El producto no contiene alcohol, azúcar, levadura, moho, trigo, maíz, sal, gluten, soja, colorantes artificiales, saborizantes ni conservantes.

## III.2 ENSAYOS FISICOQUÍMICOS

### III.2.1 Determinación de pH

Para establecer el grado de acidez o alcalinidad del extracto purificado de Maitake, determinamos el pH de ambas presentaciones comerciales (Standard y PRO4X) mediante indicadores de pH (papel tornasol) y por método potenciométrico utilizando un pH-metro (Accumet, Fisher Scientific, USA) con 3 puntos de calibración y exactitud de  $\text{pH}=0,01$  (Fig. 2.3).



**Figura 2.3.** *Medición de pH.* El ensayo se realizó para ambas presentaciones comerciales del extracto glicoproteico para lo cual se utilizó **A)** papel tornasol, y **B)** pH-metro Accumet, Fisher Scientific, USA, con 3 puntos de calibración y exactitud de  $\text{pH}=0,01$ .

Previo a las mediciones de pH, se efectuó la calibración del electrodo empleando 3 disoluciones tampón ( $\text{pH}=4$ ,  $\text{pH}=7$  y  $\text{pH}=10$ ), de modo de ajustar la escala en 3 valores diferentes de pH. Cada disolución tampón se homogeneizó con agitador magnético (Corning, USA), antes de introducir el electrodo y realizar la lectura para la calibración.

Para medir el pH del extracto purificado de Maitake, se verificó que el producto estuviera a  $25^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente del laboratorio) y a  $37^{\circ}\text{C}$  (temperatura corporal). Para esta última, las muestras se calentaron previamente por 5 min en estufa.

### III.2.2 Ensayo de solubilidad/polaridad

La solubilidad/polaridad del extracto purificado de Maitake, se verificó por disolución de ambas muestras comerciales en disolventes de polaridad creciente (Fig. 3.3), analizando si las muestras en cada disolvente resultaban solubles, muy solubles, poco solubles o insolubles.



**Figura 3.3.** Solubilidad/polaridad del extracto purificado de Maitake. Para estudiar este parámetro en ambas presentaciones comerciales del producto, se emplearon disolventes de polaridad creciente, analizando si las muestras resultaban solubles, muy solubles, poco solubles o insolubles.

Por otra parte, se investigó la solubilidad del extracto purificado de Maitake en sustancias hidrosolubles y liposolubles, de naturaleza ácida y alcalina, como agua destilada, ácido clorhídrico, bicarbonato al 7,5% m/v y aceite comestible.

### III.2.3 Cuantificación de $\beta$ -glucanos del extracto purificado

El contenido total de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos en ambas versiones comerciales del extracto purificado de *Grifola frondosa* (Maitake Standard y Maitake PRO4X) se cuantificó a través de un método colorimétrico efectuado en el *Laboratorio de genética de Hongos* del Dr. Eustaquio Sousa Dias en la Universidad Federativa de Lavras (Brasil).

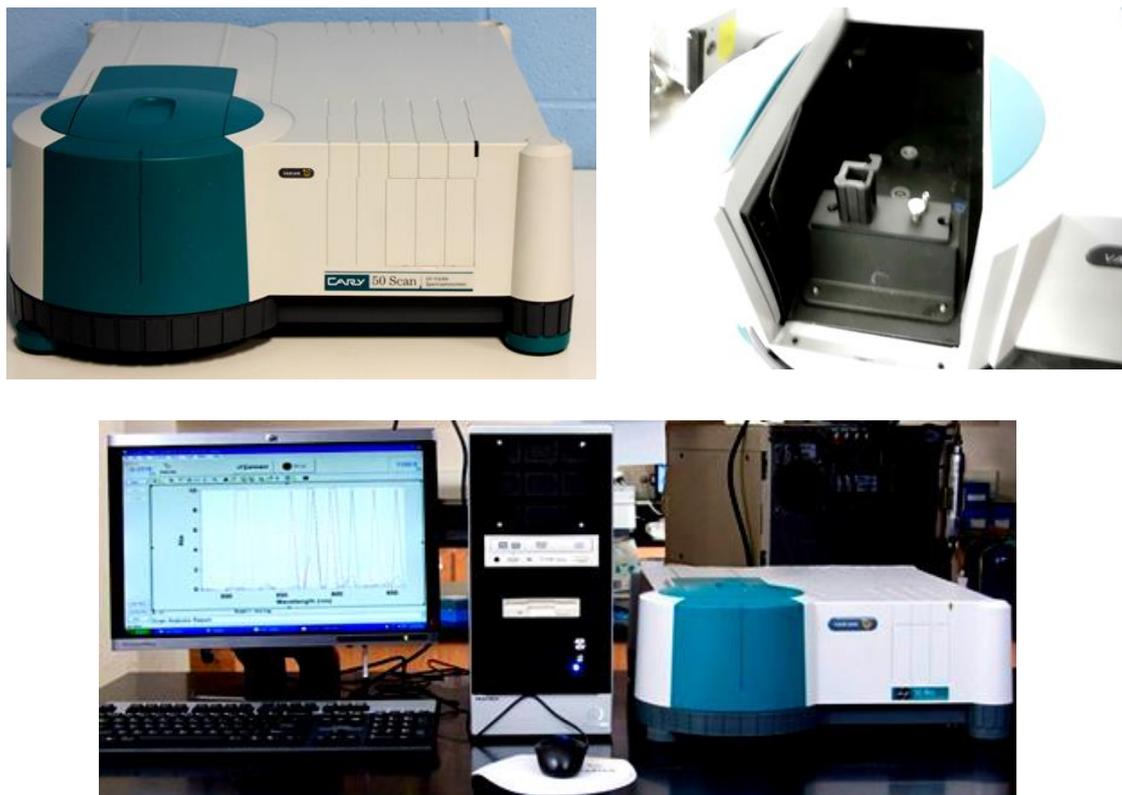
En dicho ensayo se empleó el kit comercial *Megazyme, Mushroom and yeast  $\beta$ -glucan* (Megazyme International Ireland, Bray Bussiness Park, Bray, Co. Wicklow, Irlanda) (Fig. 4.3), y se tomaron muestras por triplicado de ambos extractos. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, para 0,1 ml de muestra se adicionó 0,1  $\mu$ l de solución de Exo-1,3- $\beta$ -glucanasa (20 U/ml) con  $\beta$ -glucosidasa (4 U/ml) en buffer de acetato sódico a concentración 200 mM y pH=5. Se vortereó el contenido y se lo incubó a 40°C durante 60 min. Posteriormente, se adicionó 3 ml de Buffer GOPOD (glucosa oxidasa/peroxidasa), y se incubó por 20 min a 40°C.



**Figura 4.3.** Cuantificación de  $\beta$ -glucanos. Empleamos el kit comercial Megazyme, Mushroom and yeast  $\beta$ -glucan (Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Irlanda) para determinar el contenido total de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos en ambas versiones comerciales del extracto glicoproteico (Maitake Standard y Maitake PRO4X). El ensayo fue realizado en el *Laboratorio de genética de Hongos* del Dr. Eustaquio Sousa Dias de la Universidad Federativa de Lavras (Brasil).

El blanco de reactivos se preparó agregando 3 ml de Buffer GOPOD (glucosa oxidasa/peroxidasa) a 0,2 ml de solución buffer acetato sódico (200 mM, pH=5) e incubando a 40°C por 20 min. La solución testigo se preparó adicionando 0,1 ml de buffer acetato sódico (200 mM y pH=5) a 0,1 ml de D-glucosa Standard (1mg/ml) e incubando a 40°C por 60 min. Posteriormente, se adicionó 3 ml de buffer GOPOD y se incubó a 40°C por 20 min.

Finalmente se leyó la Absorbancia de todas las muestras y del blanco de reactivos a 510 nm en un espectrofotómetro UV-Vis marca Cary 50 Agilent (Fig. 5), empleando 2 celdas de diferente paso óptico. El valor de Absorbancia del blanco de reactivos se restó a los valores de Absorbancia de las muestras, quedando establecida la Absorbancia corregida ( $A_c$ ) mediante la fórmula:  $A_c = A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}$



**Figura 5.3.** *Espectrofotómetro UV-Visible.* Este fue utilizado en la cuantificación de  $\beta$ -glucanos de ambas versiones comerciales del extracto purificado de Maitake con el kit comercial Megazyme. El ensayo colorimétrico se realizó en el Laboratorio de genética de Hongos del Dr. Eustaquio Sousa Dias de la Universidad Federativa de Lavras (Brasil).

Finalmente, se aplicaron las siguientes ecuaciones para el cálculo de glucanos totales ( $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos).

$$\text{Glucanos totales (\% p/p)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{p} \times \frac{162}{180}$$

$$\text{o } \Delta E \times \frac{F}{p} \times 90$$

$$\alpha\text{-Glucanos (\% p/p)} = \Delta E \times F \times 1000 \text{ (o 103)} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{p} \times \frac{162}{180}$$

$$\text{o } \Delta E \times \frac{F}{p} \times 90 \text{ (Volumen final de 100 ml)}$$

$$\text{o } \Delta E \times \frac{F}{p} \times 9,27 \text{ (Volumen final de 10,3 ml)}$$

$$\beta\text{-Glucanos} = \text{glucanos totales (+ oligómeros, etc.)} - \alpha\text{-glucanos (+ oligómeros, etc.)}$$

Donde,

$\Delta E$  = Absorbancia de la muestra – Absorbancia del blanco de reactivos

$F = \frac{\text{Factor para convertir Absorbancia a } \mu\text{g de D-glucosa}}{\text{Absorbancia de GOPOD para 100 } \mu\text{g de Standard D}}$

$100 / 0,1$  = Factor correctivo de volumen para contenido total de glucanos (se analizó 0,1 ml de 100 ml).

$103$  = Factor correctivo de volumen para el  $\alpha$ -glucano (0,1 ml de 10,3 ml fue analizado).

o

$1000$  = Factor correctivo de volumen para  $\alpha$ -glucano (0,1 ml de 100 ml fue analizado).

$1 / 1000$  = Conversión de  $\mu\text{g}$  a  $\text{mg}$ .

$1000 / p$  = Conversión de 100 mg de muestra (por ejemplo, como % p/p).

$p$  = Peso de las muestras analizadas.

$162 / 180$  = Factor de conversión de D-glucosa, como se determinó libre a anhidroglucosa, como sucede en  $\beta$ -glucanos.

### III.3 ENSAYOS *IN VITRO*

Las células tumorales presentan una notable capacidad proliferativa, generando sus propias señales de crecimiento, ignorando señales antiproliferativas y apoptóticas [161], y evadiendo el control del sistema inmune. Por ello, los estudios de viabilidad celular suelen ser los primeros ensayos por realizar para evaluar la actividad antitumoral de un compuesto.

#### III.3.1 Modelo experimental

El modelo experimental celular utilizado en los estudios *in vitro* fueron tres líneas celulares mamarias que se describen a continuación:

- MCF-7 (línea celular mamaria tumoral humana), proveniente de adenocarcinoma mamario humano, derivada de efusión pleural obtenida de pacientes con cáncer de mama metastásico. Expresa RE y RP [162].
- Línea Celular MCF-10A (línea celular mamaria normal humana), proveniente de glándula mamaria humana normal (no tumoral), negativa para receptores hormonales y HER2. Expresa marcadores del fenotipo basal epitelial [163].
- Línea Celular LM3 (línea celular mamaria tumoral murina), derivada de adenocarcinoma mamario metastásico de ratones hembra BALB/c. Carecen de receptores de estrógeno y progesterona [164]. Dicha línea celular fue gentilmente donada por la Dra. Elisa Bal del Instituto Roffo de Buenos Aires a nuestro grupo.

#### III.3.2 Cultivo de células mamarias

Las líneas celulares humanas, MCF-7 (tumoral mamaria) y MCF-10A (mamaria normal), fueron cultivadas en medio D-MEM:F12 (Dulbecco modified Eagle medium) (Gibco), suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB), conteniendo antibióticos penicilina/estroptomicina 10mg/ml, e insulina 10mg/l. Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad empleando para ello una estufa de cultivo marca Sanyo, modelo MCO 175 (Sanyo Electric, Osaka, Japón) (Fig. 6.3).



**Figura 6.3.** *Incubación celular.* La misma se realizó en una estufa de cultivo marca Sanyo, modelo MCO 175 (Sanyo Electric, Osaka, Japón), empleada para el cultivo de las líneas celulares mamarias humanas y murinas, empleando para ello una temperatura de 37°C en atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad.

A su vez, la línea tumoral mamaria murina LM3 fue cultivada en medio MEM (Minimum Essential medium) ((GIBCO Inc, Ca, USA), suplementado con 10 % v/v de SFB (Suero Fetal bovino), en presencia de los antibióticos penicilina/estroptomina 10 mg/ml, cultivada en estufa a 37°C, con atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad. El cultivo de las líneas celulares se realizó bajo condiciones de esterilidad en flujo laminar (Class 2 A/B3 Biological Safety Cabinet. Forma Scientific) previamente desinfectado con etanol 70% v/v y descontaminado por irradiación UV durante 15 minutos (Fig. 7.3).



**Figura 7.3.** *Manipulación de las líneas celulares en condiciones de esterilidad.* Se empleó una cabina de flujo laminar Class 2 A/B3 Biological Safety Cabinet. Forma Scientific, la cual se empleó para realizar el cultivo celular de las líneas mamarias humanas y murinas, bajo condiciones de esterilidad, previa desinfección con etanol 70% v/v y descontaminación con luz UV durante 15 minutos.

### III.3.3 Tratamiento de la línea tumoral MCF-7

Los cultivos de células tumorales mamarias humanas MCF-7 fueron tratados con:

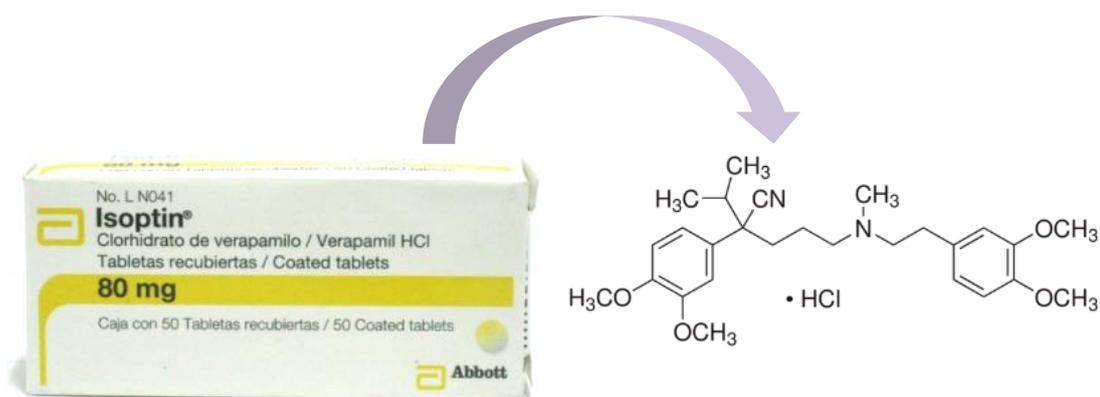
- **Maitake PRO4X.** Se administró una dosis equivalente a 367  $\mu\text{g}$   $\beta$ -glucanos/ml de medio (12,23  $\mu\text{l}$  de Maitake PRO4X/ml).

Nota: Dado que Maitake PRO4X posee una concentración de  $\beta$ -glucanos 4 veces superior a la de su antecesor Maitake Standard, 5 gotas de Maitake PRO4X equivalen a 20 gotas de Maitake Standard en cuanto a la concentración de  $\beta$ -glucanos (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3.** Concentración de  $\beta$ -glucanos del extracto glicoproteico de *Grifola frondosa* (Maitake). El producto Maitake PRO4X posee una concentración de  $\beta$ -glucanos cuatro veces superior a su antecesor comercial Maitake Standard, de modo que 5 gotas de Maitake PRO4X posee igual concentración de  $\beta$ -glucanos que 20 gotas de Maitake Standard.

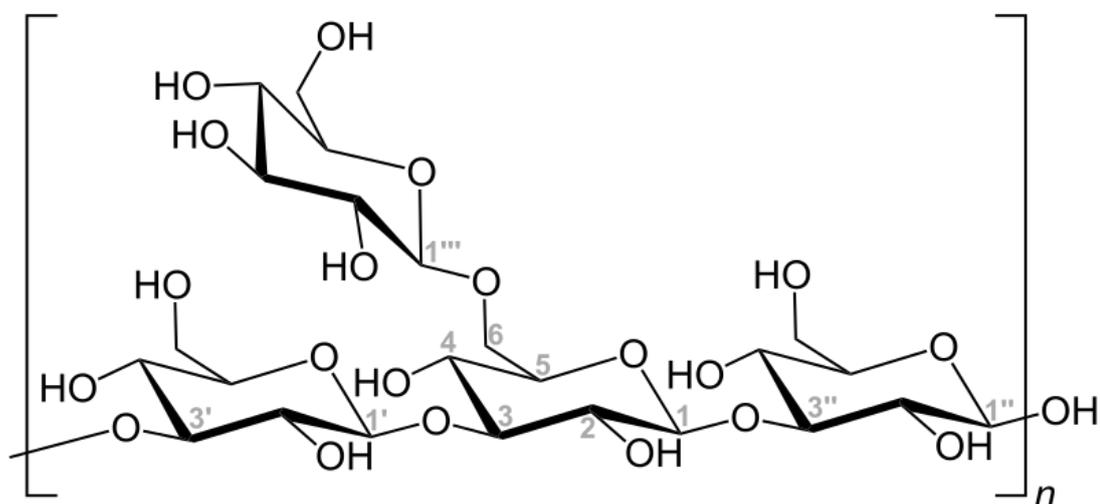
Maitake PRO4X			Maitake Standard		
Volumen de producto ( $\mu\text{l}$ )	Concentración de Fracción D (mg)	Concentración $\beta$ -glucanos ( $\mu\text{g}$ )	Volumen de producto ( $\mu\text{l}$ )	Concentración de Fracción D (mg)	Concentración $\beta$ -glucanos ( $\mu\text{g}$ )
1 $\mu\text{l}$	0,1 mg	30 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{l}$	0,025 mg	7,5 $\mu\text{g}$
50 $\mu\text{l}$ (1 gota)	5 mg	1500 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{l}$ (1 gota)	1,25 mg	375 $\mu\text{g}$
250 $\mu\text{l}$ (5 gotas)	25 mg	7500 $\mu\text{g}$	250 $\mu\text{l}$ (5 gotas)	6,25 mg	1875 $\mu\text{g}$
500 $\mu\text{l}$ (10 gotas)	50 mg	15000 $\mu\text{g}$	500 $\mu\text{l}$ (10 gotas)	12,5 mg	3750 $\mu\text{g}$
1000 $\mu\text{l}$ (20 gotas)	100 mg	30000 $\mu\text{g}$	1000 $\mu\text{l}$ (20 gotas)	25 mg	7500 $\mu\text{g}$
3000 $\mu\text{l}$ (60 gotas)	300 mg	90000 $\mu\text{g}$			

- **Verapamilo.** Se preparó una suspensión acuosa de Verapamilo 2 % m/v. Para ello, se mortearon tres comprimidos de 80 mg de una marca comercial hasta fino polvo (Fig. 8.3), los cuales se suspendieron en volumen final de 12 ml de agua destilada. Se empleó 36,7  $\mu\text{l}$  suspensión/ml de medio, equivalente a 734  $\mu\text{g}$  Verapamilo/ml.



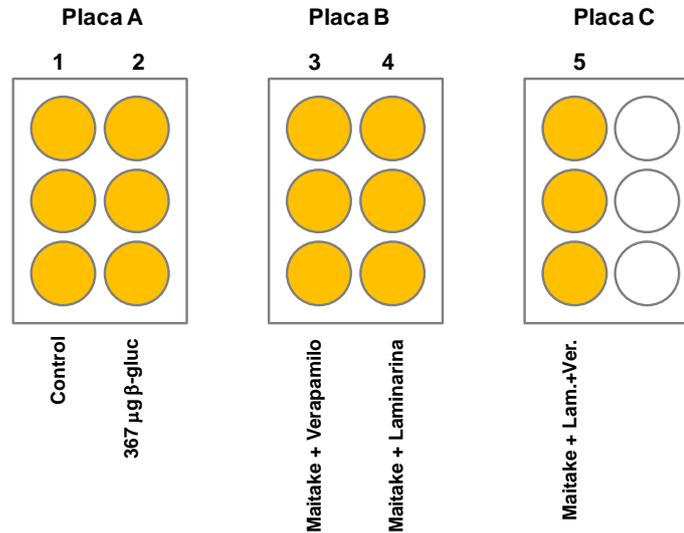
**Figura 8.3.** Verapamilo, fármaco inhibidor de canales de calcio. Se indica la presentación comercial Isoptino 80 mg (izquierda) y su estructura química (derecha). Empleamos una concentración de 36,7  $\mu\text{l}$  suspensión/ml de medio de cultivo, esto es 734  $\mu\text{l}$  verapamilo/ml, a fin de lograr el bloqueo de los canales de calcio tipo L voltaje dependientes en células tumorales mamarias humanas de la línea MCF-7.

➤ **Laminarina.** Se empleó Laminarina (Santa Cruz) (Fig. 9.3), derivada de *Laminaria Digitata*. Para ello, se realizó una dilución acuosa al 2 % m/v, empleando en la incubación celular una concentración de 0,5  $\mu\text{l}$  disolución/ml de medio, esto es 10  $\mu\text{g}$  Laminarina/ml de medio de cultivo [165-167].



**Figura 9.3.** Estructura química del polisacárido Laminarina. Dicha sustancia deriva de *Laminaria digitata*. Para la incubación celular, empleamos una concentración de 10  $\mu\text{g}$  suspensión /ml de medio de cultivo, a fin de conseguir el bloqueo de los receptores transmembrana Dectina-1 en células tumorales mamarias humanas MCF-7.

**Condiciones de ensayo.** Un total de  $5 \times 10^4$  células/well de la línea celular tumoral MCF-7 fueron sembradas con 5 ml de medio DMEM:F12 en una placa de 6 pocillos. La siembra se realizó por triplicado, empleándose tres placas de 6 pocillos, en un total de 15 wells (Fig. 10.3).



**Figura 10.3.** Tratamiento de la línea celular tumoral mamaria humana MCF-7. Las células crecieron hasta alcanzar el 70-90% de confluencia, y se diseñaron cinco grupos experimentales por triplicado, incluyendo tratamientos con Maitake PRO4X, verapamilo y Laminarina.

Las células crecieron hasta alcanzar una confluencia del 70-90% a 37° C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad; posteriormente se privaron de SFB por 24 h. Las células en crecimiento fueron observadas con un microscopio óptico binocular marca Arcano (Fig. 11.3)



**Figura 11.3.** Microscopio óptico. Se empleó un microscopio binocular marca Arcano para observar el crecimiento celular de la línea MCF-7 en cultivos in vitro. Las células crecieron hasta alcanzar el 70-90% de confluencia, y se diseñaron cinco grupos experimentales por triplicado.

En estas condiciones (Fig. 12.3), se procedió a tratar los cultivos con los productos indicados en la Fig. 10 durante 24 h, quedando establecidas las siguientes condiciones:

**Condición 1.** Control: 0  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake PRO4X.

**Condición 2.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X.

**Condición 3.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos + 734  $\mu\text{g/ml}$  de Verapamilo.

**Condición 4.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos + 200  $\mu\text{g/ml}$  de Laminarina.

**Condición 5.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos + 734  $\mu\text{g/ml}$  de Verapamilo + 200  $\mu\text{g/ml}$  Laminarina.



**Figura 12.3.** Células tumorales MCF-7 (40X). La microfotografía ilustra que las células se hallan al 80% de confluencia, observadas al microscopio óptico. A partir del crecimiento celular, se diseñaron varios grupos experimentales de tratamiento, entre ellos con Maitake, Verapamilo y Laminarina.

En otro ensayo experimental *in vitro*, células MCF-7 en cultivo fueron incubadas por 24 h tratadas con concentraciones crecientes del extracto glicoproteico de Maitake Standard, quedando establecidas las siguientes condiciones:

**Condición 1.** Control: 0  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.

**Condición 2.** 18,3  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard.

**Condición 3.** 36  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard.

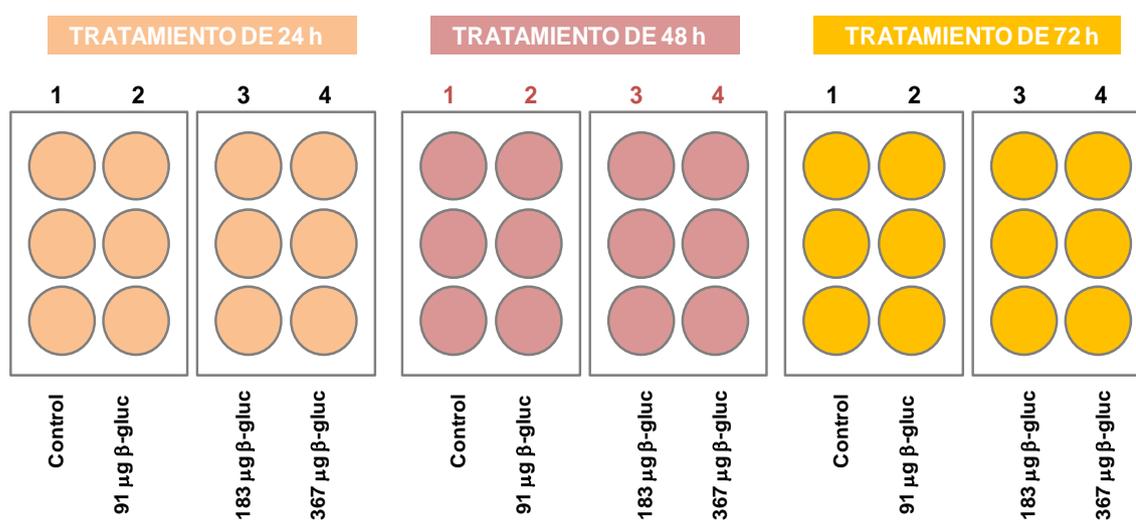
**Condición 4.** 91  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard.

**Condición 5.** 183  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard.

**Condición 6.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard.

### III.3.4 Tratamiento de la línea mamaria normal MCF-10A

Un total de  $5 \times 10^4$  células/well de la línea mamaria normal humana MCF-10A fueron sembradas con 5 ml de medio de cultivo DMEM:F12 en una placa de 6 wells. La siembra se realizó por triplicado, y el tratamiento se realizó a tres tiempos diferentes (24 h, 48 h y 72 h), empleándose un total de 6 placas de 6 pocillos, en total 36 wells para todo el ensayo (Fig. 13.3).



**Figura 13.3.** Ensayo con la línea celular mamaria normal humana MCF-10A. Las células crecieron hasta alcanzar el 70-90% de confluencia, siendo incubadas por 24 horas, 48 horas y 72 horas con concentraciones crecientes del extracto glicoproteico de Maitake PRO4X. El ensayo se realizó por triplicado.

Las células se incubaron hasta alcanzar 70-90% de confluencia, a 37° C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad; posteriormente se privaron de SFB por 24 h. Luego del crecimiento (Fig. 14.3), se procedió a tratar los cultivos con concentraciones crecientes del extracto glicoproteico de Maitake PRO4X, quedando establecidas las siguientes condiciones:

#### Placa 1: Tratamiento por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X

**Condición 1.** Control: 0 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 2.** 91 µg /ml de medio de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 3.** 183 µg /ml de medio de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 4.** 367 µg /ml de medio de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

Placa 2: Tratamiento por 48 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X

**Condición 1.** Control: 0  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 2.** 91  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 3.** 183  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 4.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

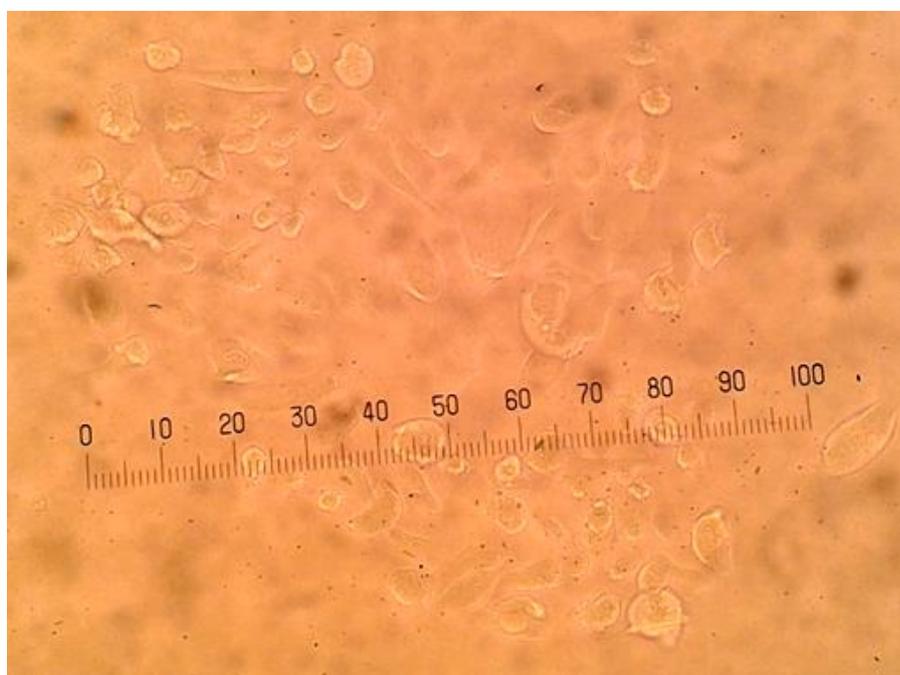
Placa 3: Tratamiento por 72 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X

**Condición 1.** Control: 0  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 2.** 91  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

**Condición 3.** 183  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

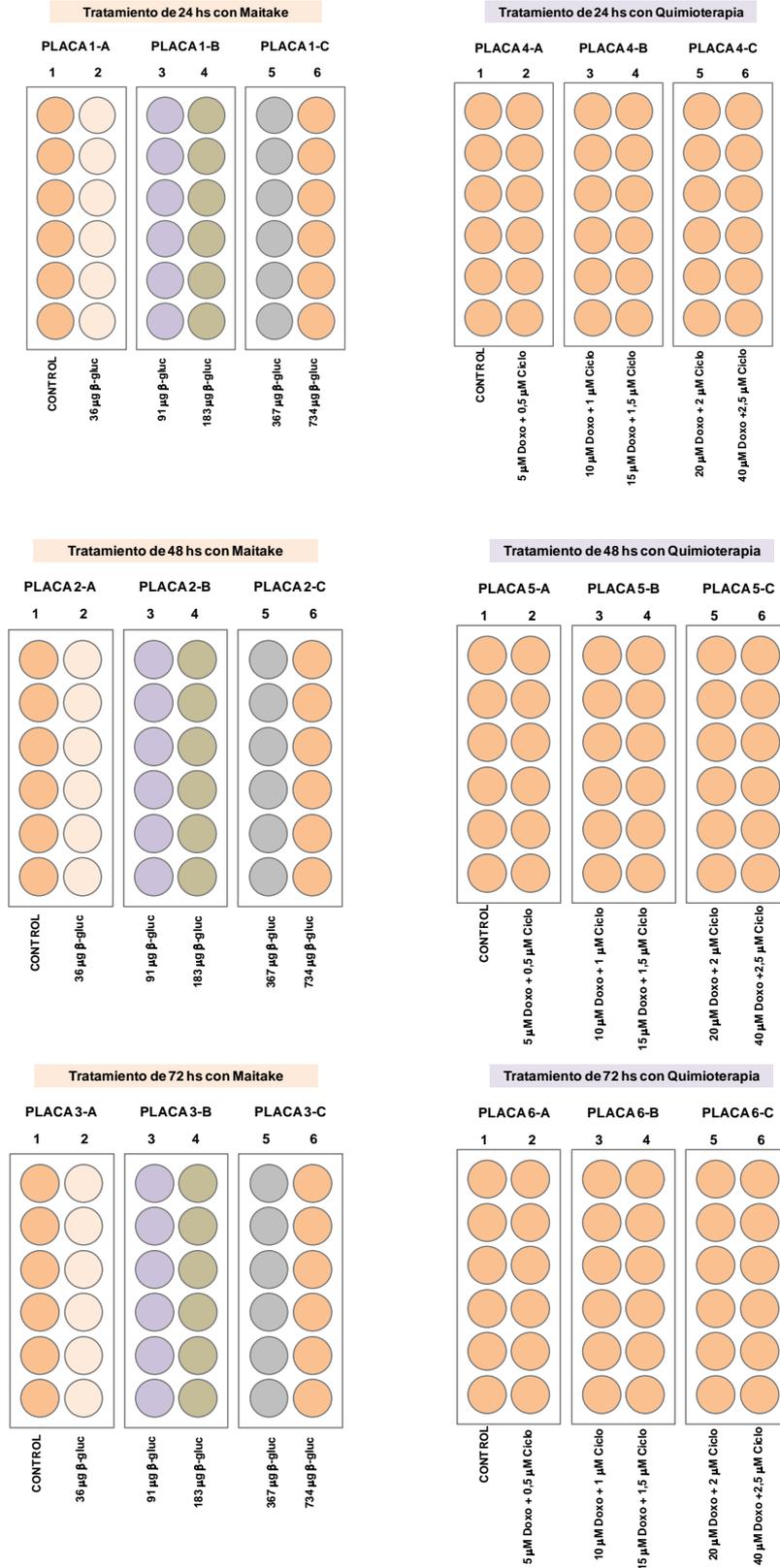
**Condición 4.** 367  $\mu\text{g/ml}$  de medio de  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.



**Figura 14.3.** Microfotografía de células mamarias humanas normales MCF-10A. Las mismas se hallaban al 80% de confluencia vistas con microscopio óptico (40X). A partir del crecimiento celular, se diseñaron varios grupos experimentales con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X.

### III.3.5 Tratamiento de la línea tumoral murina LM3

En placa de 12 wells fueron sembradas, con medio MEM,  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, correspondientes a la línea celular mamaria tumoral murina LM3. La siembra se realizó por duplicado, y se ensayaron tres tiempos diferentes (24 h, 48 h y 72 h), empleándose en total 18 placas de 12 pocillos cada una (Fig. 15.3).



**Figura 15.3.** Ensayo de la línea celular tumoral mamaria murina LM3. Realizado por duplicado. Las células crecieron hasta 70-90% de confluencia, siendo incubadas por 24 h, 48 h y 72 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X y quimioterapia (doxorubicina + ciclofosfam.).

Las células se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 70-90% a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad. Luego del crecimiento (Fig. 16.3), se realizó el conteo manual de las células sembradas en cada well, a fin de establecer % de viabilidad y % de muerte de cada pocillo. Inmediatamente se procedió a tratar los cultivos con Maitake y quimioterapia, estableciendo las siguientes condiciones:

Placa 1: Tratamiento por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X

- Condición 1.** Control: 0 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 2.** 36 µg /ml de medio de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 3.** 91 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 4.** 183 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 5.** 367 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 6.** 734 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

Placa 2: Tratamiento por 48 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X

- Condición 1.** Control: 0 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 2.** 36 µg /ml de medio de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 3.** 91 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 4.** 183 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 5.** 367 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 6.** 734 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

Placa 3: Tratamiento por 72 h con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X

- Condición 1.** Control: 0 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 2.** 36 µg /ml de medio de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 3.** 91 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 4.** 183 µg/ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 5.** 367 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.
- Condición 6.** 734 µg /ml de β-glucanos de Fracción D de Maitake PRO4X.

Placa 4: Tratamiento por 24 h con concentraciones crecientes de Quimioterapia

- Condición 1.** Control: 0 µM Doxorrubicina + 0 µM Ciclofosfamida.
- Condición 2.** 5 µM Doxorrubicina + 0,5 µM Ciclofosfamida.
- Condición 3.** 10 µM Doxorrubicina + 1 µM Ciclofosfamida.
- Condición 4.** 15 µM Doxorrubicina + 1,5 µM Ciclofosfamida.
- Condición 5.** 20 µM Doxorrubicina + 2 µM Ciclofosfamida.
- Condición 6.** 40 µM Doxorrubicina + 2,5 µM Ciclofosfamida.

Placa 5: Tratamiento por 48 h con concentraciones crecientes de Quimioterapia

**Condición 1.** Control: 0  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 0  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 2.** 5  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 0,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 3.** 10  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 1  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 4.** 15  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 1,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 5.** 20  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 2  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 6.** 40  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 2,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

Placa 6: Tratamiento por 72 h con concentraciones crecientes de Quimioterapia

**Condición 1.** Control: 0  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 0  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

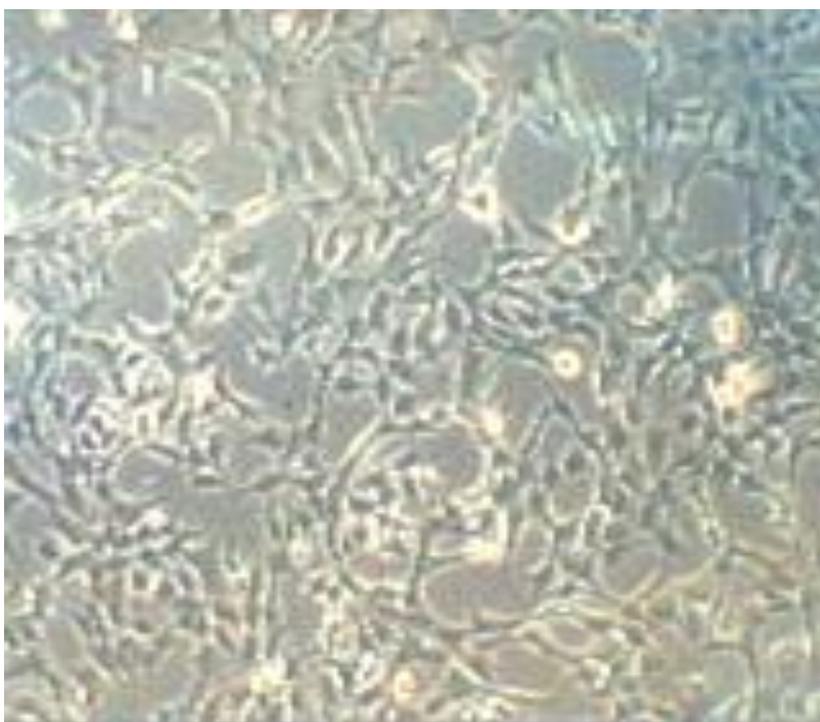
**Condición 2.** 5  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 0,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 3.** 10  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 1  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 4.** 15  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 1,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

**Condición 5.** 20  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 2  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.

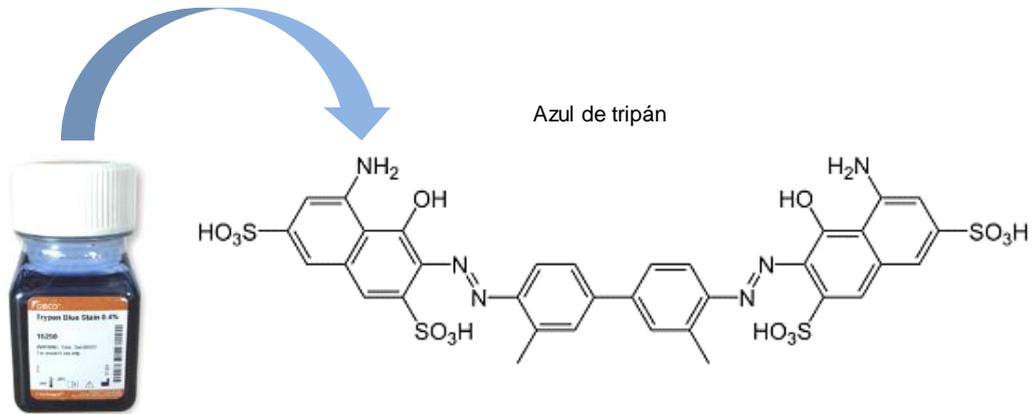
**Condición 6.** 40  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 2,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida.



**Figura 16.3.** Microfotografía de células mamarias tumorales murinas LM3. Las mismas se hallaban al 80% de confluencia vistas con microscopio óptico (40X). A partir del crecimiento celular, se diseñaron grupos experimentales por duplicado, con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X y quimioterapia.

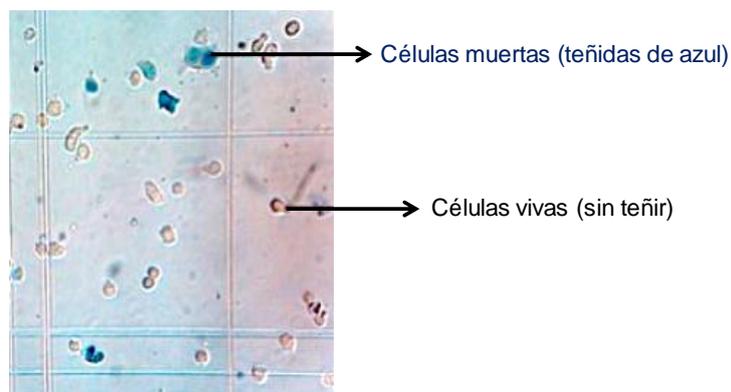
### III.3.6 Cuantificación de muerte celular por el método azul de tripán

Para cuantificar muerte celular, empleamos el colorante *azul de tripán*, un derivado de la toluidina (Fig.17.3) que se emplea en tinciones histológicas. Permite diferenciar células vivas de muertas, para lo cual tiñe a éstas últimas color azul (Ehrlich, 1904).



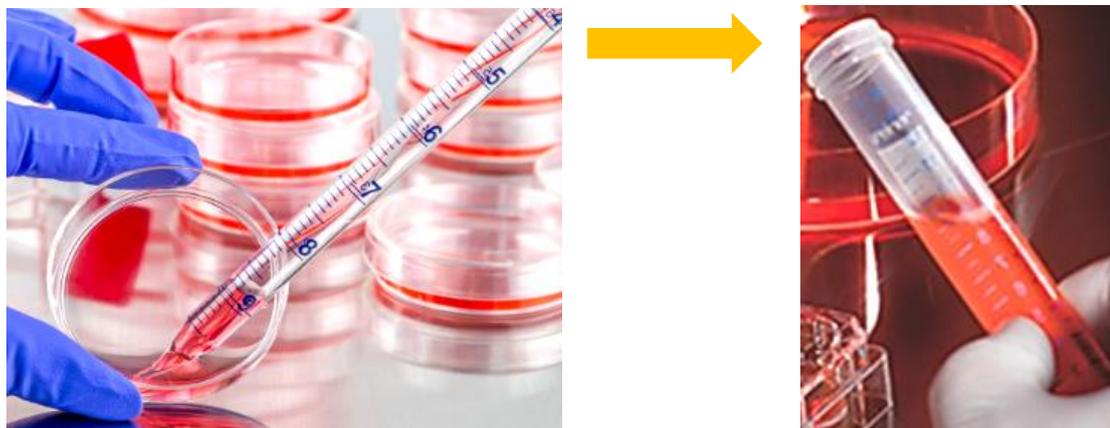
**Figura 17.3.** Colorante azul de tripán. Se indica la estructura química del mismo (derecha). Este representa un método de exclusión que permite diferenciar células muertas de vivas, ya que estas últimas poseen membrana celular intacta que por su permeabilidad selectiva bloquea el paso del colorante e impide que sean teñidas de azul.

El método no diferencia muerte celular necrótica de apoptótica, pero sí células vivas de muertas, ya que las primeras poseen membrana celular intacta que por su permeabilidad selectiva bloquea el paso del colorante. Por esta razón, el método se conoce también como *tinción por exclusión*. En cambio, en células muertas, el colorante atraviesa la membrana deteriorada tiñendo las células de color azul (Fig. 18.3) [168-170].



**Figura 18.3.** Microfotografía de células teñidas con azul de tripán. El mismo es un método de exclusión que permite diferenciar células muertas de vivas, ya que estas últimas poseen membrana celular intacta que por permeabilidad selectiva bloquea el paso del colorante e impide la tinción azul.

Tras finalizar la incubación de los cultivos con las sustancias ensayadas, se procedió a recuperar el medio de cultivo del well en un tubo falcon (Fig. 19.3).

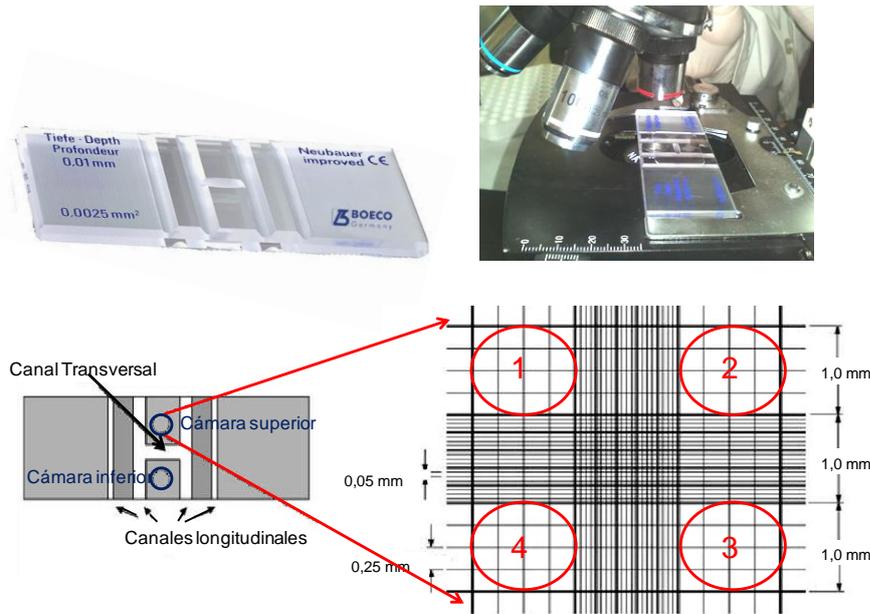


**Figura 19.3.** *Recuperación de medio de cultivo tratado.* El desprendimiento celular como parte del ensayo, implicó el agregado de la enzima tripsina, y posterior inactivación de esta, para seguidamente recuperar el medio de cultivo en un tubo falcon.

Posteriormente, se procedió a desprender las células del well mediante el agregado de 500  $\mu$ l de Tripsina fresca 0,25% + EDTA 0,02%. Tripsina es una enzima peptidasa, que hidroliza los enlaces peptídicos de proteínas, permitiendo obtener aminoácidos y péptidos más pequeños. La solución de tripsina, a las concentraciones indicadas, rompe las fibras de colágeno que unen las células al plástico de cada well en los cultivos, causando desprendimiento celular.

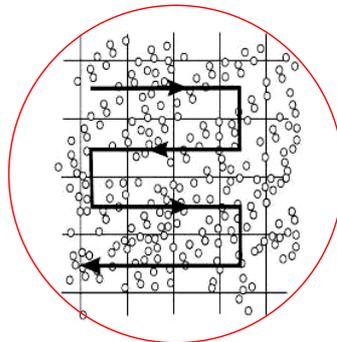
Al verificar bajo lupa signos de levantamiento de la monocapa celular, se procedió a inactivar la Tripsina mediante el agregado de 1 ml de medio fresco de cultivo, permitiendo recuperar células desprendidas para poder ser transferidas al tubo falcon que poseía el medio inicialmente colectado. Luego, se sometió a centrifugación por 10 min a 2300 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 500  $\mu$ l de PBS, a fin de lavar. De la suspensión celular, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ l para ser tratada con 50  $\mu$ l de la solución azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich) [171]. El resto de la suspensión celular se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, se cuantificó muerte celular por recuento al microscopio óptico, expresando el número de células muertas con respecto al control de cada condición ensayada. Se tomó por duplicado 10  $\mu$ l de suspensión teñida con azul de tripan y se la colocó en cámara de Neubauer para el conteo. La cámara de Neubauer consiste en una placa de cristal de 3 cm de ancho x 7 cm de largo y 0,4 cm de grosor, y dos zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal (Fig. 20.3).



**Figura 20.3.** Cámara de Neubauer. Se esquematiza la cámara de Neubauer (izquierda) y las zonas de conteo por 4 (derecha). La misma consiste en una placa de cristal de 3 cm de ancho x 7 cm de largo y 0,4 cm de grosor, y dos zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal. La imagen consignada fue adaptada de <https://image.slidesharecdn.com/camaraderecuentoneubauer-120723124533-phpapp02/95/camara-de-recuento-neubauer-4-728.jpg?cb=1343047593>

Tras ubicar el cubreobjetos encima de la cámara de Neubauer, se colocó 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en ambas zonas de conteo, tomando la precaución de no generar burbujas. Se observó al microscopio óptico la presencia de células vivas (refringentes) y células muertas (teñidas con azul de tripán), recorriendo en zig-zag cada uno de los 4 cuadrantes externos para su conteo (Fig. 21.3). Posteriormente, se realizó un promedio del número de células/cuadrante y se multiplicó por  $1 \times 10^4$  para calcular el número de células/ml de medio. Se estableció el porcentaje de muerte celular de cada condición.

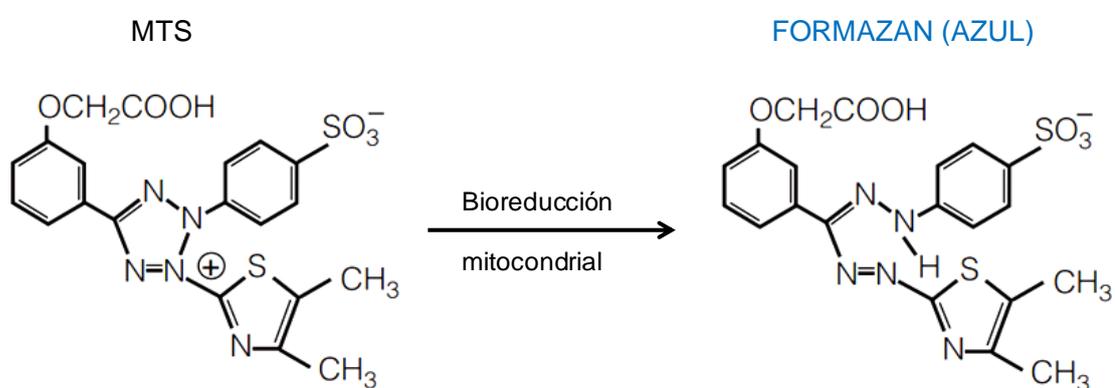


**Figura 21.3.** Recuento celular. El mismo se realizó mediante recorrido en zig-zag en cámara de Neubauer. Luego del conteo, se promedió el número de células/cuadrante y se multiplicó por  $1 \times 10^4$  para calcular el número de células/ml de medio, quedando establecido el porcentaje de muerte celular para cada condición ensayada.

### III.3.7 Cuantificación de viabilidad celular por el método MTS

La viabilidad de células tumorales mamarias humanas de la línea MCF-7 post tratadas durante 24 h con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard, se determinó empleando el test colorimétrico *Cell Titer 96® Aqueous ONE* (Promega, Madison, USA), para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante.

La prueba contiene un compuesto tetrazolio, MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)] y un reactivo aceptor de electrones (PES, etosulfato de fenazina). El MTS es biorreducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células tumorales metabólicamente activas a formazan (color azul), soluble en el medio de cultivo (Fig. 22.3).



**Figura 22.3.** Cuantificación de viabilidad celular. La misma se realizó por el método MTS de biorreducción mitocondrial, que se usó para cuantificar la viabilidad de células tumorales mamarias humanas de la línea MCF-7 post tratadas durante 24 h con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard. El MTS es biorreducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células tumorales metabólicamente activas a formazan (color azul), soluble en el medio de cultivo.

Posteriormente, se agregó una pequeña cantidad de reactivo *CellTiter 96® Aqueous One* a los wells de cultivo de las células MCF-7 post tratadas con Maitake. El reactivo fue incubado de 1 h a 4 h según las instrucciones del fabricante, al cabo del cual se registró la absorbancia a 490 nm. La cantidad de producto formazán obtenido, medido a 490 nm, fue directamente proporcional al número de células viables MCF-7 en cultivo [172-173]. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo al del grupo Control, al cual se consideró como 100% de viabilidad.

### III.3.8 Estudio de viabilidad y muerte celular por microscopía Time-Lapse

El efecto inductor de muerte de células tumorales por los  $\beta$ -glucanos de Maitake, se investigó mediante un microscopio Time-Lapse (Fig. 23.3) de cámara rápida. Este instrumento permitió realizar una monitorización continua del comportamiento e interacción dinámica de los cultivos de células tumorales mamarias MCF-7 tratados por 24 h con dosis crecientes de Maitake Standard [174].

Mediante el sistema time-lapse, se obtuvieron imágenes microscópicas (con una amplificación 20X), a intervalos preprogramados de 10 min durante 24 h. Las mismas luego se montaron para generar una secuencia de video que permitió obtener datos morfológicos, dinámicos y cuantitativos [175].

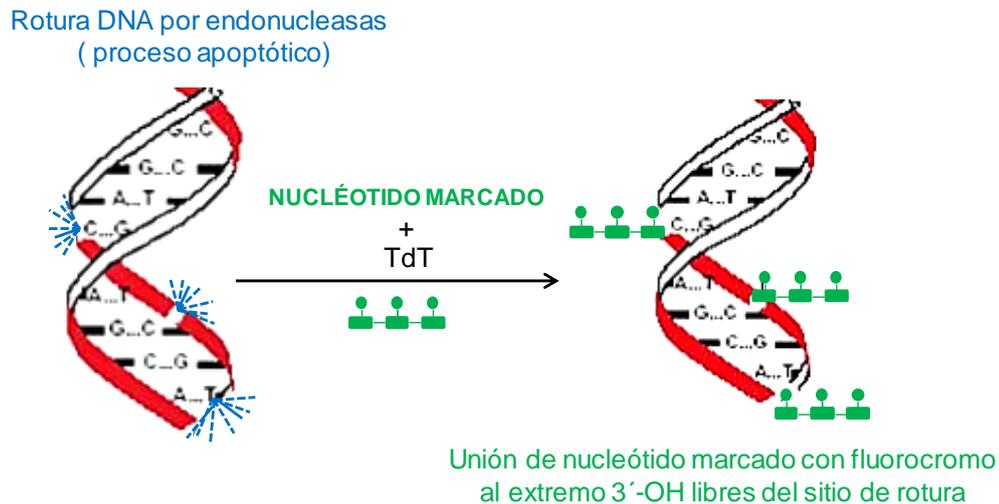


**Figura 23.3.** *Microscopio time-lapse.* El mismo permitió la monitorización de cultivos de células tumorales MCF-7 tratadas por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake Standard. Para ello se tomaron microfotografías a intervalos preprogramados de diez minutos durante 24 h, obteniéndose una secuencia de video de la cual se extrajeron datos morfológicos, dinámicos y cuantitativos.

### III.3.9 Cuantificación de apoptosis celular por el método enzimático TUNEL

La cuantificación del efecto apoptótico de células tumorales mamarias MCF-7 tratadas por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake Standard, se determinó mediante el ensayo enzimático TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) [176], para lo cual se empleó el kit *In situ Cell Death Detection* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Se trata de un kit de marcaje *in situ* de DNA fragmentado, que se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

La reacción enzimática TUNEL marca preferentemente roturas de la hebra de DNA internucleosomal, típico de apoptosis, permitiendo discriminar células apoptóticas de no apoptóticas. Los extremos 3'-OH libres generados por fragmentación de DNA en apoptosis, pueden incorporar nucleótidos marcados con un fluorocromo (fluoresceína) en ambos extremos mediante la acción de la enzima Transferasa deoxinucleotidil Terminal (TdT) (Fig. 24.3).



**Figura 24.3.** Cuantificación de apoptosis celular por el método enzimático TUNEL. El gráfico detalla la marcación fluorescente de los extremos 3'-OH libres de los sitios de rotura de DNA internucleosomal típico del proceso apoptótico, mediante la acción de la enzima Transferasa deoxinucleotidil Terminal (TdT).

La inmunofluorescencia se incrementa con el mayor número de roturas en la cadena de DNA [177], siendo detectada mediante un microscopio óptico de fluorescencia (Olympus, BH-2, UK) (Fig. 25.3) [178-179].

Los núcleos fueron teñidos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Se evaluó el porcentaje de núcleos teñidos con TUNEL (apoptóticos) en relación con cada núcleo teñido con DAPI (viables). El % células teñidas se obtuvo

por recuento de células teñidas con TUNEL (verde) dividido por el número total de núcleos teñidos con DAPI (azul), en una magnificación de 200.



**Figura 25.3.** *Microscopio óptico de fluorescencia.* El mismo es de la marca Olympus, BH-2, UK, y se empleó para detectar la inmunofluorescencia generada por la rotura de las hebras de DNA internucleosomal durante el proceso apoptótico de células tumorales mamarias tratadas con Maitake Standard .

### III.3.10 Análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados obtenidos fueron expresados como valor medio ( $\bar{X}$ ). La variabilidad se indicó como desvío estándar (D.S) intraensayo de un mínimo de tres réplicas independientes. Las diferencias entre los valores medios se evaluaron mediante la prueba T' de Student, considerándose estadísticamente significativos con  $p \leq 0,05$  [169], y muy significativas con  $p \leq 0,01$ .

### III.4 ENSAYOS *IN VIVO*

#### III.4.1 Modelo experimental

El modelo experimental empleado en los ensayos *in vivo* estuvo representado por ratones albinos de la cepa BALB/c (Fig. 26.3), de ambos sexos, con 6-8 semanas de edad, y un peso comprendido entre 19 g - 25 g, adquiridos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) de la UCA-CONICET. Se trabajó con cepas endocriadas (población consanguínea, cruce de animales con alto grado de parentesco) a fin de mantener la mayor homocigosidad posible y uniformidad fenotípica. A mayor número de generaciones en las que se cruzan parientes cercanos, mayor grado de homocigosidad, e individuos con alta uniformidad genética para la investigación.



**Figura 26.3.** *Modelo experimental murino.* El mismo se utilizó para los ensayos *in vivo*, y está representado por ratones albinos de la cepa BALB/c. Se utilizaron animales de ambos sexos, con 6-8 semanas de edad, y un peso comprendido entre 19 g - 25 g, adquiridos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) de la UCA-CONICET. Imagen tomada de <http://www.taconic.com/images/balb-c-inbred-mouse-model.jpg>.

#### III.4.2 Mantenimiento del modelo experimental

Los ratones fueron mantenidos en cajas plásticas transparentes con atmósfera controlada y aire filtrado HEPA, agrupados según el sexo, en un cuarto a temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C, humedad  $60 \pm 10$  %, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h-12 h, observando que todas las cajas reciban la misma intensidad de luz (Fig. 27.3).

La alimentación fue suministrada en forma de pellets, y el agua de red apta para consumo humano, se administró a través de un sistema de bebederos automáticos. El acceso al agua y los alimentos fue *ad libitum*.



**Figura 27.3.** *Mantenimiento del modelo experimental.* Los ratones albinos de la cepa BALB/c empleados en los protocolos experimentales fueron mantenidos en cajas plásticas de atmosfera controlada y aire filtrado HEPA en el bioterio de BIOMED-UCA-CONICET (CABA).

El cuidado y la manipulación de los ratones se realizó de acuerdo con los lineamientos Institucionales de buenas prácticas para el trabajo con animales de laboratorio, siguiendo principios éticos establecidos en los lineamientos internacionales aprobados por el CICUAL (Comité Institucional para el cuidado y Uso de animales de Laboratorio) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-CONICET) de la Universidad Católica Argentina (UCA) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA).

Los animales tuvieron inspección clínica diaria, previo al inicio del experimento y durante el transcurso de este. Fueron individualizados mediante marcación con fibra indeleble de color en la base de la cola, a fin de no generarles incomodidad o dolor alguno. La manipulación estuvo a cargo del mismo operador, con el objeto de reducir la angustia o estrés del animal, evitándose usar perfumes o fragancias desodorizantes. Se procuró trabajar con el menor ruido posible.

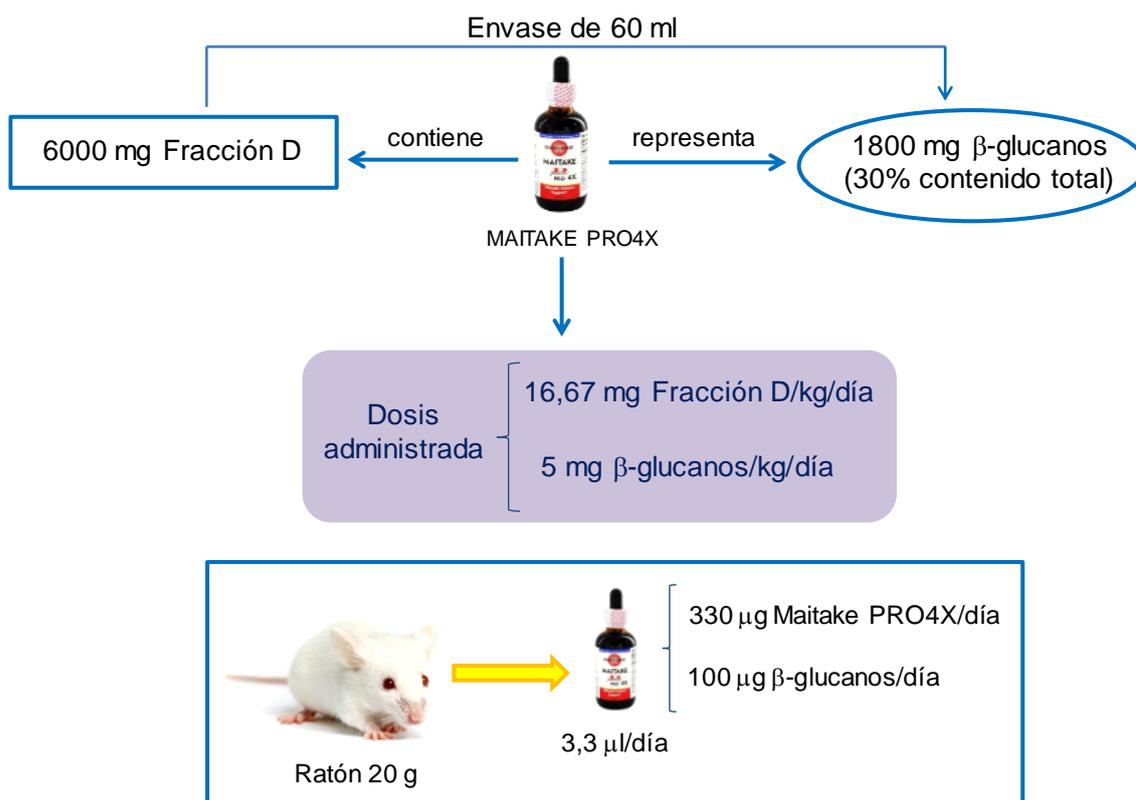
### III.4.3 Administración oral del extracto purificado de *Grifola frondosa*

El extracto glicoproteico Fracción D de Maitake PRO4X rico en  $\beta$ -glucanos, se mantuvo en heladera hasta el momento de su empleo. Su administración oral en ratones se realizó mediante micropipeta del siguiente modo: con una mano se tomó al animal por la cola para sacarlo de la jaula y se lo colocó sobre la rejilla permitiéndole sujetarse con las patas delanteras. Con la mano libre se lo levantó tomándolo por la piel detrás del cuello con los dedos índice y pulgar. A continuación, se lo volteó para introducir el tip en la cavidad bucal con micropipeta, y se descargó el contenido lentamente, a intervalos regulares de tiempo, a fin de que el animal pueda tragar el extracto, se recupere y colabore con la administración oral. Finalmente, se lo devolvió a la jaula (Fig. 28.3).



**Figura 28.3.** Manipulación del modelo experimental murino. Las fotografías ilustran la administración oral de sustancias. Los ratones albinos de la cepa BALB/c fueron tomados de la cola para ser retirados de su jaula y colocados sobre la rejilla permitiéndoles sujetarse con las patas traseras, para luego recibir la sustancia de ensayo mediante micropipeta de 200  $\mu$ l.

La dosis oral del extracto que se administró a los animales varió según el ensayo realizado, pero osciló entre los 5 mg/kg y los 16,67 mg/kg de Maitake (equivalente a 5 mg/kg  $\beta$ -glucanos). Considerando un peso corporal medio de 20 g/ratón, se administró un volumen entre 1  $\mu$ l y 3,3  $\mu$ l de extracto glicoproteico de Maitake líquido/ratón (Fig. 29.3).

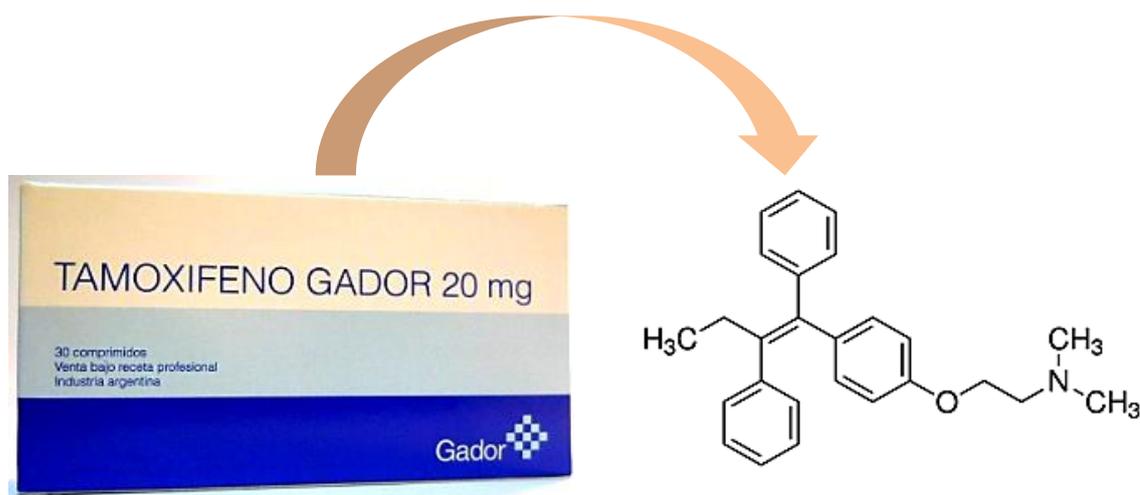


**Figura 29.3.** Dosis administrada de Maitake PRO4X. La concentración de β-glucanos administrada a ratones BALB/c fue de 5 mg de β-glucanos/kg/día, por la cual el volumen de extracto ingerido varió en función del peso corporal del animal.

#### III.4.4 Administración oral de Tamoxifeno

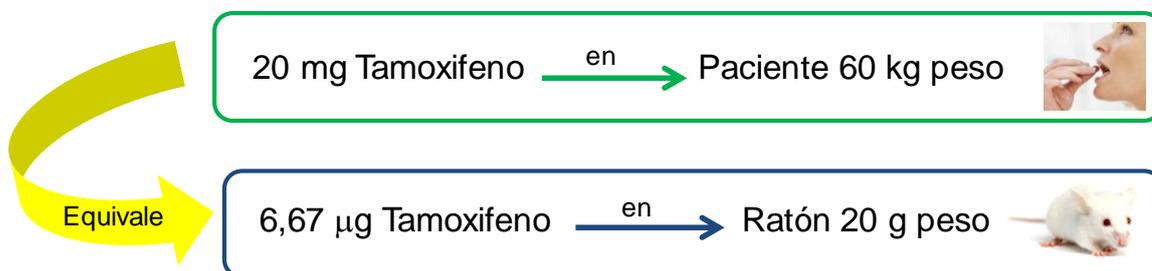
El ensayo de prevención tumoral con Citrato de Tamoxifeno requirió la suspensión de la droga en un vehículo de administración oral adecuado. Este vehículo consistió en una disolución acuosa de etanol y glicerina en la proporción empírica: 1 (agua): 1 (etanol): 2,8 (glicerina), con el fin de conseguir la máxima disolución posible del compuesto y optimizar su palatabilidad y colaboración por parte del animal para la ingesta oral. El vehículo se preparó en forma periódica y se conservó en heladera hasta el momento de su administración.

Para preparar la suspensión de Tamoxifeno, se mortereó un comprimido comercial de 20 mg (Fig. 30.3) hasta pulverización completa (fase dispersa) y se procedió a suspenderlo en un volumen final de 24 ml de vehículo acuoso etanólico glicerinado (fase dispersante), en concentración 0,083 % m/v.



**Figura 30.3.** Agente antiestrogénico Tamoxifeno. Se indica la estructura química del compuesto (derecha) y su presentación comercial de 20 mg (izquierda). El compuesto administrado a los ratones como parte de los ensayos de prevención tumoral, requirió su suspensión en un vehículo de administración oral adecuado en concentración 0,083% m/v.

La suspensión de tamoxifeno se mantuvo a resguardo de la luz, en heladera, hasta el momento de su administración. La dosis para animales se estableció por extrapolación a la de humanos, según el cálculo (Fig. 31.3) que se indica a continuación:



**Figura 31.3.** Administración de la dosis de Tamoxifeno en el modelo experimental murino. La dosis se calculó por extrapolación de la dosis de administración en humanos, quedando establecida una concentración de 6,67 µg de droga para un animal de 20 g de peso corporal.

Para la administración en el modelo experimental murino, fueron pipeteados 8 µl de suspensión de droga al 0,083% m/v -correspondiente a 6,67 µg de Tamoxifeno-, que se llevaron a volumen final de 16 µl con agua destilada, para la administración oral.

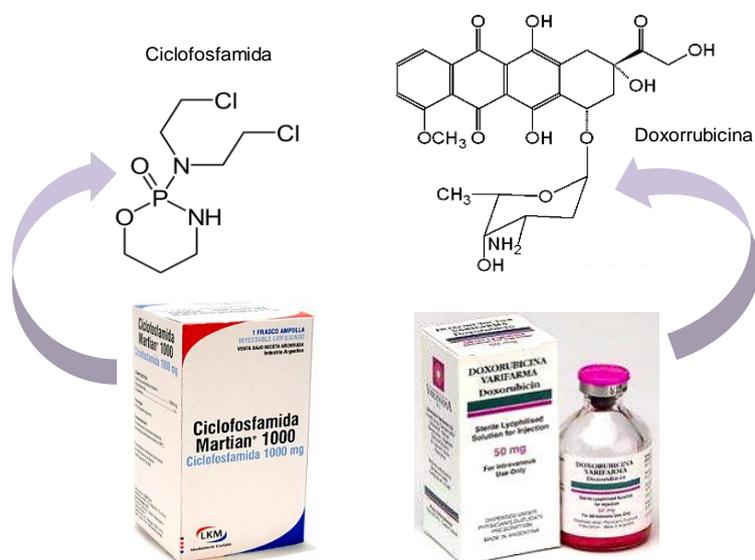
### III.4.5 Administración oral de Verapamilo

La administración oral de Verapamilo requirió la suspensión de la droga en un vehículo adecuado para facilitar su administración oral en animales. Dicho vehículo consistió en una disolución acuosa al 10% de glucosa, con el fin de mejorar la palatabilidad de la droga y promover la colaboración del ratón durante la ingesta. La preparación de la suspensión requirió morterear tres comprimidos comerciales de 80 mg hasta pulverización (fase dispersa) y suspenderlos en un volumen final de 12 ml de vehículo (fase dispersante), en concentración 2 % p/v (Fig. 8.3). La misma se mantuvo a resguardo de la luz, en heladera hasta el momento de su utilización. Como dosis de administración, se estableció 200  $\mu\text{g}$ /ratón de Verapamilo [170].

Para la administración de 200  $\mu\text{g}$ /ratón de Verapamilo, se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de Verapamilo -correspondiente a 200  $\mu\text{g}$  de droga- que fueron administrados diariamente a fin de inducir bloqueo de canales cálcicos tipo L voltaje-dependientes.

### III.4.6 Administración oral de quimioterapia

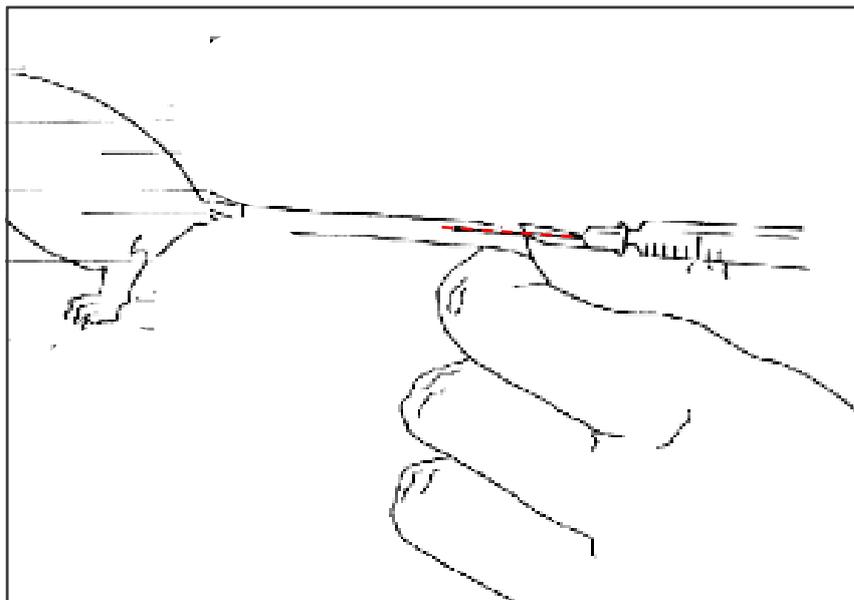
El ensayo de quimioterapia en ratones implicó la administración de las drogas ciclofosfamida y doxorrubicina (Fig. 32.3), para lo cual se preparó una disolución acuosa de las mismas, ello a fin de facilitar su administración oral. Los ratones recibieron semanalmente Doxorrubicina 4 mg/kg peso + Ciclofosfamida 80 mg/kg peso administradas en un volumen final total de 100  $\mu\text{l}$ .



**Figura 32.3.** Agentes quimioterápicos Ciclofosfamida y Doxorrubicina. Se indica la estructura química de ambos compuesto (arriba) y su presentación comercial (abajo). La administración oral de ambas drogas se realizó en forma semanal siendo las dosis Doxorrubicina 4 mg/kg peso + Ciclofosfamida 80 mg/kg.

### III.4.7 Administración intravenosa del extracto purificado de Grifola frondosa

La administración intravenosa de Maitake se realizó a través de la vena marginal de la cola (Fig. 33.3), mediante jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 mm x 25 mm (21Gx1), en forma lenta. Se administró un volumen total de 30  $\mu$ l, de los cuales 4  $\mu$ l correspondieron a Fracción D de Maitake PRO4X (5 mg/kg  $\beta$ -glucanos) llevados a volumen final de 30  $\mu$ l con agua destilada. El extracto glicoproteico se mantuvo en heladera a temperatura de 4°C a 7 °C hasta el momento de su utilización.



**Figura 33.3.** *Administración intravenosa de Maitake.* La misma se realizó a través de la vena marginal de la cola de ratones BALB/c. Para ello, se emplearon jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 mm x 25 mm (21Gx1), en forma lenta (detalle en color rojo). Se administró un volumen final de 30  $\mu$ l.

### III.4.8 Administración intraperitoneal extracto purificado de Grifola frondosa

El extracto glicoproteico se mantuvo en heladera a temperatura de 4°C a 7°C hasta el momento de su utilización. La administración intraperitoneal del mismo se realizó en la región inguino-abdominal mamaria izquierda de la hembra BALB/c, mediante jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 mm x 25 mm (21Gx1), en forma lenta, cuidando de no pinchar ningún órgano vital, tal como se esquematiza a continuación:



**Figura 34.3.** *Inducción tumoral mamaria por inyección intraperitoneal.* La inoculación de células tumorales mamarias en ratones hembra BALB/c se realizó mediante inyección intraperitoneal en la región inguino-abdominal mamaria izquierda del animal. Se utilizaron jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) de 0,80 mm x 25 mm (21Gx1), indicadas en color rojo en la figura.

#### III.4.9 Inspección clínica y conductual

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 min de la administración de las sustancias ensayadas, con especial atención en las primeras horas, y posteriormente en forma diaria hasta el día del sacrificio.

Las observaciones estuvieron dirigidas a:

- Determinación de muerte y tiempo de ocurrencia de esta.
- Signos y síntomas de toxicidad, comienzo y duración de los mismos:
  - Cambios en el pelaje (piloerección).
  - Modificaciones en las membranas mucosas (sangrado, inflamación).
  - Alteraciones oculares (midriasis o miosis).
  - Cambios del patrón respiratorio (respiración normal o alterada).
  - Modificaciones del sistema circulatorio (taquicardia, palpitaciones, agitación).
  - Cambios en el sistema nervioso central (alteraciones conductuales, nerviosismo, agresividad, pérdida de equilibrio o convulsiones, pérdida de apetito, pérdida de peso, letargo o somnolencia).
  - Alteraciones de la actividad somatomotora y sensorial (propiocepción o cambios en la posición del cuerpo, alteraciones de la temperatura corporal, nocicepción o algesia).

### III.4.10 Consumo alimentario

El consumo alimentario medio/ratón se determinó diariamente por diferencia de peso entre la masa de alimento disponible para ser consumida y la masa de alimento remanente:

$$\text{Consumo alimentario medio / ratón} = \frac{\text{g alimento suministrado} - \text{g alimento remanente}}{\text{N° ratones por jaula}}$$

### III.4.11 Peso corporal

El peso corporal de los animales se determinó como parámetro indicador de algún efecto tóxico o adverso de la salud general. Fue registrado semanalmente desde el comienzo y hasta el final del protocolo experimental [171,180]. Consideramos como cambio significativo, una variación de la masa corporal del 10% respecto del peso inicial. Para la pesada, el animal fue colocado en un vaso de precipitado previamente tarado a cero.



**Figura 35.3.** *Determinación de peso corporal.* El peso de los ratones se determinó como parámetro indicador de algún efecto tóxico o adverso de la salud general. Consideramos como cambio significativo, una variación de la masa corporal del 10% respecto del peso inicial.

### III.4.12 Inducción tumoral mamaria

La inducción de tumorigénesis mamaria en hembras BALB/c, se realizó mediante implante exógeno de células tumorales mamarias murinas de la línea celular LM3, cultivadas en medio MEM, R=124 (repiques). La línea celular se preservó en criotubos de nitrógeno líquido a temperatura de -196°C.

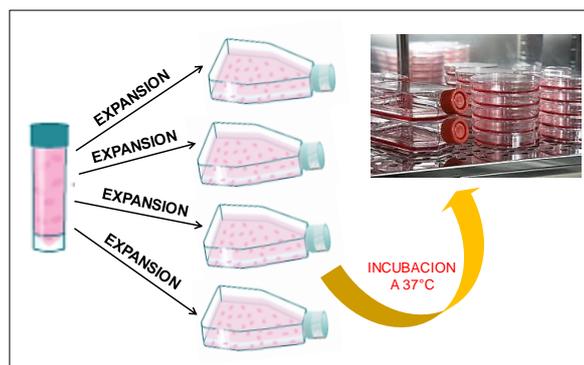
**Descongelamiento de la línea celular.** El procedimiento de descongelamiento [181-182] implicó el sometimiento del criotubo con las células LM3 a baño de agua termostaticado a 37°C durante 5 min. Posteriormente, las células fueron transferidas a tubo Falcon conteniendo 10 ml de medio MEM y 10 % de SFB. Se trabajó en

condiciones de esterilidad bajo flujo laminar, previa descontaminación por irradiación UV durante 15 min y desinfección con etanol 70°.

Se procedió a centrifugar a 1200 rpm por 5 min a temperatura ambiente, a fin de eliminar el criopreservante Dimetil-sulfoxido DMSO 10%, y luego se aspiró el sobrenadante con pipeta Pasteur conectada a vacío. El pellet obtenido se resuspendió en 10 ml de medio con suero y se transfirió al flask (frasco de cultivo) de 75 cm<sup>2</sup> de área, al cual se agregaron 15 ml de medio con 10% de SFB precalentado a 37°C en baño termostatzado. Finalmente, se incubó a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad, en una estufa de cultivo marca Sanyo, hasta obtener una confluencia mayor del 70%.

**Recambio del medio de cultivo.** Tal procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Se procedió a aspirar el viejo medio con pipeta Pasteur conectada a vacío. Se agregó 15 ml de medio de cultivo MEM fresco + 10 % SFB mediante pipeta de vidrio, homogeneizando suavemente. Se incubaron nuevamente las placas en estufa de cultivo a 37°C y atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad.

**Expansión celular.** Con tal fin, se aspiró el medio y se agregó 1 ml de tripsina 0,25 % + EDTA 0,02 % a fin de despegar las células. Tras conseguir el desprendimiento celular, se agregaron 10 ml de medio MEM con 10% SFB para inactivar la tripsina y generar la resuspensión celular. Se procedió a transferir a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó por 5 min a 1200 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y se agregó 10 ml de medio de cultivo fresco para homogeneizar el pellet de células. Se pipeteó 2,5 ml de la suspensión celular que se colocó en cuatro botellas con cultivo nuevo, esto es 15 ml de medio precalentado a 37 °C en baño termostatzado. Finalmente, se incubó en estufa de cultivo a 37°C y atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad (Fig. 36.3).



**Figura 36.3.** *Expansión celular.* La expansión de células tumorales mamarias murinas LM3 para inducción tumorigénica en el modelo experimental murino, se realizó en botellas con 15 ml de medio precalentado a 37 °C. La incubación se realizó en estufa de cultivo a 37°C y atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad.

**Preparación de las células para inoculación.** A tal fin, en cabina de flujo laminar se aspiró el medio de cultivo de los 4 frascos de cultivo (flasks) de 75 cm<sup>2</sup> de área conteniendo células LM3 confluentes. Las células fueron despegadas mediante 1 ml de tripsina 0,25 % + EDTA 0,02 % por cada flask. Luego se agregaron 9 ml de medio MEM con 10% SFB para inactivar la tripsina y resuspender las células. Se transfirió el contenido de todas las botellas a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó por 5 min a 1200 rpm. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1,5 ml de medio con suero.

Para el recuento celular, se utilizó una cámara de Neubauer, resultando en 708.500 células/ml. De esta suspensión se tomó 280 µl correspondiente a  $2 \times 10^5$  células, con el fin de realizar la inoculación en los animales ( $2 \times 10^5$  células LM3/ratón) para la inducción de tumorigénesis mamaria.

Mediante inyección intraperitoneal en la región inguino-abdominal mamaria izquierda, se inocularon 280 µl de medio DMEM libre de suero y antibiótico en el cual estaban presentes aproximadamente  $2 \times 10^5$  células tumorales mamarias murinas LM3. Se utilizaron jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) de 0,80 mm x 25 mm (21Gx1) (Fig. 37.3).



**Figura 37.3.** *Inducción tumoral mamaria.* La inoculación de células tumorales mamarias en ratones hembra BALB/c se realizó mediante inyección intraperitoneal en la región inguino-abdominal mamaria izquierda del animal. Se utilizaron jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) de 0,80 mm x 25 mm (21Gx1).

**Congelamiento celular para stock.** Dicho procedimiento se inició en cabina de flujo laminar, en la cual se aspiró el medio de cultivo con pipeta Pasteur conectada a vacío, añadiéndose 1 ml de tripsina 0,25 % + EDTA 0,02 % para despegar las células. Al microscopio se fue corroborando el desprendimiento celular, y al comprobar la totalidad del desprendimiento se agregaron 10 ml de medio MEM fresco con 10% SFB para inactivar la tripsina y resuspender las células. Se efectuó la transferencia a un

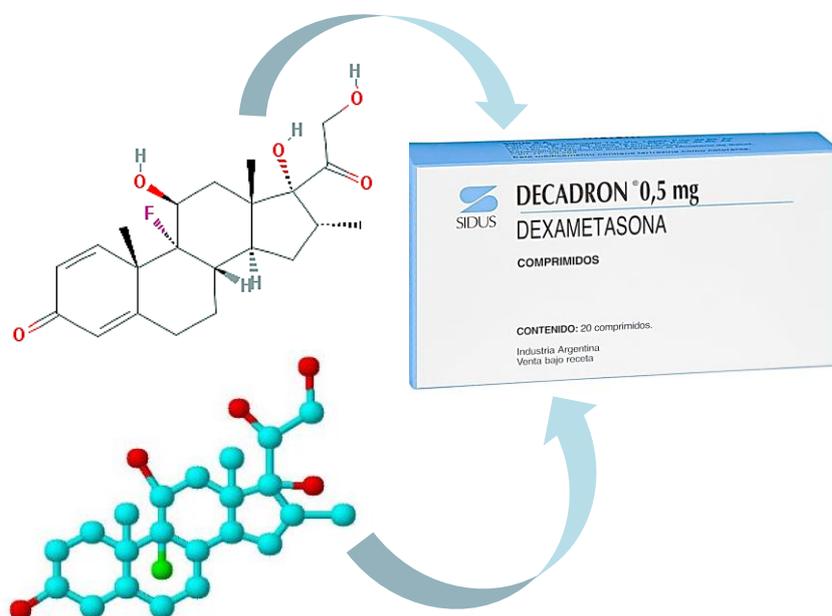
tubo falcon de 15 ml y se centrifugó por 5 min a 1200 rpm a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y se agregó 4 ml de medio de congelación MEM sin suero + 10% de Dimetil-sulfóxido (Sigma) a fin de resuspender el pellet celular. Se pipeteó 2 ml de dicha suspensión (aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células) para transferir a cada uno de los viales de congelación. Se guardó en frízer a  $-80^\circ\text{C}$ , y al día siguiente se trasladó a tanque de nitrógeno líquido para su preservación.

### III.4.13 Inmunosupresión por corticosteroides

Con el fin de inducir inmunosupresión en el modelo experimental murino [183], se administró diariamente  $3 \mu\text{g}$  Dexametasona/ratón [184] desde el inicio y hasta el final del ensayo experimental, el cual tuvo una duración aproximada de cuatro semanas.

Se preparó una suspensión del glucocorticoide 0,02 % m/v, para lo cual 5 comprimidos de una marca comercial 0,5 mg (Fig. 38.3) se mortearon hasta pulverización completa y se suspendieron en 12,5 ml de disolución acuosa de glucosa 10%. La suspensión fue preparada semanalmente y se conservó en heladera hasta su utilización.

De la suspensión del glucocorticoide, diariamente se administró  $15 \mu\text{l}$ /ratón equivalente a  $3 \mu\text{g}$ /ratón/día ( $0,15 \text{ mg}$  de Dexametasona /kg/día).



**Figura 38.3.** Agente glucocorticoideo Dexametasona. Se indica la estructura química del compuesto (izquierda), su aspecto tridimensional (en color) y su presentación comercial (derecha). La administración oral del fármaco para inducir inmunosupresión se realizó a dosis de  $0,15 \text{ mg/kg/día}$  durante cuatro semanas.

### III.4.14 Toxicidad en el modelo experimental

La toxicidad en el modelo experimental murino se examinó mediante chequeos periódicos de peso corporal [180,185] considerándose como parámetro indicativo de toxicidad, una reducción superior al 10% del peso inicial. También se chequeó periódicamente el consumo alimentario y se registraron signos fisiológicos anormales (comienzo y duración de estos).

Entre los signos fisiológicos anormales, se consideraron como indicativos de toxicidad cambios en membranas mucosas, ojos, piel y pelaje, consistencia de heces, ocurrencia de secreciones y excreciones, lacrimación, salivación, patrón respiratorio inusual, tamaño pupilar, convulsiones, piloerección, cambios en el paso, postura y respuesta a la manipulación, movimientos tónicos o clónicos, conductas estereotipadas (por ejemplo acicalamiento excesivo, dar vueltas repetitivas) o comportamiento extraño (por ejemplo automutilación, caminar hacia atrás), catalepsia, temblores, letargo, somnolencia.

Fue también indicativo de toxicidad la mortalidad y el tiempo de ocurrencia de la misma, reportándose de inmediato casos de muerte súbita, enfermedad, distrés u otras desviaciones de la normalidad, a fin de asegurar un adecuado y oportuno cuidado médico-veterinario. En el caso de un ejemplar afectado, queda establecido como parte del protocolo su retiro inmediato de la caja para la posterior limpieza y desinfección completa del sector. Para los animales muy graves se establece su sacrificio y posterior incineración. Durante la autopsia, se efectuó examen macroscópico y peso relativo de órganos y tejidos especialmente hígado, corazón, riñón, bazo, pulmón y glándula mamaria, a fin de detectar anomalías patológicas. Se tomaron muestras sanguíneas para determinaciones hematológicas y bioquímicas, indicadores secundarios de toxicidad. Por otra parte, se recolectaron tejidos para su inclusión en bloques de parafina y tinción con Hematoxilina-Eosina a fin de investigar posibles alteraciones morfológicas a nivel microscópico.

**Toxicidad aguda.** La misma se asocia con el rápido desarrollo de efectos adversos tras la administración de una dosis única relativamente alta de compuesto [186, 187]. Por ello su estudio sirve para determinar los efectos de una dosis única y muy elevada del compuesto. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal, quedando la toxicidad aguda expresada por la dosis letal 50. Sin embargo, el Procedimiento de la Dosis Fija –utilizado en nuestros ensayos para estudiar toxicidad aguda del extracto glicoproteico- o FDP por sus siglas en inglés (Fixed-Dose Procedure) aparece indicado en la guía No. 420 de la OECD (The Organisation for Economic Co-operation and Development) como alternativa a la prueba clásica aguda. Este se basa en la evaluación de dosis prefijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado. La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, además de no ser corrosiva ni severamente irritante. La Prueba FDP fue internacionalmente validada y aceptada [188,189].

Para investigar la toxicidad aguda del extracto glicoproteico de Maitake PRO4X, empleamos una dosis límite de 2000 mg/kg peso, y considerando los estudios de toxicidad y los signos y síntomas reportados en la literatura científica [190-191].

**Toxicidad subaguda.** Tuvo por finalidad completar el ensayo de caracterización toxicológica del extracto glicoproteico Maitake PRO4X. Se realizó un ensayo de administración a dosis repetida durante 28 días –equivalente en ratones a 3 años humanos- de la concentración terapéutica del extracto purificado de *G. frondosa*.

#### III.4.15 Estudio de crecimiento tumoral y necrosis circundante

Tras la inoculación de células tumorales mamarias murinas LM3 en ratones hembra BALB/c, se procedió a verificar el desarrollo del proceso tumorigénico mediante controles periódicos. Estos consistieron en palpación de la zona abdominal y examen visual durante las cuatro semanas siguientes al implante de células LM3. En los casos positivos de tumoración, se estableció tipo y tamaño de tumor, utilizando un calibre para determinar el crecimiento (mm) en dos ejes perpendiculares.

Se consideró tumor al bulto cuyo diámetro resultó mayor o igual a 10 mm, procediéndose a medir los diámetros mayor y menor con un calibre digital. La estimación del volumen tumoral se realizó mediante la fórmula:  $1/6 \pi \times \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2$ , asumiéndose forma elipsoidal [182].

Se registró el número y tiempo de aparición de los tumores. Tras el sacrificio, se verificaron características anatomopatológicas de la formación tumoral, y análisis histológicos al microscopio óptico. La significancia estadística de la extensión del tejido necrosado próximo al tumor mamario se calculó midiendo el área necrosada circundante en  $\text{cm}^2$ .

#### III.4.16 Determinación de metástasis hepática y/o pulmonar

La existencia de metástasis hepática y/o pulmonar en animales con implante de células tumorales LM3, se verificó a través de la remoción de hígado y pulmón, previo examen visual *in situ*. Se registró peso, tamaño y aspecto macroscópico de los mismos (coloración, forma, dimensiones). Los tejidos se conservaron en formol para la posterior confección de bloques de parafina, tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E) y examen microscópico de los mismos.

#### III.4.17 Estudios de angiogénesis tumoral

La densidad de vasos sanguíneos en tejido mamario se determinó por estimación del índice angiogénico, a fin de verificar la reducción de la irrigación sanguínea tumoral

por efecto anti-angiogénico de Maitake. Para dicha determinación, los cortes histológicos de glándula mamaria abdominal se dividieron en campos de 1 mm<sup>2</sup>, y al microscopio se contó el número de vasos sanguíneos por campo. Los preparados se recorrieron de izquierda a derecha, y de arriba hacia abajo. Se estableció un promedio de vasos sanguíneos/mm<sup>2</sup> para cada grupo experimental.

#### III.4.18 Análisis de supervivencia

Se registró el número de ratones BALB/c vivos de cada condición experimental, que sobrevivieron a cada uno de los tratamientos ensayados. Con tal fin, diariamente se chequeó el estado de salud general de cada ratón mediante observación directa, incluyendo peso corporal y signos fisiológicos y conductuales.

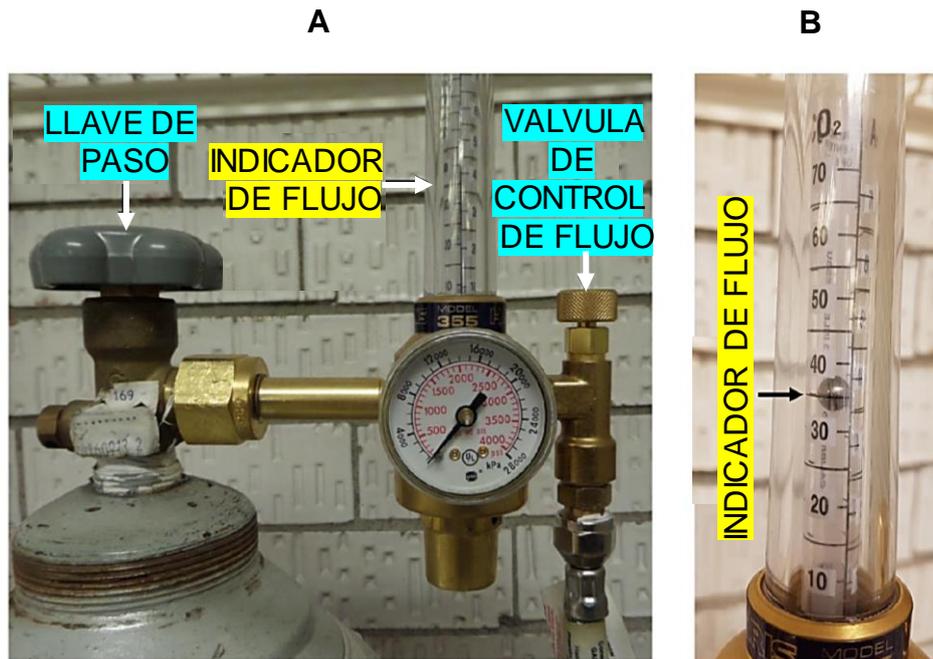
#### III.4.19 Sacrificio y remoción de órganos y tejidos

Los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> en cámara de eutanasia, con posterior dislocación cervical para asegurar su muerte, ello de acuerdo con las normas internacionales de sacrificio de animales de experimentación [192]. También se respetaron los principios éticos establecidos en los lineamientos internacionales aprobados por el CICUAL (Comité Institucional para el cuidado y Uso de animales de Laboratorio) del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-CONICET), lugar en donde se desarrolló la presente tesis doctoral. La cámara de eutanasia utilizada presentó una atmósfera de CO<sub>2</sub> disuelto en O<sub>2</sub> o aire. El CO<sub>2</sub> en porcentaje superior al 70% causa pérdida inmediata de la consciencia sin hipoxia, anestesia rápida, muerte, y menor irritación de las vías aéreas.



**Figura 39.3.** Cámara de eutanasia. La misma fue utilizada para el sacrificio de los ratones mediante asfixia con CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, y posterior dislocación cervical de los animales para asegurar su muerte. La cámara presentó una atmósfera de CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> o aire, en un porcentaje superior al 70%, lo cual causa pérdida inmediata de la consciencia sin hipoxia, anestesia rápida, muerte, y menor irritación de las vías aéreas.

Para el empleo de la cámara, previa desinfección de esta con alcohol 96°, se procedió al prellenado con CO<sub>2</sub>. Primeramente, se abrió la llave de paso del tanque para que el CO<sub>2</sub> llegue al interior de la cámara, corroborando que la presión de salida sea de 1 bar, observando que la esfera metálica (bala) en el indicador de flujo se mantenga en 35. Posteriormente, se cerró la llave paso girándola en sentido contrario; se abrió la tapa de la cubeta, y se introdujo a los animales en grupos de 2 o 3, cerrando luego la tapa de la cámara en forma hermética (Fig. 40.3).



**Figura 40.3.** Regulación de gases en cámara de eutanasia. La cámara presenta una atmósfera de CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> o aire, en un porcentaje superior al 70%. **A)** El manejo requirió la regulación de la presión gaseosa mediante la llave de paso, indicador de flujo y válvula. **B)** Detalle de la válvula, la cual debió mantenerse en un valor de 35 para el llenado gaseoso de la cámara.

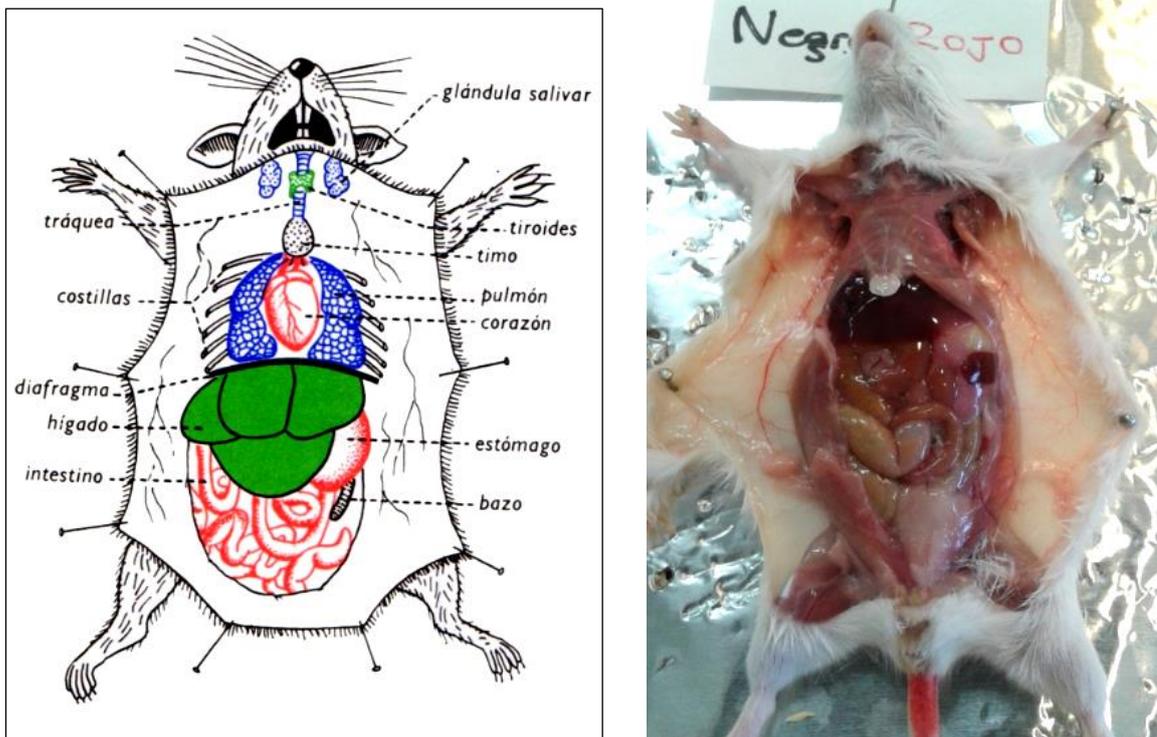
Tras la inconsciencia de los animales por asfixia con CO<sub>2</sub>, se verificó la ausencia total de sus signos vitales. Posteriormente, se abrió la tapa de la cubeta y se retiraron los ratones, a los cuales se les efectuó dislocación cervical para garantizar la muerte. En caso de suciedad de la cubeta por desechos fecales u orina, se efectuó desinfección con alcohol y papel, a fin de dejarla lista para su siguiente uso.

Posteriormente, se procedió a la remoción de los órganos murinos. El ratón se ubicó boca arriba sobre una plancha de Telgopor recubierta de papel metalizado, inmovilizando cada una de las extremidades con un alfiler. Se limpió la región abdominal con alcohol para evitar la dispersión de pelo, y seguidamente, con pinza histológica se sujetó la piel ventral y se realizó un corte longitudinal empleando tijera metálica, cuidando de no lesionar o pinchar órganos internos (Fig. 41.3).



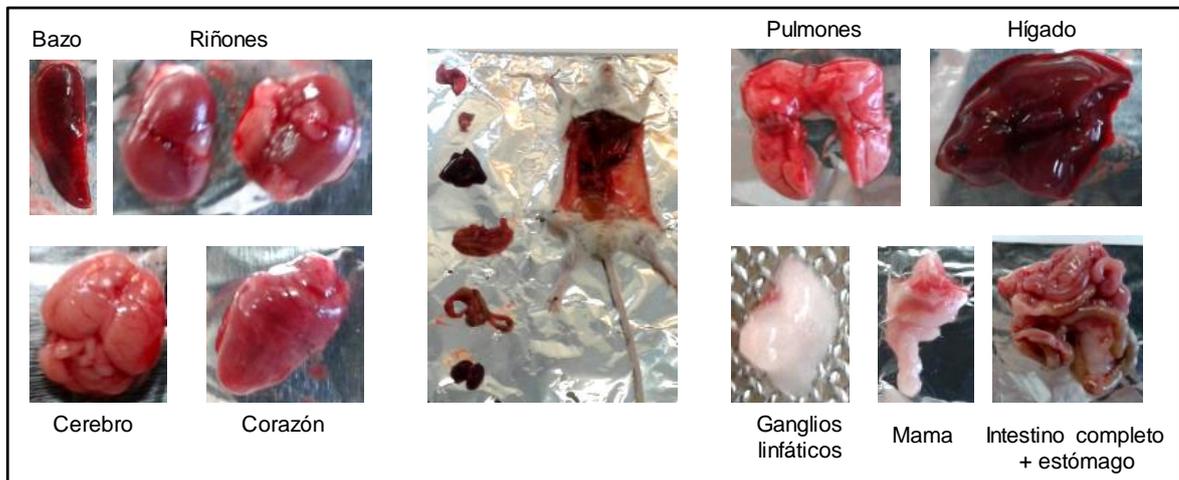
**Figura 41.3.** Autopsia de ratones BALB/c. Tras el sacrificio en cámara de eutanasia, los ratones se dispusieron boca arriba sobre una plancha de Telgopor, inmovilizando las extremidades con alfileres. Con pinza histológica, se sujetó la piel ventral mientras se realizaba un corte longitudinal con tijera metálica, cuidando de no lesionar o pinchar órganos internos.

Tras la apertura de la cavidad peritoneal, se expusieron todos los órganos internos (Fig. 42.3).



**Figura 42.3.** Apertura del peritoneo de ratones BALB/c. Tras la incisión longitudinal de la cavidad peritoneal durante la autopsia, quedaron expuestos todos los órganos internos del animal, los cuales fueron cuidadosamente observados *in situ*. Posteriormente, fueron extraídos con ayuda de pinzas y tijeras para análisis histológico.

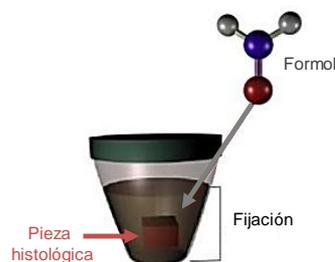
Durante la autopsia, se examinó cuidadosamente la región toraco-abdominal, registrando el aspecto macroscópico *in situ* de órganos a remover. Se extrajo: glándula mamaria de la región inguino-abdominal, hígado, pulmones, riñones, corazón, intestino grueso, intestino delgado, estómago bazo, cerebro, ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales y sangre (Fig. 43.3).



**Figura 43.3.** Remoción de órganos murinos. Se examinó detenidamente la región toraco-abdominal, y el aspecto macroscópico *in situ* de sus órganos. Se extrajo glándula mamaria abdominal, hígado, pulmones, riñones, corazón, intestino grueso, intestino delgado, estómago bazo, cerebro, ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales y sangre.

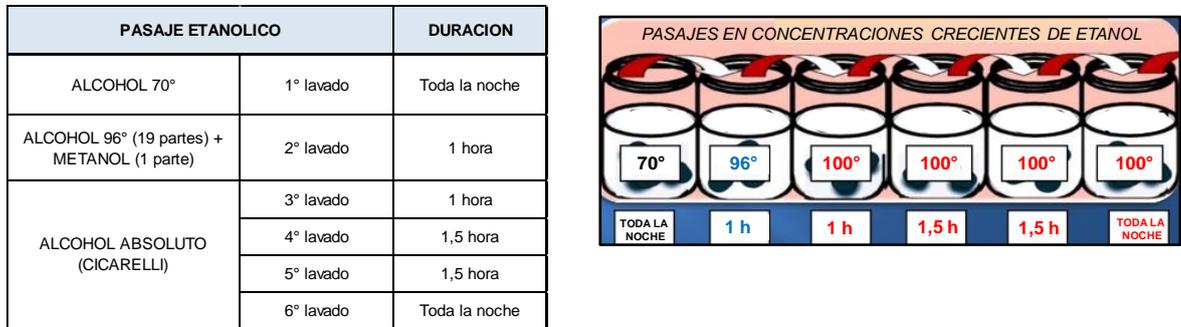
#### III.4.20 Preparación de tejidos para microscopía

Los órganos y tejidos tumorales removidos durante la autopsia de los ratones fueron fijados mediante inmersión en formol 10% (fijación simple) a temperatura ambiente, permaneciendo conservados en dicha solución hasta el comienzo del proceso de deshidratación por el método de confección de bloques de parafina [193]. El formol ejerce su acción fijadora a través de la coagulación proteica, lo cual permite preservar estructuras morfológicas, y mantener la integridad celular y tisular para evitar cambios post mortem (Fig. 44.3).



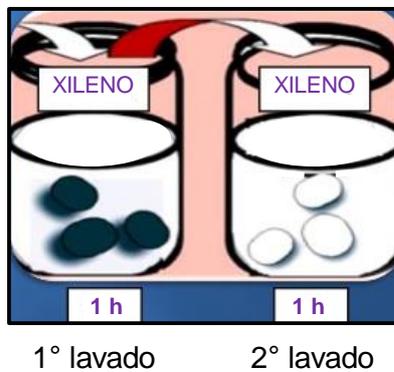
**Figura 44.3.** Fijación de la pieza histológica. Tras la remoción tisular, se procedió a sumergirlo en formol 10% para evitar cambios post mortem y mantener la integridad celular. La muestra se conservó en dicha solución por varias semanas hasta iniciar el proceso de deshidratación.

**Deshidratación.** Luego de la fijación, se deshidrató la pieza histológica mediante una serie de pasajes sucesivos (lavados) en concentraciones crecientes de alcohol etílico. El contenido de los tubos fue frecuentemente invertido a fin de aumentar el contacto del alcohol con la pieza histológica (Fig. 45.3).



**Figura 45.3.** *Deshidratación de la pieza histológica.* Para ello se emplearon concentraciones crecientes de alcohol etílico, en las cuales se sumergieron las muestras histológicas a tiempos preestablecidos.

**Aclaramiento.** El aclaramiento del tejido se realizó mediante dos lavados sucesivos con xileno (Cicarelli), tal como indica la Fig. 46.3, realizando frecuentes inversiones de los tubos a fin de aumentar el contacto del reactivo con la muestra histológica.



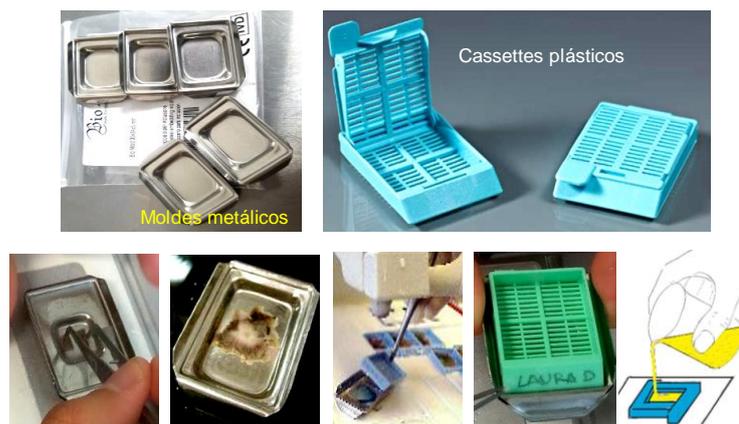
**Figura 46.3.** *Aclaramiento del tejido.* Para ello se realizaron dos lavados con xileno (Cicarelli), de una hora. Se procuró el aumento de contacto de la muestra con el reactivo a través de la inversión de los tubos.

**Infiltración.** El proceso de infiltración se realizó mediante pasajes por parafina fundida (Paraplast X-tra de McCormick Scientific). Para ello, se la mantuvo en baño termostatzado a 65°C. El primer pasaje por parafina generó el reemplazó del xileno de la muestra al ingresar la parafina al interior de la pieza. En este caso, también se realizaron frecuentes movimientos de inversión de los tubos, para mejorar el contacto y aumentar la infiltración parafínica (Fig. 47.3).



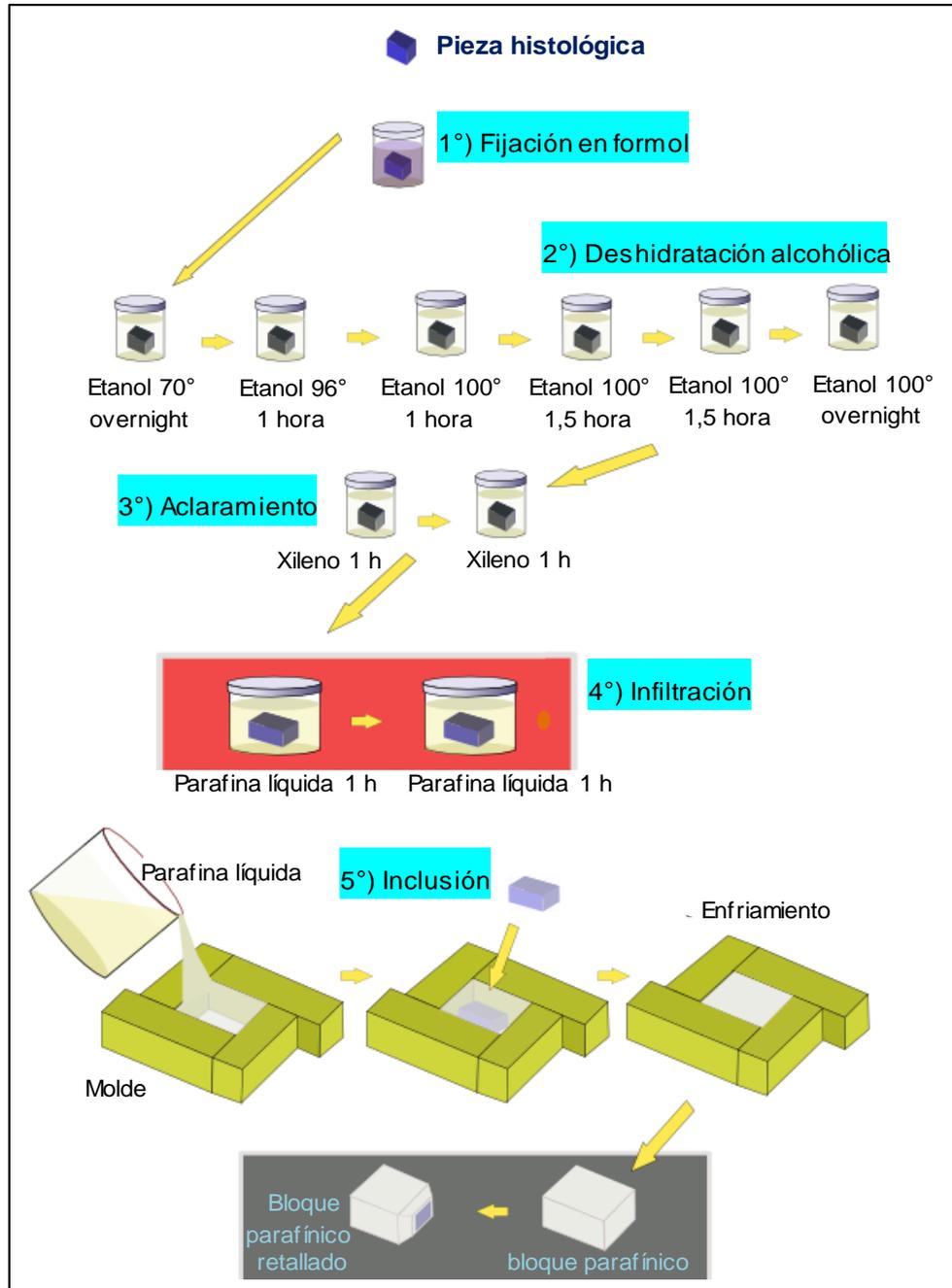
**Figura 47.3.** *Infiltración del tejido.* Se empleó para ello parafina en estado sólido (izquierda), que debió ser fundida a 65°C (derecha), con el fin de infiltrar las muestras. Se efectuaron frecuentes inversiones de los tubos para aumentar el contacto con las muestras histológicas.

**Inclusión.** Finalmente, se realizó el proceso de inclusión del tejido en moldes. Para ello, la pieza histológica fue transferida a un molde metálico (Stainless Steel Base Mold, Omnicell), conteniendo una pequeña cantidad de parafina líquida en su interior. La parafina se mantuvo líquida, porque los moldes estaban en una bandeja de vidrio pyrex sobre placa calefactora caliente (a temperatura media). Luego de ubicar la pieza en el molde, se colocó encima un cassette plástico (Histocell A Biopsy 30 Deg, Omnicell). Se agregó más parafina líquida, cuidando que el tejido permaneciera centrado en el molde. Seguidamente, se retiró el molde de la placa calefactora y se lo dejó solidificar en hielo a 4°C. Luego, se guardó en frízer a -20°C de modo que la parafina solidifique de manera homogénea. Por último, los bloques fueron desmoldados con suaves movimientos de palanca, verificando que el tejido quedase en el centro para facilitar la obtención de secciones con el micrótopo. De lo contrario, se procedió a derretir el bloque de parafina y repetir la inclusión (Fig. 48.3).



**Figura 48.3.** *Inclusión del tejido.* Se emplearon moldes metálicos y cassettes plásticos (imágenes superiores). La secuencia de inclusión se indica en las imágenes inferiores, en la cual se ubica la muestra en el centro del molde, el cassette encima, y finalmente desmolda el bloque.

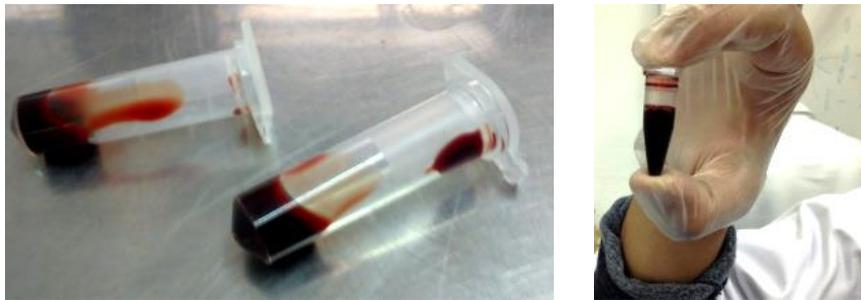
Los bloques de parafina correctamente obtenidos fueron remitidos al *Laboratorio de Patología* de la Dra. María Marta Corte (UNS) para la obtención de cortes histológicos con micrótopo en "slide", y posterior tinción con hematoxilina-eosina. Los pasos del procedimiento para obtención de muestras histológicas para microscopía se resumen en el siguiente esquema:



**Figura 49.3.** *Procesamiento de muestras histológicas para microscopía.* El esquema indica los pasos que desarrollamos para la obtención de muestras histológicas para microscopía, desde la remoción del tejido, su conservación y fijación en formol, deshidratación, aclaramiento, infiltración y finalmente obtención del bloque parafínico para generar los slides de tejidos.

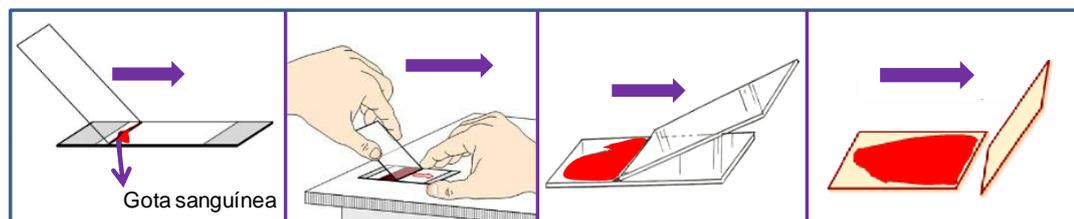
### III.4.21 Recolección de sangre periférica post mortem

La sangre periférica colectada durante la autopsia de los animales fue transferida a tubos eppendorf conteniendo EDTA 0,5%, a temperatura ambiente (Fig. 50.3). Las muestras se conservaron en heladera a 4°C, hasta el momento de realizar determinaciones hematológicas (como indicadores secundarios de toxicidad). Se determinó hematocrito (%), recuento eritrocitario ( $\text{mm}^3$ ), hemoglobina %, hemoglobina corpuscular media (%), concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl), volumen corpuscular medio (fl), recuento leucocitario ( $\text{mm}^3$ ), recuento plaquetario ( $\text{mm}^3$ ), creatininemia (mg/dl). Dichos estudios fueron realizados por el Laboratorio Veterinario *Diagnostest* de la localidad de Haedo, Provincia de Buenos Aires.



**Figura 50.3.** *Recolección de sangre murina.* La misma se realizó con micropipeta durante la autopsia de los animales, siendo transferida a tubos eppendorf conteniendo EDTA 0,5%. La sangre periférica se conservó en heladera a 4°C hasta el momento de realizar las determinaciones hematológicas.

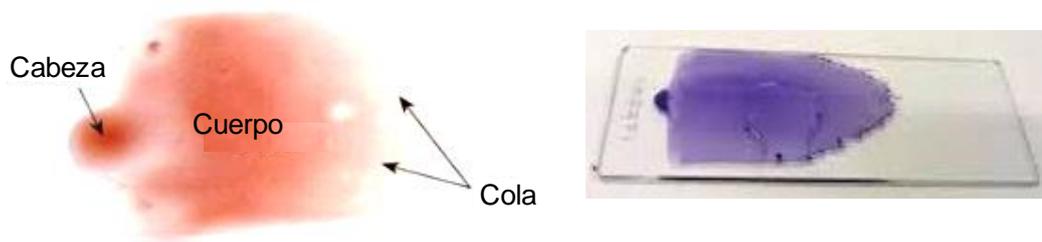
**Fórmula leucocitaria.** Se realizó un extendido sanguíneo, colocando una gota de sangre en el centro de un portaobjetos limpio. Mediante un cubreobjetos se obtuvo una fina película de sangre (frotis), tras deslizar el mismo a 45° sobre la gota de sangre en dirección al extremo opuesto del portaobjetos, tal como indica la siguiente secuencia:



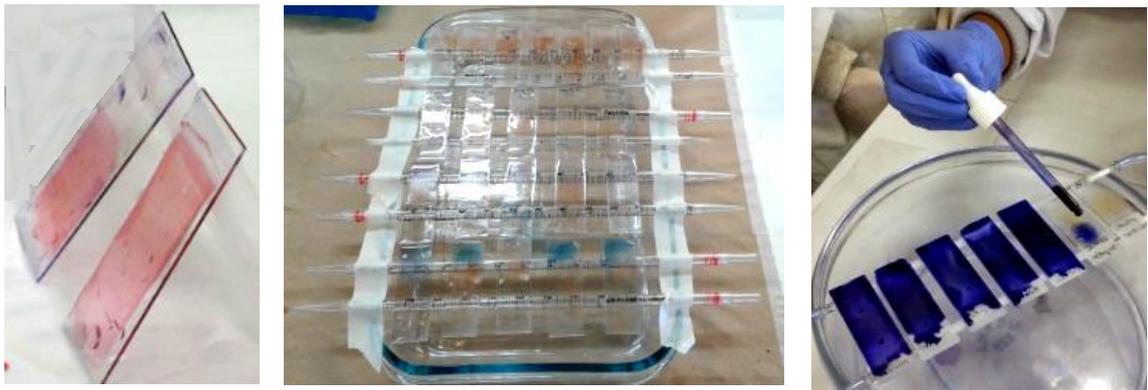
Obtención del frotis sanguíneo

El inicio del frotis se denomina cabeza, la parte final cola y la región central es el cuerpo, que resulta ideal para la observación microscópica ya que glóbulos rojos y plaquetas no se hallan aglutinados como en la cabeza ni muy esparcidos como en la cola de la cola, tal como se ilustra en la siguiente imagen.

## Frotis de sangre murina



Luego de la obtención del frotis sanguíneo, se lo dejó secar inmediatamente al aire a temperatura ambiente, para proceder a su tinción. Se agregaron unas gotas de metanol a fin de fijar el preparado, y tras la evaporación de este, se cubrió todo el extendido con una solución del colorante May Grünwald; se lo dejó actuar por 2-3 min. Posteriormente, y sin lavar, se agregó el colorante Giemsa, al cual se mantuvo en contacto con la muestra por 20 min. Por último, se lavó la preparación con agua destilada removiendo los colorantes por arrastre. Se dejó secar a temperatura ambiente (Fig. 51.3).

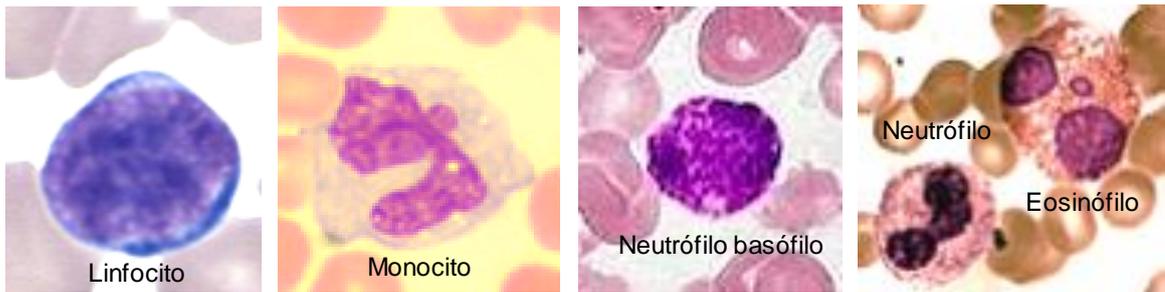


**Figura 51.3.** Secado y tinción del frotis sanguíneo. Tras obtener una fina película de sangre murina mediante un cubreobjetos, se procedió a dejar secar la muestra a temperatura ambiente (izquierda), para posteriormente teñirlo con el colorante May Grünwald Giemsa (derecha).

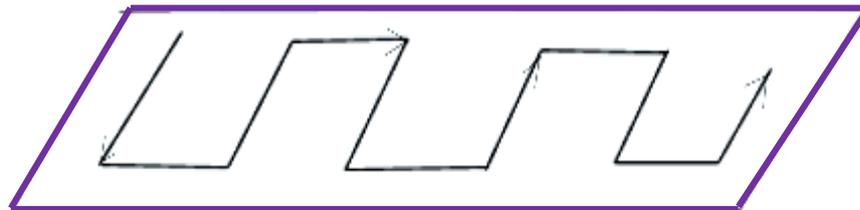
Como resultado final, se obtuvieron las coloraciones celulares que se indican a continuación (Tabla 2.3).

**TABLA 2.3.** Coloración de los tipos celulares con May Grünwald Giemsa. Luego de la obtención del frotis sanguíneo, se lo dejó secar para proceder a su tinción con May Grünwald Giemsa, previa fijación con metanol. El exceso de colorante se eliminó por arrastre con agua destilada.

TIPO CELULAR	COLORACION
Hematies	Rosa pálido
Cromatina nuclear	Rojizo a violeta oscuro
Plaquetas	Periferia azulada y gránulos centrales rojos
Linfocitos	Azul claro con granulos rojo intenso o púrpura
Monocitos	Citoplasma ligeramente azul
Granulaciones eosinófilos	Amarillentas o rojo-anaranjadas
Granulaciones basófilos	Violeta oscuro, azul o negro
Granulaciones neutrófilos	Rojo púrpura, violeta o marrón



**Recuento leucocitario.** Para ello, se marcó con un lápiz negro el extendido sanguíneo según el esquema indicado a continuación, trazando líneas perpendiculares de 1 cm para poder establecer el número de tipos celulares por campo durante el recuento al microscopio óptico.



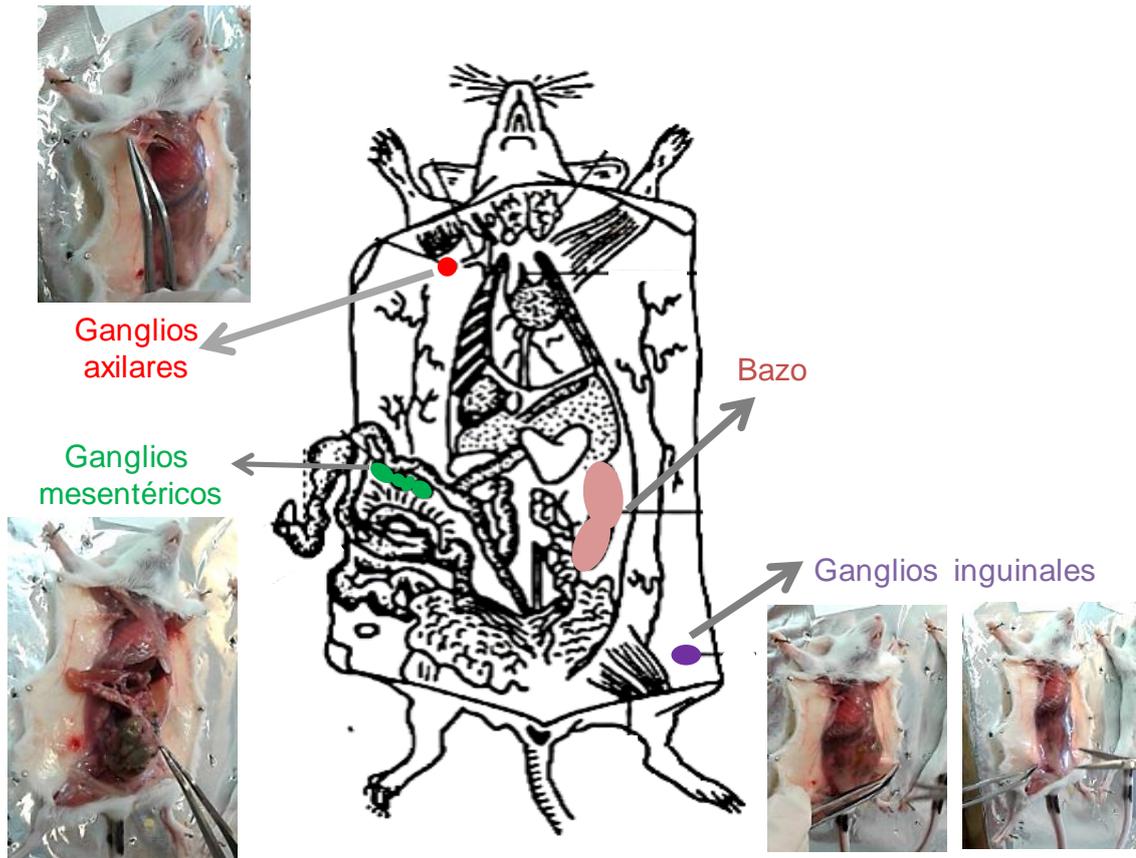
### III.4.22 Remoción y procesamiento de órganos linfoides

La obtención de células inmunes se realizó a partir de órganos linfoides periféricos (bazo y ganglios linfáticos), removidos durante la autopsia de los ratones. Dichos órganos fueron colocados en un colador, ubicado en la abertura de un tubo falcon, a fin de facilitar la disgregación mecánica. Con el émbolo de una jeringa se realizaron suaves movimientos circulares dando lugar a la desintegración tisular. El homogenizado fue recogido en el tubo falcon, tal como ilustra la Fig. 52.3.



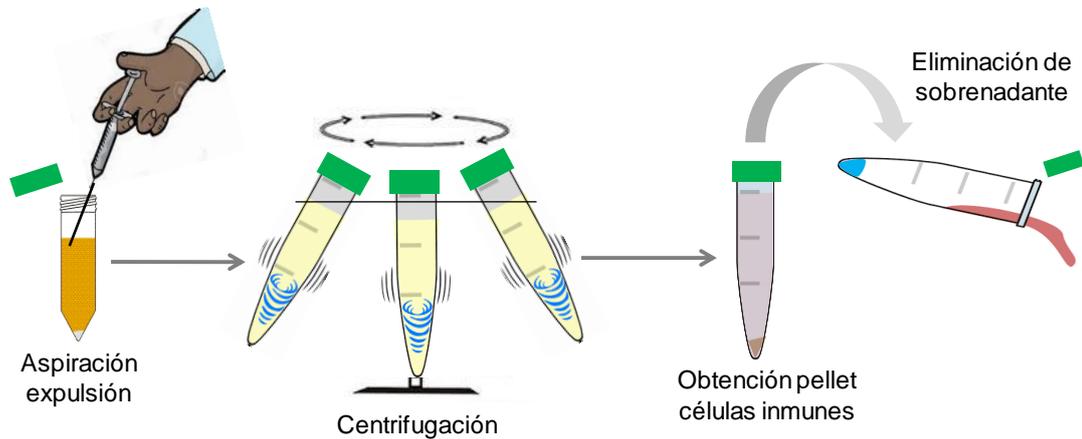
**Figura 52.3.** *Recolección de células linfoides.* La mismas fueron obtenidas a partir del procesamiento de órganos linfoides periféricos (bazo y ganglios linfáticos murinos). Los órganos fueron sometidos a disgregación mecánica para la obtención de la suspensión celular.

El procesamiento de ganglios linfáticos implicó primeramente la remoción de los nódulos inguinales, mesentéricos y axilares. Los ganglios inguinales se observaron como pequeños puntos blancos o durezas en las uniones de los vasos sanguíneos, mientras que los nódulos mesentéricos se visualizaron a partir del desenrollamiento del intestino delgado, observándose como una cadena de pequeños gránulos blanquecinos ubicados sobre el intestino delgado. De la región axilar, se removieron puntos blanquecinos correspondientes a los ganglios axilares (Fig. 53.3).



**Figura 53.3.** Remoción de órganos linfoides periféricos. Bazo y ganglios linfáticos de ratones BALB/c, fueron removidos durante la autopsia de los animales, y sometidos a disgregación mecánica para la obtención de células inmunes que posteriormente fueron marcadas para citometría de flujo.

Los tres tipos de ganglios fueron colocados en un mismo colador tras su remoción, el cual fue previamente humedecido con PBS frío. El procedimiento indicado en la Fig. 54.3 permitió obtener un pool de homogenado ganglionar. Mediante pipeta Pasteur, se efectuaron tres lavados con 1 ml de PBS frío para facilitar la disgregación; el homogenado se mantuvo en hielo durante el procedimiento. Con jeringa de 10 ml y aguja 27 G se realizaron varios pasajes de aspiración-expulsión del filtrado para generar total homogeneización y lisar cualquier acúmulo celular. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 1000 rpm durante 7 min empleando una temperatura de 4°C, desechándose el sobrenadante.



**Figura 54.3.** *Obtención de células ganglionares.* Los ganglios linfáticos mesentéricos, inguinales y axilares fueron colocados en un mismo colador luego de su remoción, lo cual permitió obtener un pool de células ganglionares.

El pellet obtenido de células ganglionares fue resuspendido en 4 ml de PBS con suero fetal bovino (SFB 1%), siendo mantenido en hielo hasta el momento de la marcación con anticuerpos fluorescentes para citometría de flujo. Previo a la marcación, se realizó el recuento de células inmunes en Cámara de Neubauer.

El procedimiento ilustrado en la Fig. 54.3, se empleó también para procesar bazo. Tras lavar las células linfoides esplénicas, se realizó un lavado con PBS y se procedió a resuspender con 4 ml de PBS en presencia de suero fetal bovino (SFB 1%). Las células se conservaron en hielo hasta el momento de marcarlas con los anticuerpos fluorescentes para los estudios por citometría de flujo.

#### III.4.23 Estudios de citometría de flujo en poblaciones linfocitarias

Diferentes poblaciones de células inmunes (linfocitos T, Linfocitos B, Células Natural Killer, Stem cells, granulocitos, macrófagos) derivadas de bazo y ganglios linfáticos (Tabla 3.3), fueron marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales anti-mouse fluorescentes:

- ✓ anti-CD3 $\epsilon$ -FITC,
- ✓ anti-CD19-PE,
- ✓ anti-CD105-AF
- ✓ anti-Ly6G-FITC.

**Tabla 3.3.** *Anticuerpos anti-mouse fluorescentes para citometría de flujo.* Las diferentes poblaciones de células inmunes (linfocitos T, Linfocitos B, Células Natural Killer, Stem cells, granulocitos y macrófagos) de procedencia esplénica y ganglionar, fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-mouse fluorescentes, según el detalle de la presente tabla.

ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-MOUSE	CLON	MARCADOR	POBLACION LINFOCITARIA
CD3ε FITC-conjugated	145-2C11	CD3	LINFOCITOS T NATURAL KILLER
CD19 PE-conjugated	PeCa1	CD19	LINFOCITOS B CELS DENDRITICAS STEM CELL / PRECURSORES
CD105 Alexa Fluor-conjugated	MJ7/18	CD105	MACROFAGOS/MONOCITOS STEM CELL / PRECURSORES
Ly6G FITC-conjugated	1A8	Ly6G	GRANULOCITOS

Los anticuerpos anti-mouse utilizados reconocen marcadores específicos (antígenos de superficie) de células inmunes murinas (CD3ε, CD19, CD105 y Ly6G), y emiten fluorescencia por hallarse conjugados con fluorocromos (FITC, PE y AF), los cuales presentan diferentes longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{excitación}$ ) y de emisión ( $\lambda_{emisión}$ ) (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** *Fluorocromos asociados a los anticuerpos anti-mouse.* Los anticuerpos reconocen marcadores específicos de superficie celular (CD3ε, CD19, CD105 y Ly6G), emitiendo fluorescencia por hallarse conjugados con fluorocromos (FITC, PE y AF), que presentan diferentes longitudes de onda de excitación y de emisión.

FLUOROCROMO	COLOR DE LA FLUORESCENCIA EMITIDA	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{emisión}$ (nm)	MARCADORES ASOCIADOS
PE	AMARILLO	450-564	578	CD 19
FITC	VERDE	494	519	CD 3 / LY6G
AF	AZUL	401	421	CD 105

Cada uno de los anticuerpos fluorescentes fueron diluidos en una solución de PBS+BSA 0,5%, hasta una concentración 1:30. Los anticuerpos ensayados en el primer experimento fueron:

➤ **CONDICION 1. CONTROL DE AUTOFLUORESCENCIA:** sin agregado de anticuerpo + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones.

➤ **CONDICION 2. FLUORESCENCIA ESPECIFICA DE ANTICUERPO**

**CONJUGADO CON PE:** 150  $\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con PE + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones.

➤ **CONDICION 3. FLUORESCENCIA ESPECIFICA DE ANTICUERPO**

**CONJUGADO CON FITC:** 150  $\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con FITC + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones.

➤ **CONDICION 4. FLUORESCENCIA DE AMBOS MARCADORES PE + FITC:** 150

$\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con PE + 150  $\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con FITC + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones ensayadas en el experimento.

En un segundo experimento, se emplearon anticuerpos con las siguientes condiciones:

➤ **CONDICION 1. CONTROL DE AUTOFLUORESCENCIA:** sin agregado de

anticuerpo + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones.

➤ **CONDICION 2. FLUORESCENCIA ESPECIFICA DE ANTICUERPO**

**CONJUGADO CON AF:** 150  $\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con AF + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones.

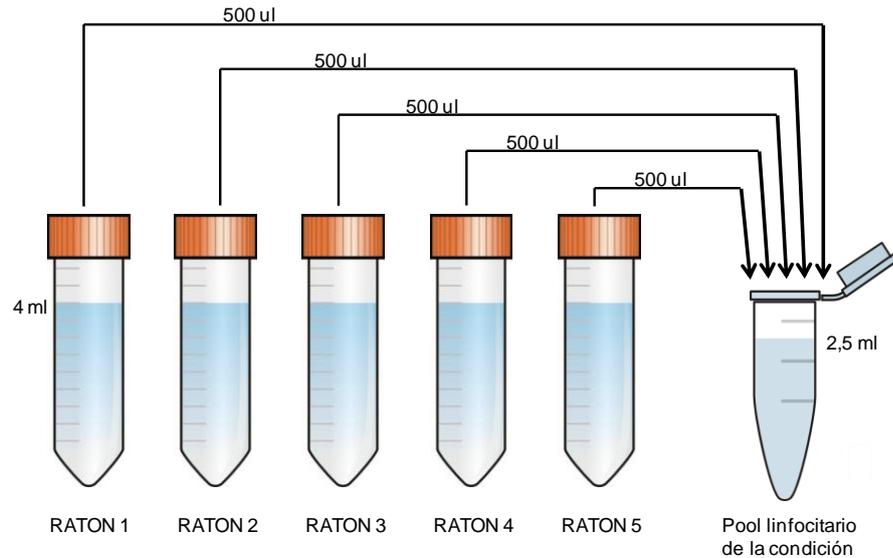
➤ **CONDICION 3. FLUORESCENCIA ESPECIFICA DE ANTICUERPO**

**CONJUGADO CON FITC:** 150  $\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con FITC + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones.

➤ **CONDICION 4. FLUORESCENCIA DE AMBOS MARCADORES AF + FITC:** 150

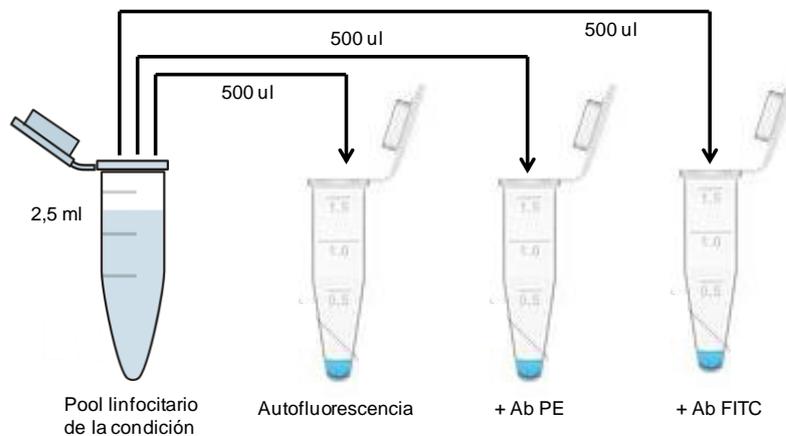
$\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con AF + 150  $\mu$ l de dilución 1:30 de Anticuerpo marcado con FITC + 500  $\mu$ l de células inmunes aisladas y lavadas, correspondientes a un pool de todas las condiciones ensayadas en el experimento.

De cada una de las 5 muestras de 4 ml/ratón de células linfocitarias de ganglio obtenidas por centrifugación, fueron tomados 500  $\mu$ l para un pool linfocitario de la condición experimental, tal como se esquematiza a continuación:

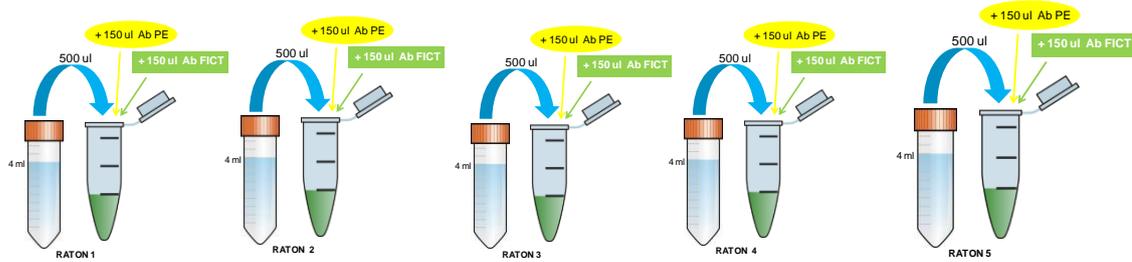


Tras homogeneizar el pool linfocitario de ganglio, se tomó:

- 500 µl para realizar el control de autofluorescencia,
- 500 µl para la marcación con 150 µl de Anticuerpo marcado con PE 1:30
- 500 µl para la marcación con 150 µl de Anticuerpo marcado con FITC 1:30, tal como se indica a continuación:

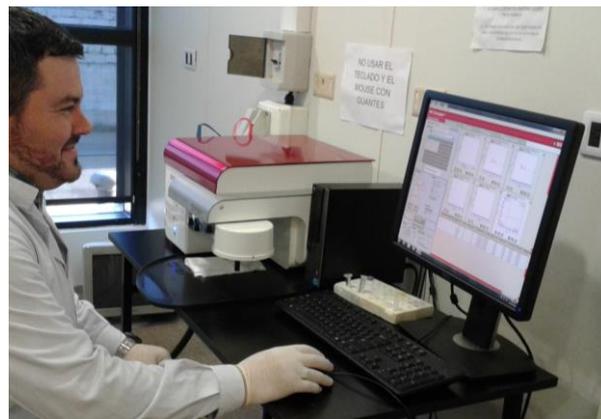


Para la marcación con el Anticuerpo conjugado con PE + FITC, se tomó 500 µl de pellet celular de la muestra de cada ratón, al cual se le agregó 150 µl de Anticuerpo PE 1:30 + 150 µl Anticuerpo FITC 1:30, según se esquematiza en la Fig. 55. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, a resguardo de la luz. Luego, se lavó con 500 µl de PBS y se centrifugó por 7 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en 400 µl de PBS + PFA 1%, y se mantuvo en hielo (siempre a resguardo de la luz), hasta el momento de la lectura en el citómetro, previa homogeneización de las muestras, según instrucciones del fabricante.



**Figura 55.3.** *Marcación ganglionar con anticuerpos fluorescentes.* Cada una de las muestras fue marcada para citometría con anticuerpos conjugados con fluorocromos fluorescentes.

Se empleó un citómetro de flujo marca BD ACCURI C6 FLOW CYTOMETER equipado con un láser azul (480 nm) para la longitud de onda de excitación y un láser rojo (640 nm) para la longitud de onda de emisión. Los datos se adquirieron en escala logarítmica y fueron analizados con el Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) (Fig. 56.3).



**Figura 56.3.** *Citómetro de flujo.* Se empleó un equipo BD ACCURI C6 FLOW CYTOMETER. El mismo estaba equipado con un láser azul (480 nm) para la longitud de onda de excitación y un láser rojo (640 nm) para la longitud de onda de emisión. Los datos se adquirieron en escala logarítmica y fueron analizados con el Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

### III.5 ANALISIS DE LA EXPRESION GENICA

Los cambios del fenotipo tumoral mamario derivados del tratamiento con Maitake, fueron estudiados a través del aislamiento de RNA de tejido mamario murino. Mediante PCR-RT se investigó la expresión de genes específicos asociados al fenotipo tumoral mamario, entre ellos ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC. Tales genes habían sido previamente investigados por nuestro grupo.

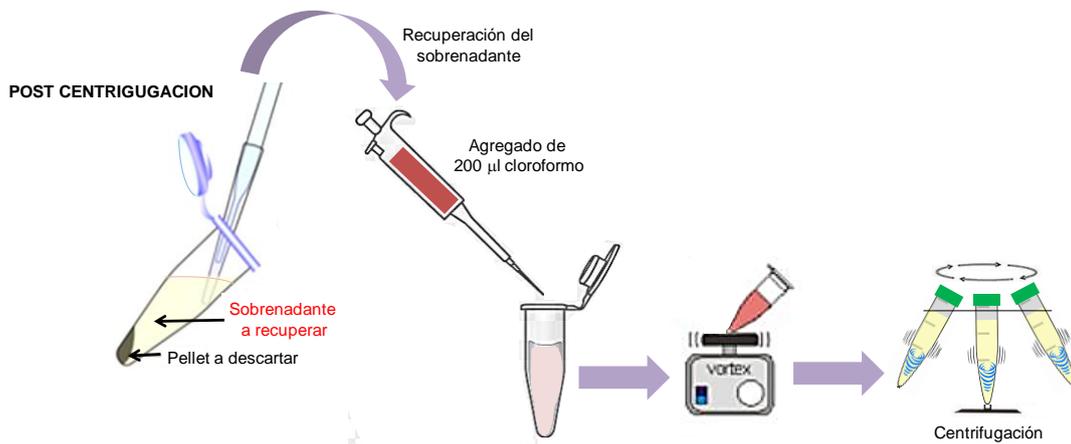
#### III.5.1 Aislamiento de RNA total de tejido mamario

El RNA total se aisló de tejidos mamaros murinos que estaban conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se empleó TRI Reagent, el cual se preparó disolviendo 47,27 g de Isotiocianato de guanidinio en 10 ml de Tris-HCl (pH = 7,5). Se llevó a 100 ml con agua destilada y se filtró con papel Whatman N°5. Se agregó 1 ml de  $\beta$ -Mercaptoetanol por cada 100 ml de solución, y luego 100 ml de fenol saturado de agua por cada 100 ml de disolución. Se adicionó 1 ml de acetato sódico 2 M por cada 100 ml de solución. Se homogeneizó con agitador magnético. Se conservó refrigerado en frasco color caramelo hasta su utilización. La extracción del RNA total [194-195] implicó primeramente disgregar el tejido mamario congelado mediante mortero y pilón -previamente enfriado en heladera-, hasta completa pulverización. Se agregó 2 ml de Isotiocianato de Guanidinio 4M y se homogeneizó con pipeta. Se recogió el contenido en un tubo falcon y con jeringa de 1 ml se homogeneizó varias veces empleando aguja 21 G y luego aguja 25 G para disolver cualquier acúmulo celular. Posteriormente se agregó detergente aniónico SDS (desnaturalizante proteico) en volumen equivalente al 10% del volumen total (aproximadamente 200  $\mu\text{l}$  SDS). Se agitó manualmente y en Vortex. Se transfirió el contenido a un tubo eppendorf, incubando a temperatura ambiente por 15 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó por 10 min a una velocidad de 5000 rpm y temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrifuga marca Eppendorf 5810R (Fig. 57.3).

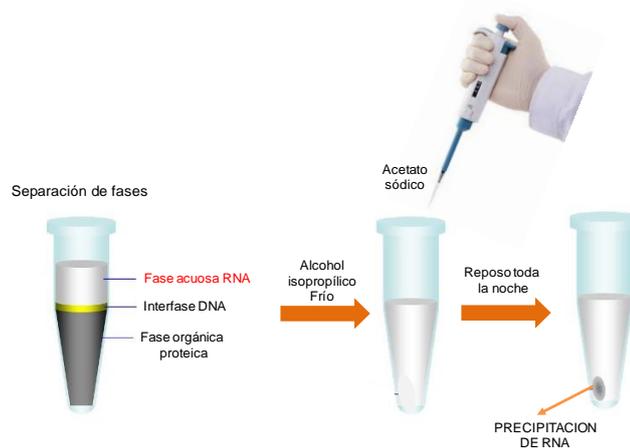


**Figura 57.3.** *Equipo para centrifugación.* Se utilizó una centrifuga refrigerada marca Eppendorf 5810R para el aislamiento de RNA, la cual permite alcanzar una velocidad superior a 12000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Luego de la centrifugación, se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf y se desechó el pellet. El sobrenadante recuperado recibió el agregado de 200  $\mu$ l de Cloroformo por cada ml de Isotiocianato de guanidinio administrado. Se agitó enérgicamente en forma manual y en vortex. Tras incubar por 5 minutos a 4°C, se procedió a centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Este procedimiento se esquematiza a continuación:

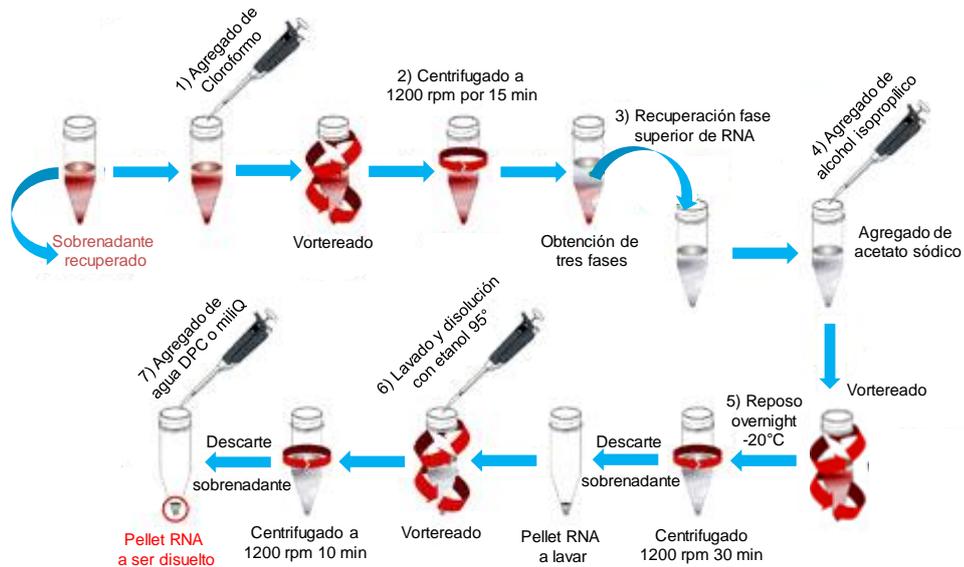


Se generaron 3 fases: una superior de RNA (acuosa e incolora), una intermedia blanquecina de DNA, y una porción inferior de naturaleza proteica. Se recuperó la fase superior acuosa de RNA, teniendo especial precaución de no tocar o entrar en contacto con la interfase blanquecina de DNA. La fase acuosa de RNA recibió el agregado de alcohol isopropílico frío en igual volumen al recuperado. Posteriormente, se adicionó 10  $\mu$ l de acetato sódico. Se mezcló por inversión y se vortereó. Finalmente, se dejó reposar overnight a -20°C para que tenga lugar la precipitación del RNA, tal como indica el siguiente esquema.



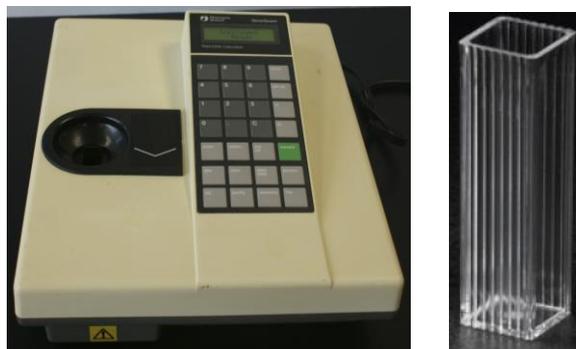
Luego del reposo overnight, se centrifugó a 12000 rpm por 30 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante volcándose en papel de filtro, mientras el pellet de RNA permaneció en el fondo de tubo eppendorf. Se dejó secar por 5 min. Posteriormente, se lavó con 1

ml de etanol frío 95%, se homogeneizó con pipeta para romper el pellet, y finalmente se vortereó. Se efectuó una nueva centrifugación a 12000 rpm por 10 min a 4°C, y se descartó el sobrenadante por volcado en papel de filtro. Se resuspendió el pellet de RNA con 50 µl de Agua DEPC o MiliQ estéril, a fin de disolverlo completamente. El producto obtenido fue conservado a -20°C hasta el momento de su utilización. En la Fig. 58.3 se esquematiza la etapa final del procedimiento de aislamiento de RNA de los tejidos mamarios murinos.



**Figura 58.3.** Etapa final del aislamiento de RNA. El RNA se aisló de tejido mamario murino de hembras BALB/c para investigar la expresión génica específica luego del tratamiento con el extracto glicoproteico de Maitake rico en  $\beta$ -glucanos.

**Cuantificación espectrofotométrica.** La concentración y pureza del RNA aislado se determinó mediante un espectrofotómetro UV-Vis marca Pharmacia Biotech GeneQuant RNA/DNA Calculator y celdas de cuarzo (Fig. 59.3).

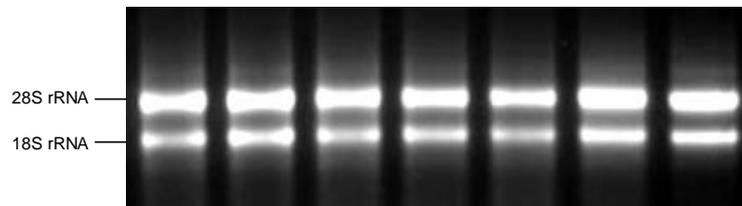


**Figura 59.3.** Espectrofotómetro UV-Vis. Se empleó un equipo marca Pharmacia Biotech GeneQuant RNA/DNA Calculator y celdas de cuarzo (izquierda) para cuantificar el rRNA aislado del tejido mamario murino.

La pureza de las muestras se determinó a través del valor Ratio con la fórmula  $R = \text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280}$ . La concentración de RNA total, se determinó mediante preparación de una dilución 1:100 de las muestras con agua MiliQ. Se leyó la Absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 260 nm y 280 nm [196]. Considerando que la  $\text{Abs} = 1$  equivale a 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA, y que se trató de una dilución 1:100, pudimos determinar la concentración RNA total mediante la fórmula:

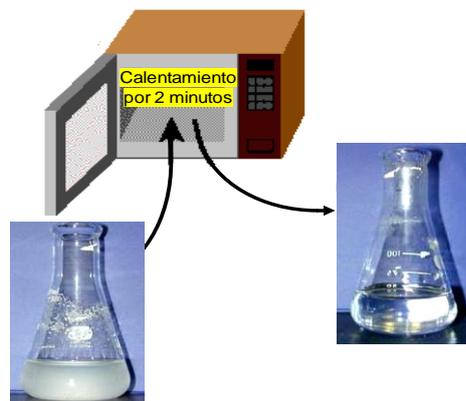
$$\text{Concentración RNA} = \text{Abs}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 100 \text{ (valor de la dilución)}$$

**Calidad del RNA aislado.** La integridad del RNA aislado se determinó por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. En un RNA íntegro, la sensibilidad del método permite observar bandas 28S y 18S de RNA ribosómico, presentando la banda 28S una intensidad de aproximadamente el doble que la 18S (Fig. 60.3).



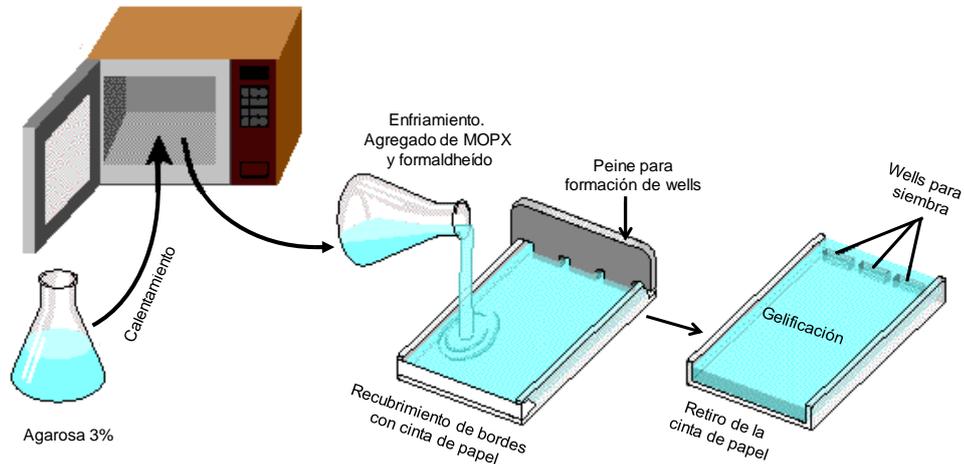
**Figura 60.3.** *Electroforesis en gel de agarosa.* La imagen ilustra una muestra de RNA íntegro en gel de agarosa 3%, donde se observan bien definidas las bandas correspondientes al RNA ribosomal de 28S y 18S. La banda 28S es aproximadamente el doble de intensa que la banda 18S.

El gel desnaturalizante se preparó con 50 ml de agarosa 3%, disolviendo 1,2 gramos de esta en 43,5 ml de agua destilada. Se calentó por dos minutos en microondas para completar la disolución, verificando que no se formen grumos (Fig. 61.3).



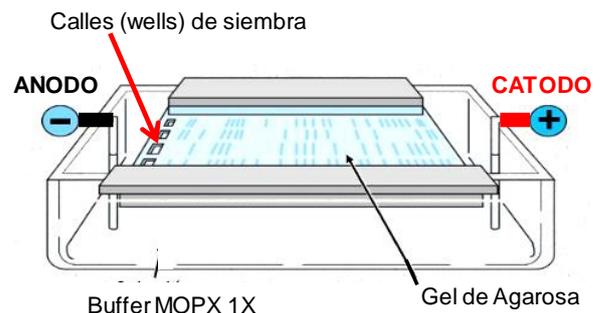
**Figura 61.3.** *Disolución de agarosa 3%.* Para preparar el gel desnaturalizante, se disolvió agarosa 3% en agua destilada y se calentó durante dos minutos en microondas para lograr completa disolución, verificando que no se formen grumos.

La disolución de agarosa obtenida se dejó enfriar hasta 60°C. Se agregó 5 ml de buffer MOPS 1X, y luego 1,5 ml de formaldehído 37 % para volver desnaturante al gel. Se volcó la disolución en la cámara de gelificación previamente sellada con cinta de papel, colocando el peine en la parte superior de modo que se formen las calles (wells). Se dejó gelificar durante 60 min (Fig. 62.3).



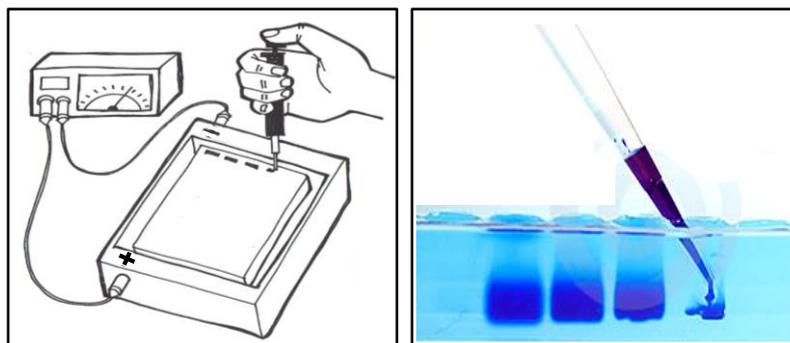
**Figura 62.3.** Gelificación de agarosa 3%. El gel de agarosa 3% tuvo por finalidad sembrar las muestras de RNA total de tejido mamario murino, a fin de realizar la corrida electroforética y verificar la integridad del RNA.

Luego de la gelificación, se retiró el peine y se quitó la cinta de papel de la cámara. El gel se colocó en la cuba electroforética, verificando que las calles quedasen hacia el polo negativo (cátodo). Se volcó buffers MOPS 1X en la cuba hasta cubrir ligeramente tanto el gel como las calles (wells). Se procedió a la siembra de las muestras murinas para verificar la integridad del rRNA (Fig. 63.3).



**Figura 63.3.** Cámara electroforética. A la izquierda se observa la cámara corriendo las muestras de rRNA a 60 V, a fin de verificar la integridad del ácido ribonucleico aislado. Mientras que a la derecha se esquematizan las partes de una cámara de electroforesis horizontal.

Las muestras para siembra de RNA fueron previamente tratadas con buffer loading 10X, de modo que a 1  $\mu$ l de buffer se adicionó 9  $\mu$ l de muestra de RNA. Se homogeneizó la mezcla y se incubó a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a baño termostático a 55 °C por 5 min para desnaturalizar el RNA, e inmediatamente se incubaron en hielo hasta el momento de la siembra. Durante la misma, se agregaron 10  $\mu$ l de muestra/well (Fig. 64.3), dejando libres las calles de los extremos. El voltaje de la corrida fue de 60 voltios durante 60 min.



**Figura 64.3.** Siembra de RNA. Las muestras fueron sembradas en cada uno de los wells de corrida electroforética. El procedimiento se realizó a 60 V durante una hora. Los resultados obtenidos permitieron verificar la integridad del RNA extraído del tejido mamario murino.

Al finalizar la corrida, se sumergió el gel de agarosa en buffer MOPS 1X, conteniendo 15  $\mu$ l de bromuro de etidio a fin de conseguir la tinción del rRNA. La visualización de las bandas de rRNA se efectuó en un transluminador UV marca Benchtop 2UV a 302 nm (Fig. 65.3).



**Figura 65.3.** Transluminador UV. Se empleó un transluminador marca Benchtop 2UV para verificar la presencia de bandas 28S y 18S del rRNA y corroborar su integridad en los estudios de expresión génica del fenotipo tumoral mamario .

### III.5.2 Síntesis de cDNA por retrotranscripción

No todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todos los tejidos, por lo cual nuestro objetivo fue investigar la expresión de genes específicos asociados al fenotipo tumoral maligno en tejido mamario. Para ello, nos hemos valido de técnicas de RT-PCR [196] que nos han permitido sintetizar cDNA (estable tanto al calor como a la metodología PCR) a partir de mRNA (sensible al calor).

El empleo de una enzima RT (retrotranscriptasa) con actividad ribonucleasa H, permitió la síntesis de cDNA a partir del mRNA que posteriormente fue hidrolizado. Para ello, en un microtubo eppendorf de 0,5 ml mantenido a 4°C se colocó la siguiente mezcla de reacción:

- Volumen de muestra de RNA equivalente a 0,5 µg de RNA.
- Primer OligodT (0,5 mg/ml) 1 µl.
- Agua DEPC (Sigma) para llevar a volumen final de 2,5 µl.

Calentamos la mezcla por 5 min a 70°C en baño termostático modelo Masson marca Vicking (Fig. 66.3), e inmediatamente enfriamos en hielo a 4°C durante 5 min.



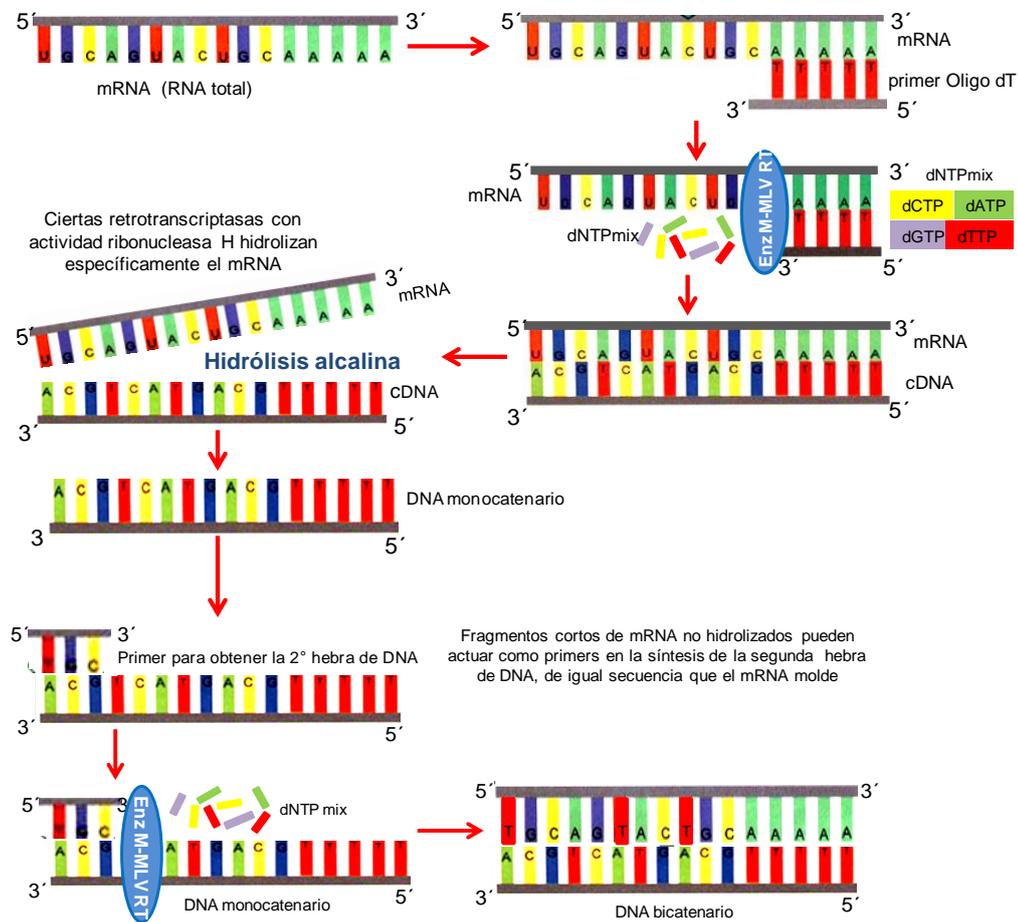
**Figura 66.3.** Baño termostático. Se empleó un baño modelo Masson marca Vicking para el shock térmico de las muestras murinas, calentadas a 70°C e inmediatamente enfriadas a 4°C.

Finalizada la incubación en hielo a 4°C, fueron agregados los reactivos que se indican a continuación en el siguiente orden:

- Buffer M-MLV 5X (Promega) 2,5 µl.
  - dATP (10 mM) 0,625 µl
  - dCTP (10 mM) 0,625 µl
  - dGTP (10 mM) 0,625 µl
  - dTTP (10 mM) 0,625 µl
- } dDNT mix 2,5 µl

- Enzima M-MLV RT (200 unidades) (Promega) 0,5  $\mu$ l.
- Agua DEPC volumen necesario para llevar a 10  $\mu$ l.

Para sintetizar cDNA, la enzima M-MLV RT (retrotranscriptasa) requiere necesariamente de un iniciador o primer, al cual añadirle nucleótidos, en este caso un primer dT (TTTT). Cuando el oligonucleótido sintético (Oligo dT) se une a la región complementaria del extremo 3' de mRNA (la cola de poli-A), la retrotranscriptasa provoca la extensión de la cadena del primer en dirección 5'  $\rightarrow$  3' a través del agregado de nucleótidos libres (dNTP mix) al extremo 3' del mismo. La extensión finaliza cuando la enzima RT no es capaz de continuar añadiendo más nucleótidos, de modo que la hebra monocatenaria de cDNA no posee un tamaño definido (Fig. 67.3).



**Figura 67.3. Síntesis de cDNA monocatenario.** La misma se realizó por retrotranscripción del mRNA, mediante la enzima retrotranscriptasa, a partir de un iniciador o primer dT, al cual se fueron agregando nucleótidos libres en dirección 5'  $\rightarrow$  3'.

La reacción de retrotranscripción se completó en un termociclador marca Mastercycler gradient (Eppendorf) a 40°C durante 60 min. Las muestras de cDNA obtenidas se guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización (Fig. 68.3).

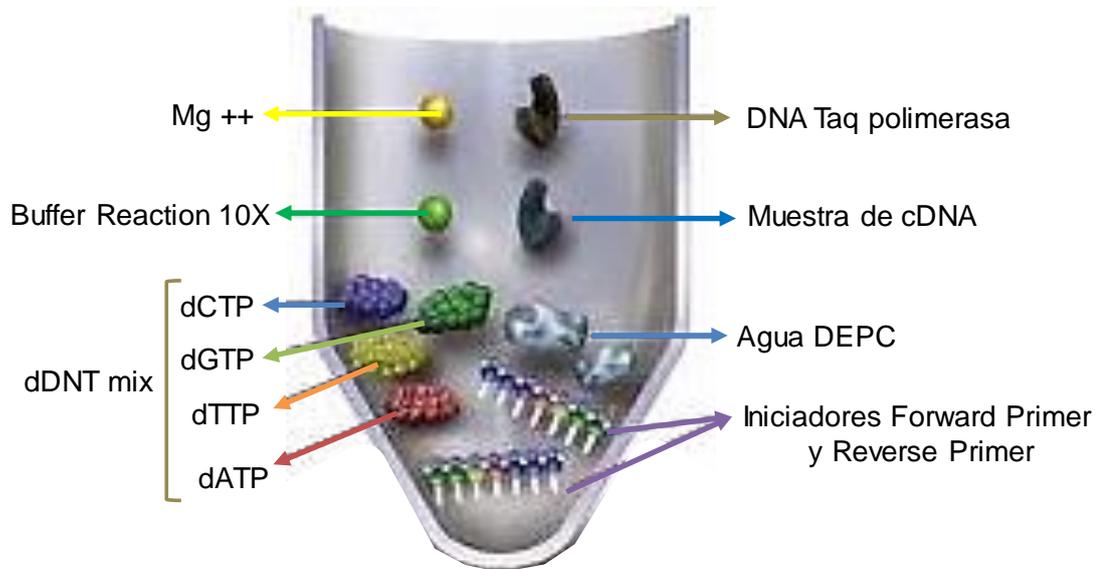


**Figura 68.3.** Reacción de retrotranscripción. La misma se completó en termociclador marca Mastercycler gradient (Eppendorf) a 40°C durante 60 min.

### III.5.3 Amplificación de genes target

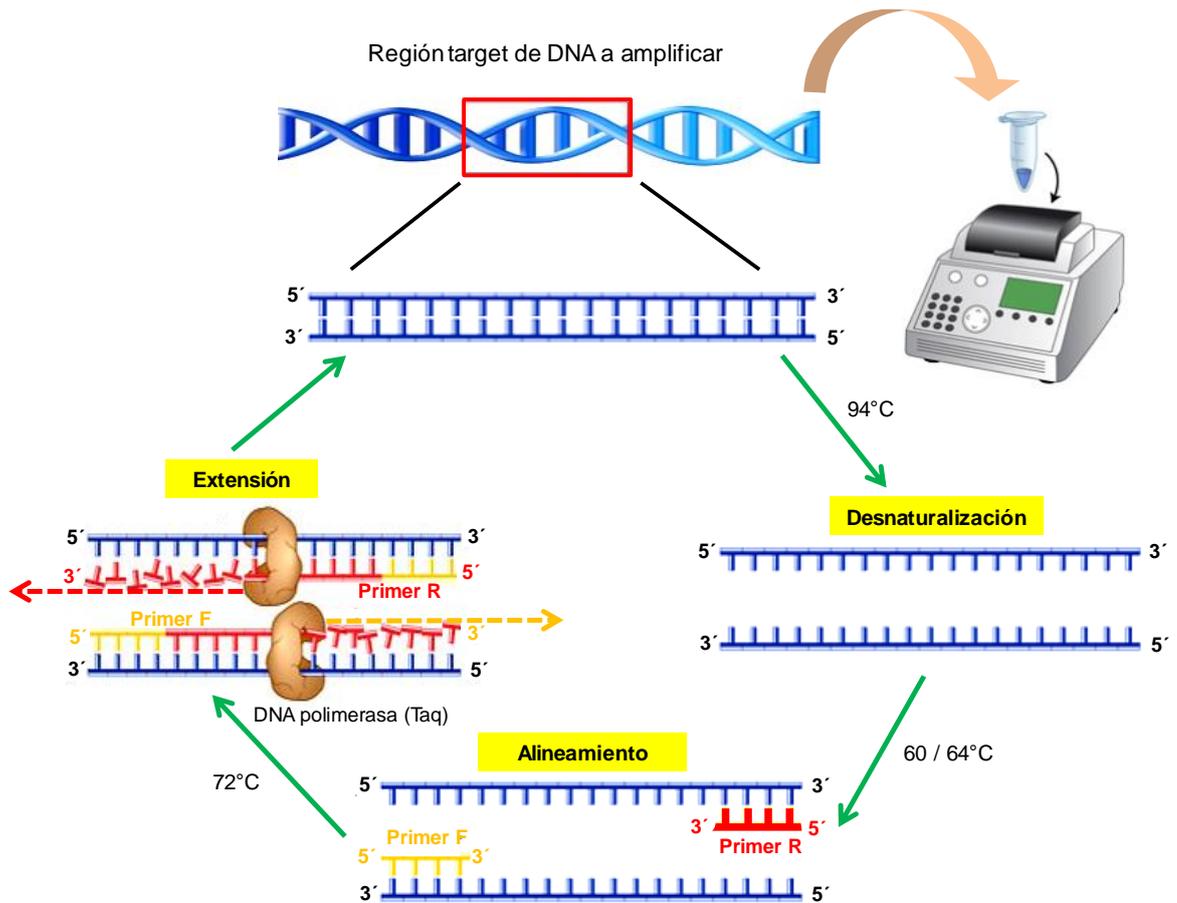
La amplificación y detección de los genes de interés, se realizó por PCR. Por tratarse de una técnica de amplificación exponencial, resulta muy sensible, permitiendo que un fragmento de DNA bicatenario de baja concentración en una muestra sea amplificado para obtener millones de copias. Para ello, en un tubo eppendorf de 0,5 ml fueron agregados en el orden indicado los reactivos señalados a continuación, tal como ilustra la imagen de la parte inferior:

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN	OBSERVACIONES
Buffer Reaction	10X	2,5 µl	Brinda el pH adecuado para la actividad enzimática.
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 µl	Esencial para la actividad enzimática, Mg <sup>2+</sup> actúa como cofactor de la Taq polimerasa.
dNTP mix	100 mM	1 µl	
Forward Primer	0,5 µM	0,5 µl	Correspondiente al gen investigado.
Reverse Primer	0,5 µM	0,5 µl	Correspondiente al gen investigado.
muestra cDNA		2,0 µl	Correspondiente al gen investigado.
Agua DEPC			Volumen necesario para llevar a 25 µl.
DNA Taq Polimerasa	5 U/µl	0,2 µl	Marca Pegasus. Se agrega último.



La reacción se efectuó en un termociclador. Utilizamos el siguiente programa de amplificación [197]: previo al primer ciclo, se elevó por única vez la temperatura a 94°C durante 5 min, lo cual permitió activar la enzima DNA Taq polimerasa por calor. Posteriormente, se sucedieron 30 ciclos consecutivos constituidos por las siguientes etapas:

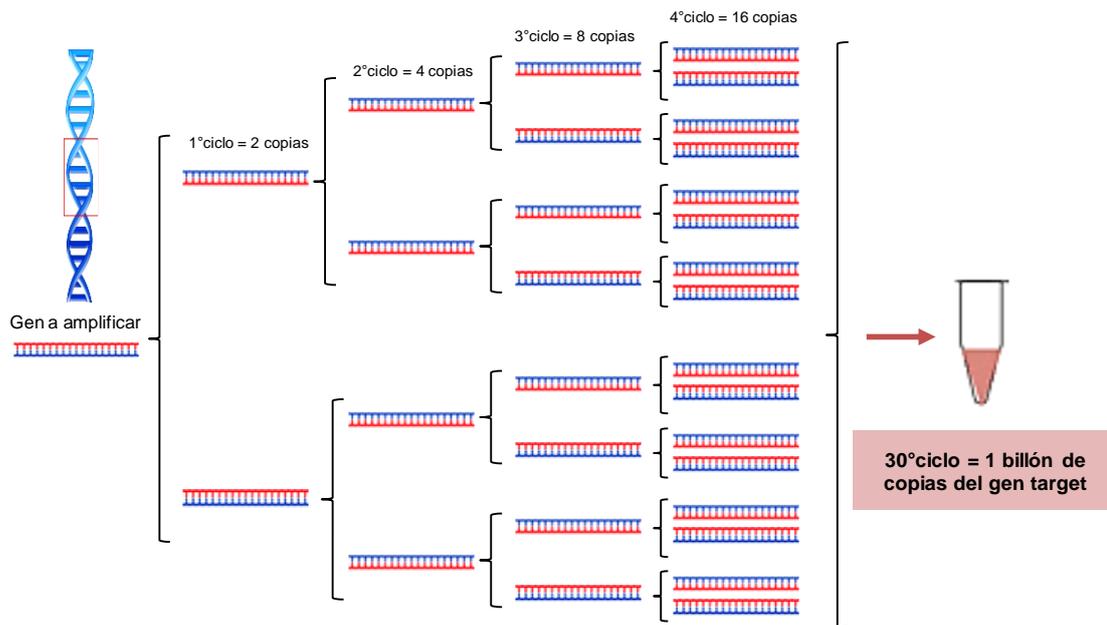
- **Desnaturalización** a 94°C por 30 segundos, para separar la doble hélice de DNA.
- **Alineamiento** a 60°C-64°C (Temperatura de annealing o temperatura óptima de hibridación del primer), por 60 segundos. Se bajó la temperatura para que los primers F y R puedan acoplarse a las regiones complementarias de las hebras individuales de DNA mediante enlaces puente hidrógeno. Los primers F y R actuaron como límites de la región a amplificar, siendo complementarios a cada uno de los extremos 3' de la región a amplificar.
- **Extensión** a 72°C durante 30 seg. Se elevó la temperatura a la de la máxima actividad enzimática: la Taq polimerasa tomó como punto de partida el extremo final 3' del primer, a fin de extender la cadena, agregando los dNTP mix en dirección 5' → 3' para la nueva hebra de DNA. La extensión finalizó cuando la Taq DNA polimerasa no fue capaz de continuar añadiendo más nucleótidos. Esto implicó que la nueva hebra no cuente con un tamaño definido.



**Figura 69.3.** Amplificación de genes target. La imagen ilustra las etapas de Desnaturalización, Alineamiento y Extensión de cada ciclo de la reacción PCR, a fin de amplificar los genes target del fenotipo tumoral mamario investigados luego del tratamiento con  $\beta$ -glucanos de Maitake.

Al finalizar el 1<sup>o</sup> ciclo de amplificación, se obtuvieron 2 copias del gen target. En el 2<sup>o</sup> ciclo de amplificación, con la repetición de los 3 pasos (desnaturalización, alineamiento y extensión) se obtuvieron 4 copias del gen. Durante el 3<sup>o</sup> ciclo 8 copias y a medida que se repitió el número de ciclos (n), la cantidad de copias de la región target de DNA se incrementó exponencialmente ( $2^n$ ) (2, 4, 8, 16, 32, 64...), de modo que al finalizar el ciclo N<sup>o</sup> 30, se obtuvieron más de 1000 millones ( $2^{30}$ ) de copias del gen target, tal como indica el siguiente esquema:

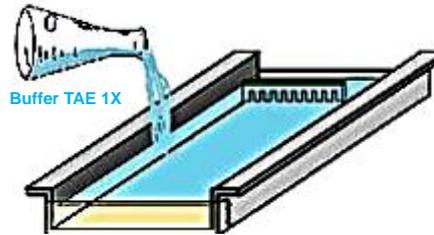
## AMPLIFICACION EXPONENCIAL POR PCR



Terminado el último ciclo (N° 30), tuvo lugar por única vez la elongación final a 72°C durante 10 min, lo cual garantizó la amplificación de cualquier hebra simple de DNA. Concluida dicha elongación, la temperatura del termociclador descendió a 4°C para conservar las muestras refrigeradas hasta su recolección. Una vez retiradas del equipo, se guardaron a -20°C hasta la siembra en gel de agarosa.

Buffer TAE 10X para corrida electroforética: La preparación de 1 litro de buffer TAE 10X [196] requirió de probeta graduada en la cual se agregó Tris base (PM = 121,14) 48,4 g; AAG (PM=60 y  $\delta = 1,055$  g/ml) 11,42 ml; EDTA 0,5 M (pH=8) 20 ml. Se llevó inicialmente a 900 ml con agua destilada. Luego de ajustar el pH a 7,7 se llevó a volumen final de un litro.

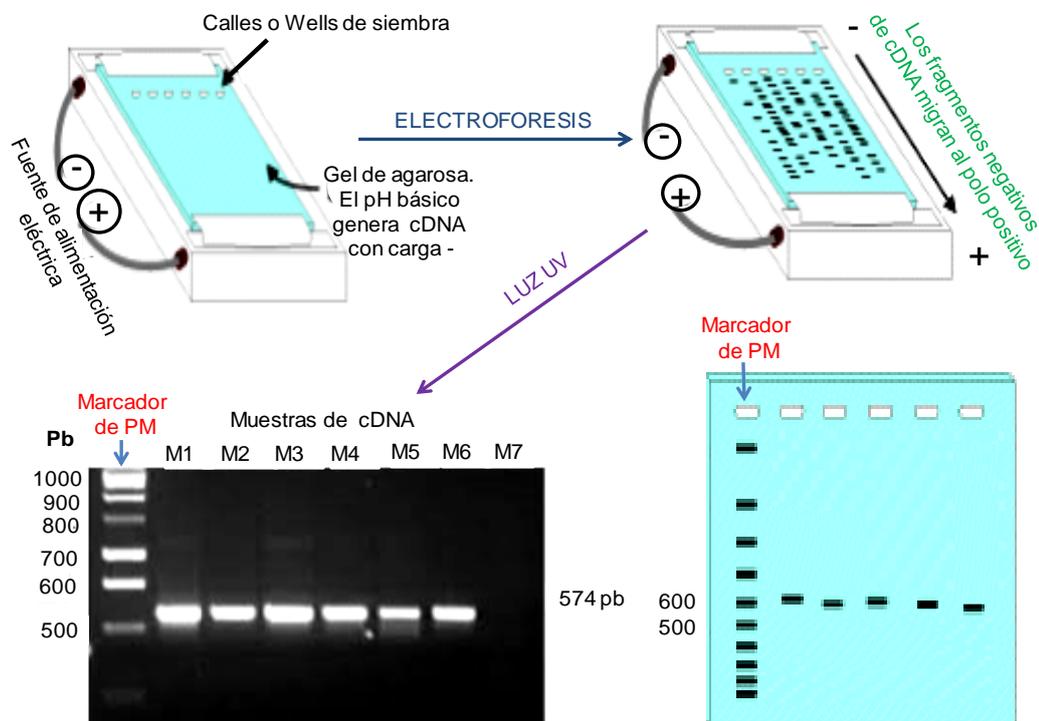
Gel de agarosa para visualización de bandas específicas: La preparación de 65 ml de gel de agarosa 3% de espesor 3-5 mm, requirió disolver 2 gramos de agarosa de origen nacional en 65 ml de buffer TAE 1X (0,04 M tris-acetato – 0,001 M EDTA). Se calentó a baño maría o microondas por 30 segundos hasta completa disolución, controlando que no se produzca ebullición ni formación de grumos. Se dejó enfriar hasta 60°C, y se volcó la disolución resultante en la cámara de gelificación previamente sellada con cinta de papel, colocando el peine en la parte superior para la formación de las calles (wells). Se dejó gelificar durante 60 minutos. Una vez gelificado, se retiró el peine y se quitó la cinta de papel de la cámara. Se dispuso el gel en la cuba electroforética, verificando que las calles queden del lado del cátodo (polo negativo). Se volcó aproximadamente 300 ml de buffer TAE 1 X en la cuba hasta cubrir ligeramente el gel y los pocillos, según se indica a continuación:



Para sembrar, las muestras de cDNA se trataron con buffer 5X Green GoTaq Reaction: a 2  $\mu$ l de buffer se le adicionó 8  $\mu$ l de muestra de cDNA. Se homogeneizó la mezcla sobre parafilm y se procedió a sembrar 10  $\mu$ l de mezcla/well, dejando libres las calles de los extremos. El primer well se destinó al marcador de PM de modo que en la primera calle se sembró 5  $\mu$ l de Lader de alto PM + 1  $\mu$ l de buffer 5X Green GoTaq Reaction. Las muestras fueron corridas a 120 V durante 35 min.

Al finalizar la corrida, se sumergió el gel en buffer TAE 1X, conteniendo 15  $\mu$ l de bromuro de etidio para teñir las bandas. La visualización se efectuó en un transiluminador UV marca Benchtop 2UV a 302 nm.

El procedimiento descrito se resume en la siguiente imagen (Fig. 70.3).



**Figura 70.3. Bandas de cDNA.** Se esquematiza la corrida electroforética de cDNA y la visualización de las bandas mediante luz UV. La primera calle se destinó al marcador de PM. Las muestras fueron corridas a 120 V durante 35 min.

**Primers para PCR:** Los primers empleados se diseñaron utilizando el programa BLAST del National Institute of Health (NIH), USA, disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Se consideraron productos de PCR mayores a 500 bp, y un rango de temperatura de annealing de cada par de primers (F y R) entre 60°C y 64°C. La lista de primers empleados en nuestros ensayos se indica en la Tabla 5.3.

**TABLA 5.3.** *Listado de primers.* Se indican los primers utilizados en las reacciones de PRC para investigar la expresión génica específica del fenotipo tumoral mamario. Los mismos fueron diseñados utilizando el programa BLAST del National Institute of Health (NIH), USA, disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

GEN TARGET	PRIMER	SECUENCIA 5'-----> 3'	T°C annealing	bp
β-actina	Forward	GGATGCAGAAGGAGATCACTG	60	90
	Reverse	CGATCCACACGGAGTACTTG		
ABCG2	Forward	GCTGTGGAGCTGTTCGTAGT	61,8	664
	Reverse	AGTCCGTTAAAGGGGGAAATTAAGA		
CUL3	Forward	TCCCCAGGTCTTCAGTGTGA	62,5	884
	Reverse	TTGGAAGCACAGAGGAACGG		
PTEN	Forward	GTGGTCTGCCAGCTAAAGGT	62,4	1000
	Reverse	AAGTGCAAAGGGGTAGGACG		
SPARC	Forward	TCTGGGTAGCACACAGCCTA	62,4	951
	Reverse	TCTCAAAGTCTCGGGCCAAC		
IGFBP5	Forward	CAGTATACCCATCACCCCGC	63,4	989
	Reverse	ACAGCTGACCTCCTCCGTAT		

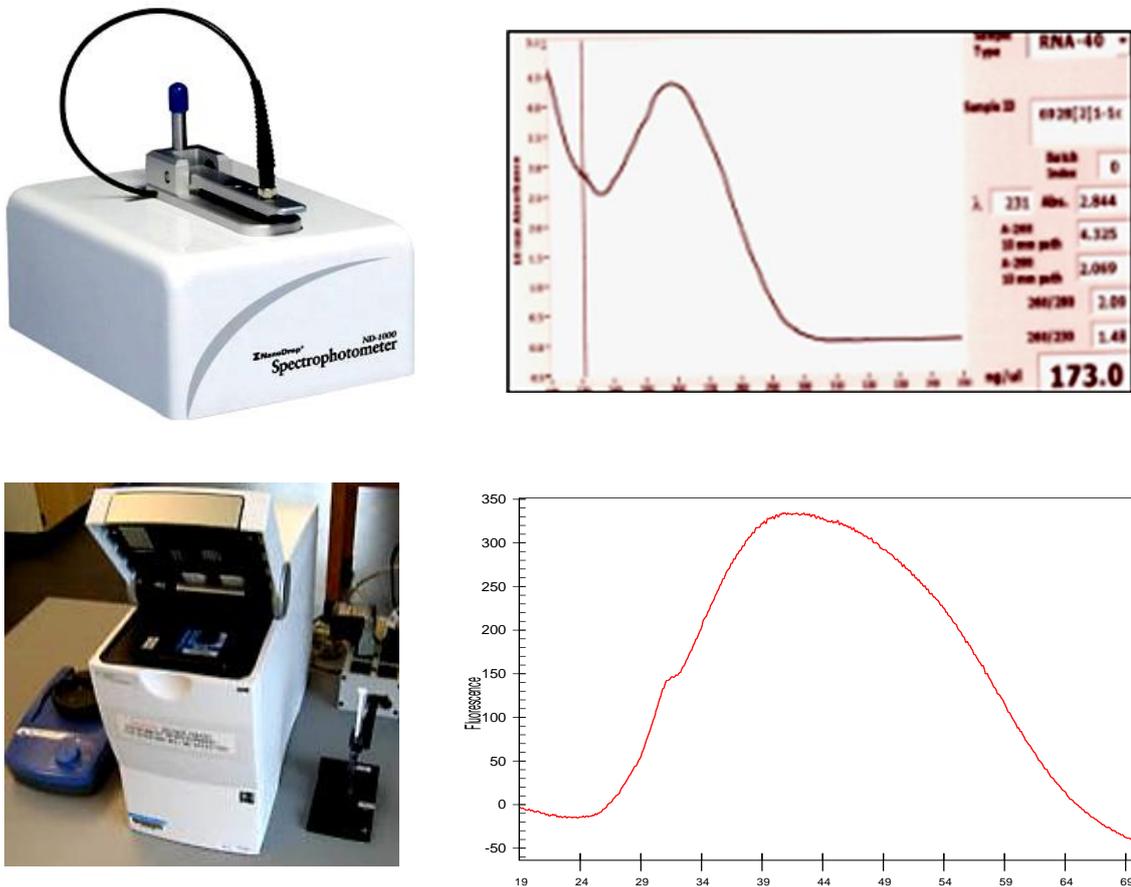
### III.6 ENSAYO DE MICROARREGLOS DE cDNA

La expresión génica diferencial de células tumorales mamarias MCF-7 tratadas con β-glucanos de Maitake, se investigó mediante ensayos de Microarreglos de cDNA (Microarrays). La técnica permite estudiar y cuantificar simultáneamente la expresión de miles de genes en un único ensayo, posibilitando la identificación de aquellos que se activan en forma diferencial a través de la comparación de tejidos sanos y enfermos [198].

En nuestro ensayo incubamos células MCF-7 por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake Standard, quedando establecidas las siguientes condiciones:

1. 0  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.
2. 36  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.
3. 91  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.
4. 183  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.
5. 367  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.

**Aislamiento de RNA.** El RNA total de células tumorales MCF-7 se aisló por duplicado con Trizol (Invitrogen, Inc) utilizando el método clásico de extracción con fenol-cloroformo [195]. La concentración del ácido ribonucleico se determinó mediante un espectrofotómetro de fluorescencia marca Nanodrop (Nanodrop Technologies, Inc), mientras que su pureza fue establecida a través de un Bioanalizador Agilent Technologies, todo ello con el fin de verificar rendimiento y calidad de la amplificación (Fig. 71.3).



**Figura 71.3.** Instrumentación para análisis de microarreglos. La concentración del RNA total aislado de células tumorales MCF-7 se determinó mediante un espectrofotómetro de fluorescencia marca Nanodrop (arriba), mientras que su pureza se verificó a través de un Bioanalizador marca Agilent (abajo).

**Amplificación.** Se amplificó el RNA total aislado de células tumorales MCF-7, a través de una técnica modificada RT-PCR, denominada Método dT-T7-PCR RNA amplification Balogh-Li-Russo Method (BLR). La misma tuvo por objeto mejorar la calidad de las sondas fluorescentes de las muestras utilizadas para hibridar los fragmentos de DNA monocatenario impresos en los wells del slide (microarrays). Se utilizó el kit *Advantage 2* (Clontech Laboratories, California, USA) que permitió realizar RT y PCR en un solo paso. Se sintetizó cDNA monocatenario a partir del mRNA de la muestra por retrotranscripción enzimática con RT (Invitrogen, California, USA) y primer oligodT. La técnica empleada se detalla a continuación.

Método modificado de amplificación de RNA dT-T7-PCR Balogh-Li-Russo Method (BLR): El procedimiento involucró tres pasos: 1) Síntesis de cDNA utilizando la enzima RT (Superscript de Invitrogen), 2) Amplificación basada en el primer Oligo dT-T7, y 3) Transcripción in vitro de cDNA en RNA. Se realizaron dos rondas de amplificaciones. Como referencia de las hibridaciones de los microarreglos, se amplificó de forma idéntica un RNA humano de referencia universal de Stratagene. El procedimiento implicó 4 pasos:

1) Reacción de retrotranscripción (RT). Se emplearon 50 ng de RNA total, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 6 mM, KCl 75 mM, DTT 2 mM, 1 mM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1 μM de cada uno de los primers 1 (Oligo dT-T7) y primer 2 (Interruptor II), y 1 μl de la enzima retrotranscriptasa Superscript II (Clontech Laboratories). Una mezcla de 10 μl de RNA total y primers fue calentada durante 8 minutos a 70°C, enfriada en hielo por al menos 2 minutos y centrifugada rápidamente antes de agregar los componentes restantes en un volumen final de 20 μl. La reacción transcurrió durante 2 horas a 42°C y finalizó a través de la inactivación por calor a 70°C durante 15 minutos. Los productos de la retrotranscripción se almacenaron a -20 ° C hasta su uso.

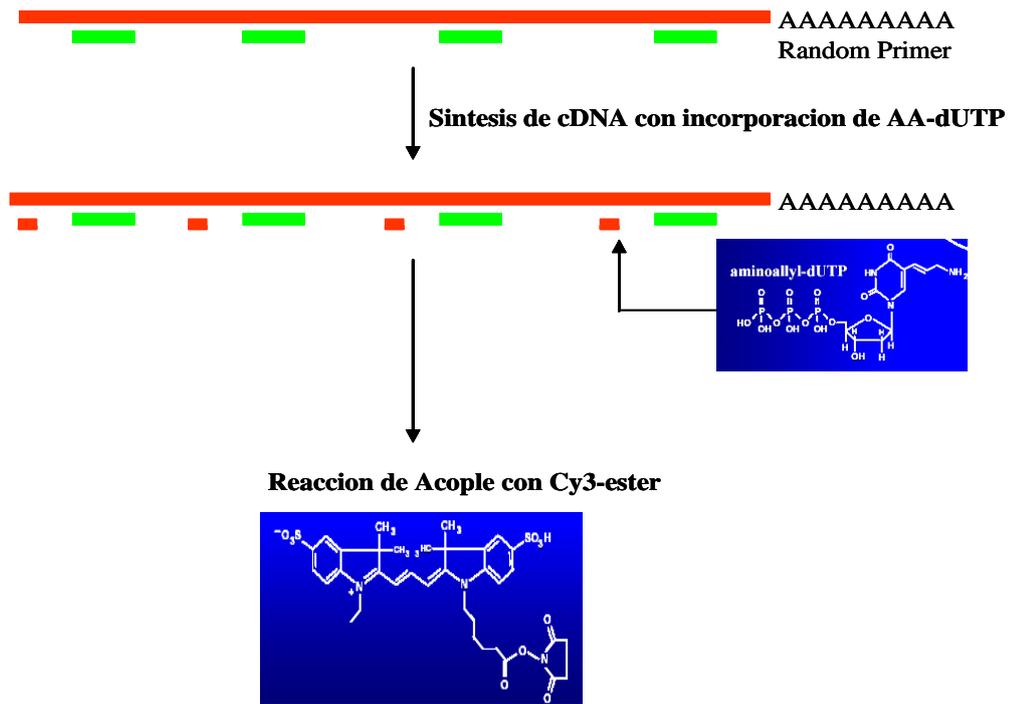
2) Reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó el kit de PCR Advantage 2 (Clontech Laboratories, California, USA) para sintetizar cDNA a partir de los productos de retrotranscripción ya descritos (cDNA de primera cadena). La reacción de 100 μl utilizó 7,5 μl de producto de retrotranscripción y 0,2 μM de cada uno de los primers 1 y 2. El proceso requirió un ciclo de 95°C durante 20 segundos, seguido de un total de 20 ciclos con cuatro temperaturas de recocido decrecientes (95°C por 5 segundos, 72-65°C durante 30 segundos, 68° C por un minuto, y un ciclo de extensión final de 6 minutos a 68°C). El producto de PCR se purificó utilizando el sistema de purificación de PCR rápida QIA (Qiagen) y se concentró secando la muestra hasta 8 μl.

3) Reacción de transcripción in vitro (TIV). Se utilizó el kit de transcripción de alto rendimiento AmpliScribe SP6 (Epicenter Technologies, Madison, WI) para preparar sRNA a partir de 20–500 ng de productos de PCR en una reacción con volumen de 20 μl a 37°C durante 4 horas. Luego de la digestión con DNAasa I, la extracción con fenol-cloroformo y la precipitación con etanol, el mRNA sedimentó, se lavó con etanol al 70%, se resuspendió en 20 μl de agua tratada con dietil pirocarbonato y se almacenó a -70°C hasta su empleo. Las dos rondas de RNA amplificado (aaRNA) por

metodología Lineal y BLR, se evaluaron por tamaño y rendimiento estimados utilizando el Bioanalizador (Agilent Technologies) (Fig. 71.3).

**Etiquetado e hibridación de los microarreglos.** A fin de estudiar si ambos métodos de amplificación de RNA están estrechamente relacionados con el RNA no amplificado, se efectuó la síntesis de sonda fluorescente para el RNA de RNA lineal del método BLR, y del RNA total sin amplificar, utilizando la metodología indirecta. Paralelamente, se sintetizó la sonda fluorescente a partir de la referencia universal de RNA humano (Stratagene, CA), a fin de utilizarla en el canal verde para hibridar con nuestras muestras. El etiquetado indirecto de las sondas con oligo-dT requirió de un primer para usar con un aaRNA; sin embargo, para el RNA no amplificado total se usó un primer aleatorio modificado con amina (2 µg/µl). Se emplearon 5-10 µg de RNA amplificado y 30 µg de RNA total como material de partida. Para el etiquetado, el RNA total y el aaRNA se combinaron con su primer respectivo, y la mezcla se incubó a 70°C durante 10 minutos; luego se enfrió en hielo por 10 minutos. Se añadió una solución de primer-RNA a la mezcla de retrotranscriptasa (5X tampón de primera hebra, 6 µl; 50X aa-dUTP / dNTPs (dATP 25 mM, dGTP y dCTP, dTTP 15 mM y 10 mM aminoallyl-dUTP), 0,6 µl; DTT, 0,1 M, 3 µl; retrotranscriptasa Superscript II (Invitrogen / Life Technologies), 2 µl) y se incubó a 42°C por 2 horas. La reacción incluyó el agregado de EDTA (0,5 M, 10 µl), y el RNA se hidrolizó con NaOH (1 M, 10 µl) a 65°C durante 30 minutos. Después de la precipitación de cDNA con etanol absoluto en presencia de glucógeno (20 µg / µl) y acetato sódico 3M (pH 4,5), el cDNA se precipitó por centrifugación a 13 000 rpm por 30 minutos y se lavó dos veces con etanol 70°. Se resuspendió el sedimento de cDNA en 7,5 µl de tampón de acoplamiento y se agregó 2,5 µl de colorantes fluorescentes preparados con **Cy3-ester** (para la referencia humana) o **Cy5-ester** (para las muestras) (Amersham), y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Después de la purificación de las sondas fluorescentes con el kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen), se las cuantificó utilizando el Nanodrop (Fig. 71). Se emplearon 40 pmoles de cDNA fluorescente por cada canal de micromatriz.

**Síntesis de las sondas fluorescentes.** Para generar sondas fluorescentes de cDNA bicatenario a partir del RNA amplificado que serán utilizadas en la hibridación de los genes impresos en los wells, se utilizó el método indirecto, el cual es muy usado por requerir menos concentración inicial de RNA que el método directo (25 µg para RNA total y de 3-5 µg para RNA amplificado). El método indirecto de síntesis implica dos pasos fundamentales: 1) Síntesis de cDNA con primer random o al azar, y 2) Reacción de acoplado con la molécula fluorescente de **Cy3-ester** o **Cy5-ester**, tal como se esquematiza a continuación:

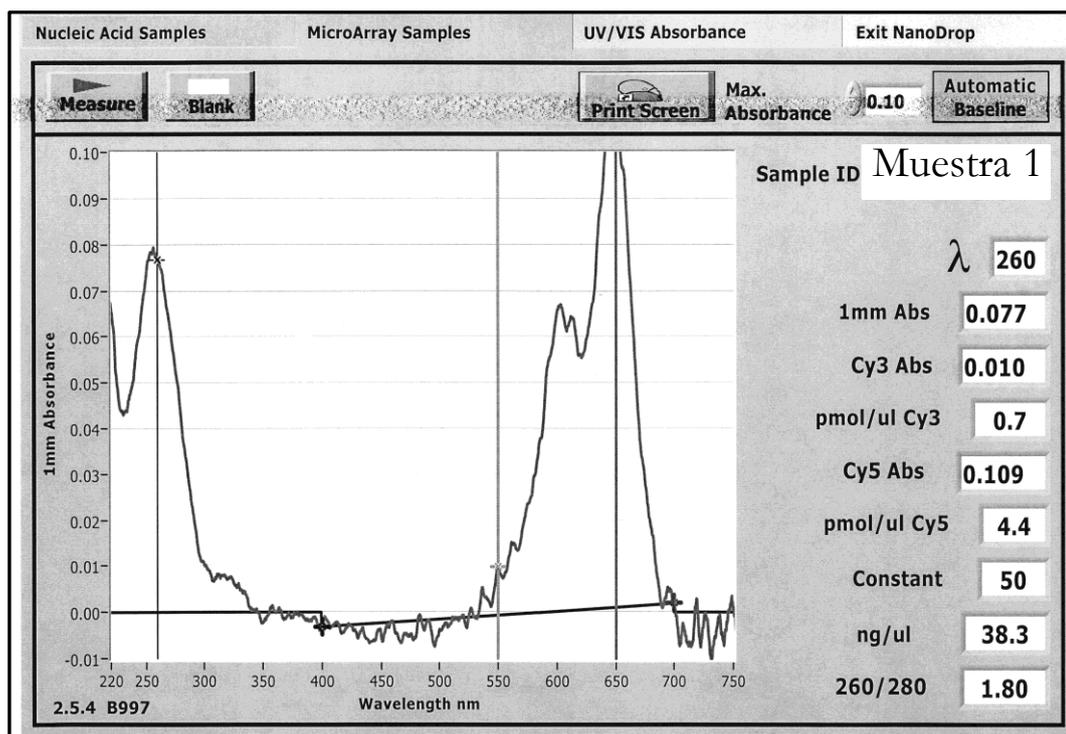


El RNA amplificado derivado de células tumorales MCF-7 se marcó con el fluoróforo **Cy5-dCTP** (Dexosi-Citocina) que fluórese rojo, mientras que el RNA del Control sano se marcó con **Cy3-dCTP** que fluórese verde. El Control sano consistió en una referencia universal de RNA humano de células mamarias normales (Invitrogen).

Durante el primer paso del método indirecto, el RNA fue amplificado a cDNA usando como primer una secuencia nucleotídica que reconoce al azar diferentes regiones de la cadena de RNA. El primer se unió y sirvió como plantilla para la amplificación de cDNA. La síntesis de cDNA involucró también una amino-allyl dUTP (dexosi-uracilo) o AA-dUTP como sustrato, la cual sirvió de "ancla" para la molécula fluorescente.

En el segundo paso del método, el cDNA se marcó con la sonda fluorescente en una reacción denominada de Acople, usando como fluorescente un compuesto de **Cy3-ester** o **Cy5-ester**. Se originó una unión específica con el AA-dUTP ubicado en la cadena de cDNA. Como resultado final se obtuvo cDNA con fluorescencia verde o roja.

**Cuantificación de las sondas.** Una vez sintetizada la sonda fluorescente de cDNA, se procedió a su cuantificación mediante un espectrofotómetro de fluorescencia marca Nanodrop (Nanodrop INC, Technology). La cuantificación de la sonda de cDNA se expresó en pmol/μl en cada canal (**Cy3** o **Cy5**), aunque también se indicó la concentración de cDNA en ng/μl, y la pureza de la misma en un ratio 260nm/280nm, tal como ilustra la siguiente imagen del Nanodrop:



El Nanodrop se empleó para la lectura de las absorbancias (Fig. 71). Previamente, debió usarse agua bidestilada como blanco, y luego colocar 1 $\mu$ l de cada muestra para medir la fluorescencia a dos longitudes de onda 550 nm para **Cy3** y 650 nm para **Cy5**. Por otra parte, se requirió cuantificar la pureza del cDNA a 260/280 nm. Los valores esperados para cada dye fluorescente se hallaron en un rango de 0,04 y 0,150 unidades de absorbancia, y 1,0 y 3,0 pmol/ $\mu$ l de **Cy3** o **Cy5**. Los valores de relación 260/280 nm esperables para el cDNA fueron de 1,8 y 2,0.

El **Cy5** de la muestra a investigar generó un valor de 4,4 pmol/ $\mu$ l, el cual debió multiplicarse por el volumen total de la sonda sintetizada, a fin de obtener la cuantificación total. La concentración de cDNA fue 38,3 ng/ $\mu$ l y la relación o ratio fue 1,80. Esto sugirió una buena calidad de la sonda obtenida, pudiendo emplearse para la hibridación del microarreglo. En nuestro ejemplo, el volumen total fue de 40  $\mu$ l, por lo cual la cantidad total de sonda se calculó como pmol de **Cy5** = 4,4 pmol/ $\mu$ l x 40  $\mu$ l total, es decir, pmol de **Cy5** total= 176. Para la hibridación del cDNA microarreglo fueron necesarios de 30-40 pmoles de sonda marcada con **Cy3**, y 30-40 pmoles de sonda marcada con **Cy5**.

**Hibridación y condiciones de lavado.** Se agregaron 4,5  $\mu$ l de salina de citrato sódico 20X (SSC) junto con 2  $\mu$ l de poli(A) (10 mg / ml), y 0,6  $\mu$ l de SDS 10% (m/v). Las sondas fueron desnaturalizadas a 95°C durante 3 min. Los productos se pipetearon en matrices, se aplicaron cubreobjetos y los portaobjetos se colocaron en una cámara de hibridación (Corning, Corning, NY). Las matrices se incubaron en baño de agua a 42°C

por un lapso de 16 h a 24 h, y posteriormente se lavaron con 0,5X SSC, SDS al 0,01% (m/v), seguido de 0,06X SSC, a temperatura ambiente durante 10 min cada uno. Seguidamente, los portaobjetos se colocaron en tubos de 50 ml y se giraron durante 5 min a 800 rpm (130 g) a temperatura ambiente.

Para la hibridación de los microarreglos de cDNA humano, fueron empleadas las sondas fluorescentes obtenidas previamente. Cada slide de vidrio fue hibridizado con dichas sondas empleando cajas de hibridación o chambers, en especial de la Compañía GeneMachines (Fig. 71.3).



**Figura 72.3.** Cámara de hibridación del microarreglo. Se emplearon las de la Compañía GeneMachines. La cámara contiene un espacio para la hibridación simultánea de dos microarreglos. Cada slide de vidrio fue hibridizado con las sondas fluorescentes previamente sintetizadas.

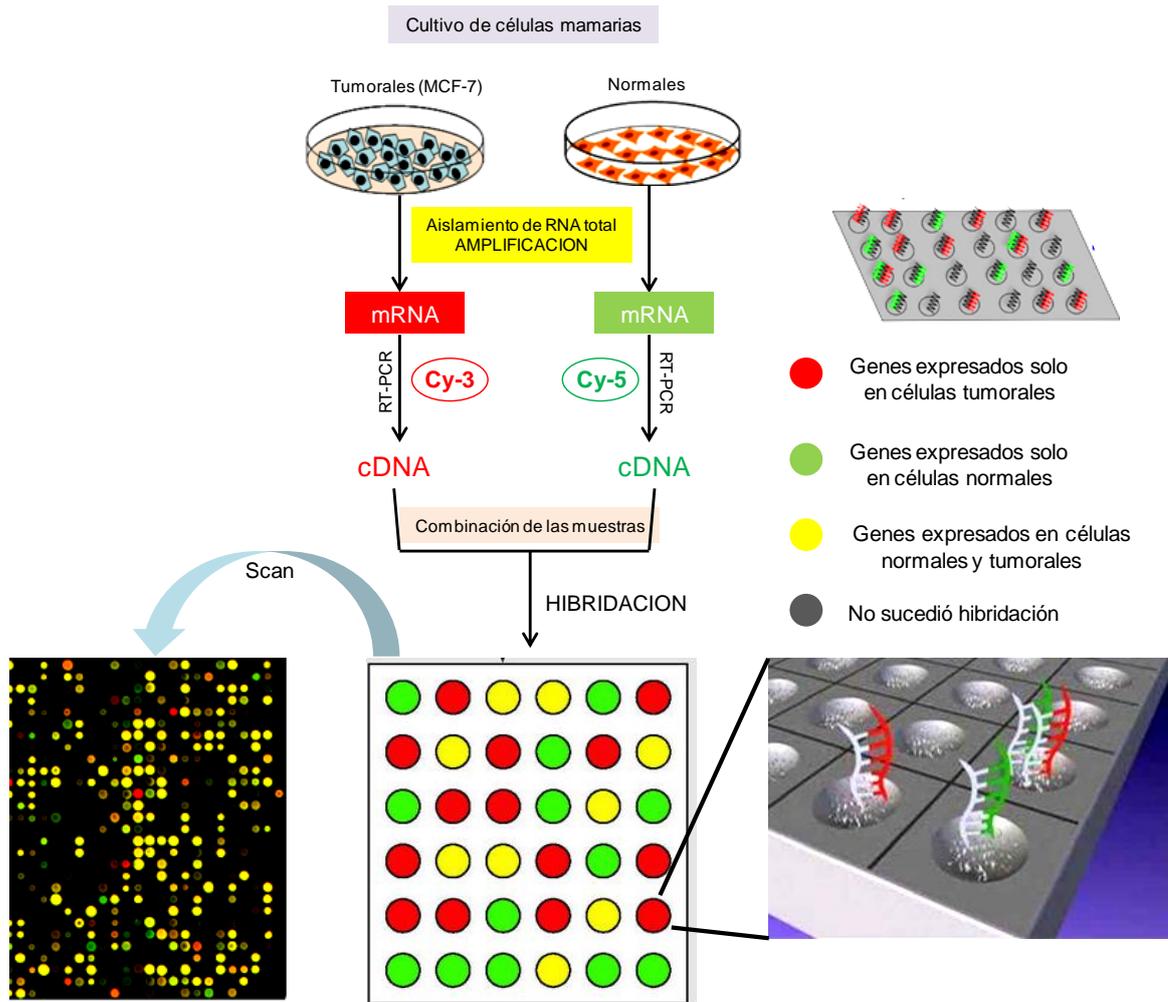
El protocolo de hibridación aplicado se detalla a continuación: se mezcló la cantidad de sonda fluorescente previamente obtenida (30 pmol/ $\mu$ l de Cy3 y 30 pmol de Cy5/ $\mu$ l, respectivamente). Posteriormente, la sonda fluorescente se deshidrató hasta sequedad utilizando una centrifuga de vacío. Se resuspendió la sonda en 35 ml de buffer de hibridación; la sonda fluorescente hidratada fue colocada sobre el slide de vidrio con los genes impresos hacia arriba. Se cubrió el área del microarreglo con cubreobjetos. Se cerró la cámara con su tapa cuidando de ajustarla correctamente para evitar la entrada de agua del baño de incubación. Luego se incubó a 42°C durante 16 -20 h con el microarreglo dispuesto hacia arriba (Fig. 73.3).



**Figura 73.3.** Hibridación de los microarreglos de cDNA. La imagen muestra la incubación en el baño de agua a 42°C durante 16 h -20 h con el microarreglo hacia arriba. La cámara fue cerrada con su tapa ajustando correctamente a fin de evitar la entrada de agua del baño.

Durante el proceso de hibridación, cada molécula de la sonda fluorescente se apareó con su cadena complementaria de cDNA monocatenaria impresa en el well (no ocurrió hibridación si la sonda fluorescente no halló su cadena complementaria). Los lavados que se indican a continuación tuvieron por finalidad eliminar las sondas no hibridizadas, de modo que solo fragmentos de DNA unidos permanecieron tras los lavados sucesivos.

El proceso de hibridación permitió identificar de entre miles de genes aquellos activados en forma diferencial en células tumorales, pero no en células normales [181], como así también verificar los efectos de sobre o subexpresión generados por el tratamiento con el extracto glicoproteico de *G. frondosa* sobre dichos genes (Fig. 74.3).



**Figura 74.3.** Hibridación de cDNA impreso. Cada molécula de la sonda fluorescente se apareó con su cadena complementaria de cDNA monocatenaria impresa en el well. No ocurrió hibridación si la sonda fluorescente no halló la cadena complementaria. El ensayo permitió analizar la expresión génica diferencial en células tumorales MCF-7 tratadas con  $\beta$ -glucanos de Maitake, como así también verificar los efectos de sobre o subexpresión génica.

**Disoluciones de lavado.** Para lavar los slides hibridizados, se debió retirar cuidadosamente cada slide de la cámara y colocarlos en los contadores de slides, que contenían soluciones de lavado previamente preparadas. Es importante destacar que el slide nunca fue secado al aire, de modo de evitar el deterioro génico e incremento del background. Las disoluciones de lavado fueron:

- **Lavado 1**, 22 ml de Solución de lavado GlassHyb
- **Lavado 2a**, 2 ml de Solución de lavado GlassHyb + 20 ml 1X SSC
- **Lavado 2b**, 2 ml de Solución de lavado GlassHyb + 20 ml 1X SSC
- **Lavado 3**, 22 ml de 0,1X SSC

Las mismas se emplearon del siguiente modo:

- 1) Se removió el slide la cámara y se colocó en el contenedor de slides con la solución de Lavado 1, se incubó por 10 min con agitación.
- 2) Usando fórceps, se transfirió el slide a la solución de lavado 2a. Se incubó por 10 min con agitación a temperatura ambiente.
- 3) Nuevamente con fórceps, se transfirió el slide a la solución de lavado 2b. Se incubó por 10 min con agitación a temperatura ambiente.
- 4) Con fórceps, se transfirió el slide a la solución de lavado 3. Se incubó durante 1 min con agitación a temperatura ambiente.
- 5) Se removió la solución de lavado 3, y se colocó brevemente en agua bidestilada.
- 6) Se procedió al secado de cada slide por centrifugación a 1500 G durante 8 min en microcentrífuga para slides de vidrio.

**Análisis y revelado.** Para revelar los genes hibridizados en los wells, se realizó un escáner del slide con una resolución de 10  $\mu\text{m}$  mediante un escáner óptico fluorescente marca *Affymetrix 428* (MWG Technologies, CA). El equipo consta de un tubo fotomultiplicador de voltaje variable ajustado para obtener la máxima intensidad de señal con saturación de la sonda fluorescente inferior al 1% (m/v). Este proceso permite localizar –en forma análoga a la microscopía confocal- sondas fluorescentes, información que se envía al ordenador para generar resultados [199] (Fig. 75.3).



**Figura 75.3.** Revelado de los microarreglos de cDNA. Detalle del escáner marca Affymetrix 428 (izquierda) y del escáner asociado a un ordenador (derecha), a partir del cual se realizó el revelado de genes hibridizados en los microarreglos, generando resultados que posteriormente fueron analizados e interpretados por el operador.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software de Biodiscovery CA, ImaGene versión 5.0 para las imágenes y GeneSight 4.2.0 para el análisis de datos. Estos se normalizaron mediante el Software Nexus Expression (Biodiscovery, CA). Se realizó un agrupamiento jerárquico utilizando el método de vecinos más cercanos y la correlación de Pearson. Se empleó además otro método de agrupamiento y otra función de distancia (como la Euclidiana).

Los genes con valor  $p < 0,05$  se consideraron diferencialmente expresados, manteniendo la proporción de falsos positivos del grupo seleccionado por debajo del valor umbral (5%). La expresión génica diferencial se determinó como  $\text{Log}_2$  de R (expresión génica relativa):

$$R = \frac{\text{Expresión génica en cada condición experimental}}{\text{Expresión génica en el Control}}$$

Siendo,

$R \geq 2$ : genes sobreexpresados respecto del control.

$R \leq -2$ : genes subexpresados respecto del control.

### III.7 ENSAYO FARMACOCINETICO Y DE BIODISTRIBUCION TISULAR DE $\beta$ -GLUCANOS

La cuantificación de 1,3- $\beta$ -D-glucanos en plasma sanguíneo y tejidos de ratones tratados con Maitake PRO4X, se determinó luego de la administración oral o intravenosa de una única dosis terapéutica del extracto glicoproteico (4  $\mu\text{l}$  de producto). Tras el sacrificio de los animales a tiempos preestablecidos, se colectaron muestras sanguíneas e histológicas para determinar concentración de 1,3- $\beta$ -D-glucanos por el método colorimétrico del kit GlucateLL. Dicho ensayo se realizó en el laboratorio *Cape Cod Inc, Maryland, USA*.

**Estudio en administración oral.** Se determinaron parámetros farmacocinéticos por vía oral, utilizando dos animales de ambos sexos por cada tiempo ( $n=18$ ). Se les administró 4  $\mu\text{l}$  de una única dosis terapéutica de Maitake PRO4X/ratón, correspondiente a aproximadamente 5 mg de  $\beta$ -glucanos/kg. Posteriormente, se procedió al sacrificio a los 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, 16 h, 24 h y 34 h de la ingesta oral, mediante asfixia por  $\text{CO}_2$  en cámara de eutanasia y posterior dislocación cervical para asegurar la muerte.

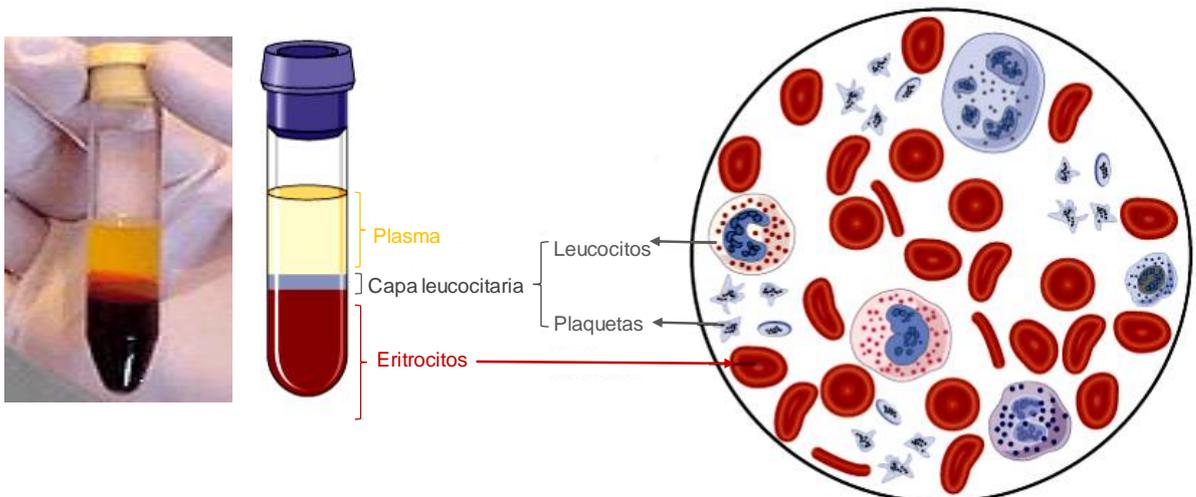
Se colectó la sangre periférica de las cavidades con micropipeta a la cual se le cortó la punta del tip para facilitar la aspiración, transfiriendo a un tubo estéril para

venopunción marca Vacutainer de 3,5 ml, el cual contaba en su interior con una sustancia gelatinosa de densidad intermedia entre células sanguíneas y plasma (Fig. 76.3).



**Figura 76.3.** *Recolección de sangre periférica murina.* La sangre colectada durante la autopsia de los animales se transfirió a tubos Vacutainer, los cuales a su vez se emplearon para la obtención de plasma sanguíneo por centrifugación.

Las muestras de sangre periférica fueron centrifugadas a 2300 rpm durante 10 min empleando una temperatura de 20°C. Esto permitió obtener un sobrenadante en la porción superior -por encima del gel del tubo Vacutainer- correspondiente al plasma sanguíneo, a partir del cual se realizó la determinación de 1,3- $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X (Fig. 77.3).



**Figura 77.3.** *Plasma sanguíneo murino.* El mismo se obtuvo luego de la centrifugación de las muestras de sangre periférica colectada durante la autopsia de los animales. Sobre el plasma obtenido se realizaron las cuantificaciones de 1,3- $\beta$ -glucano de Maitake PRO4X.

**Estudio en administración intravenosa.** Se determinaron parámetros farmacocinéticos por vía intravenosa, utilizando dos animales de ambos sexos por cada tiempo (n=18). La dosis administrada fue de 4  $\mu$ l de Maitake PRO4X - correspondiente a 5 mg  $\beta$ -glucanos/kg-, los cuales se llevaron a volumen final de 30  $\mu$ l con agua destilada. Para la administración se utilizaron jeringas de 1 ml (100 unidades) con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 mm x 25 mm (21Gx1). La administración se realizó a través de la vena marginal de la cola, en la cual se inyectó un volumen único de 30  $\mu$ l de forma lenta (Fig. 78.3).



**Figura 78.3.** Administración intravenosa de Maitake. La misma se realizó a través de la vena marginal de la cola de ratones BALB/c (derecha), empleando una jeringa de 1 ml (100 unidades) con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 mm x 25 mm (21Gx1) (izq.).

Previamente a la administración intravenosa, los animales fueron sometidos por unos instantes a la atmósfera de CO<sub>2</sub> en de la cámara de eutanasia, a fin de generar una ligera anestesia que facilite la administración. Los ratones fueron sacrificados a los 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, 16 h, 24 h y 34 h de la administración, empleando atmósfera de CO<sub>2</sub> en cámara de eutanasia, y posterior dislocación cervical para garantizar la muerte.

Durante la autopsia, se colectó la sangre periférica de las cavidades con micropipeta a la cual se cortó la punta del tip para facilitar la aspiración. La misma fue transferida a un tubo estéril para venopunción marca Vacutainer de 3,5 ml. Tras la centrifugación de la sangre a 2300 rpm durante 10 min a 20°C, se pudo obtener un sobrenadante en la parte superior del tubo -por encima del gel- correspondiente a plasma sanguíneo, sobre el cual se realizó la determinación de 1,3- $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X.

**Ensayo de biodistribución en administración oral.** Se investigó la captación de  $\beta$ -1,3-glucanos en los distintos órganos, como así también su acumulación y pasaje a través de la barrera hematoencefálica, luego de la ingesta oral.

Para ello, se emplearon dos animales de ambos sexos por cada tiempo (n=16), a los cuales se les administró por vía oral una única dosis terapéutica de 4  $\mu$ l de Maitake/ratón disueltos en 8  $\mu$ l de agua destilada, correspondo a 5 mg de  $\beta$ -glucanos/kg. Posteriormente, se procedió al sacrificio de los ratones a los 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 16 h, 24 h y 30 h de la administración oral, mediante asfixia con CO<sub>2</sub> en cámara de eutanasia y posterior dislocación cervical para garantizar la muerte.

Durante la autopsia, los órganos hepático, renal, gastrointestinal (duodeno y colon), pulmonar y cerebral removidos de cada ratón fueron dispuestos sobre una malla metálica humedecida con PBS frío, análoga a un colador. Mediante suaves movimientos circulares con el émbolo de la jeringa, se fue disgregando el órgano en el colador, colectando el homogenado en un tubo falcon. En el caso del tejido gastrointestinal, se eliminó previamente su contenido antes del procesamiento a fin de evitar aglomeraciones celulares. Con pipeta Pasteur, se efectuaron 3 lavados de 1 ml cada uno de PBS frío, a fin de facilitar la disgregación; el homogenado se mantuvo en hielo. Con jeringa de 10 ml y aguja 27 G se realizaron varios pasajes de aspiración-expulsión del filtrado tisular, de modo de generar total homogeneización y rompimiento de cualquier acúmulo celular. Posteriormente, se centrifugó a 1000 rpm durante 7 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 4 ml de PBS + SFB 1%, y se conservó en frízer a -80°C para la posterior cuantificación de los  $\beta$ -glucanos del extracto glicoproteico.

**Ensayo de biodistribución en administración intravenosa.** Se investigó la captación de  $\beta$ -1,3-glucanos en los distintos órganos, como así también su acumulación y pasaje a través de la barrera hematoencefálica, luego de la administración intravenosa. Para ello, se emplearon dos animales de ambos sexos para cada tiempo (n=16), a los cuales se les inyectó en la vena marginal de la cola una única dosis de 30  $\mu$ l de sustancia compuesta por 4  $\mu$ l de Maitake PRO4X -equivalente a 5 mg de  $\beta$ -glucanos/kg-, llevados a volumen de 30  $\mu$ l con agua destilada.

Para ello, se utilizaron jeringas de 1 ml con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 mm x 25 mm (21Gx1). Antes de inyectar los animales, se los mantuvo por unos instantes en cámara de eutanasia bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> a fin de generar una ligera anestesia que facilite la administración intravenosa. Los animales fueron posteriormente, sacrificados a los 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 16 h, 24 h y 30 h de la administración mediante asfixia con CO<sub>2</sub> en cámara de eutanasia y posterior dislocación cervical para garantizar la muerte.

Los órganos hepático, renal, gastrointestinal (duodeno y colon), pulmonar y cerebral removidos de cada ratón se procesaron como se describió más arriba en el ensayo de biodistribución oral, a fin de cuantificar los  $\beta$ -glucanos presentes en cada uno de ellos.



## **IV- RESULTADOS EXPERIMENTALES**



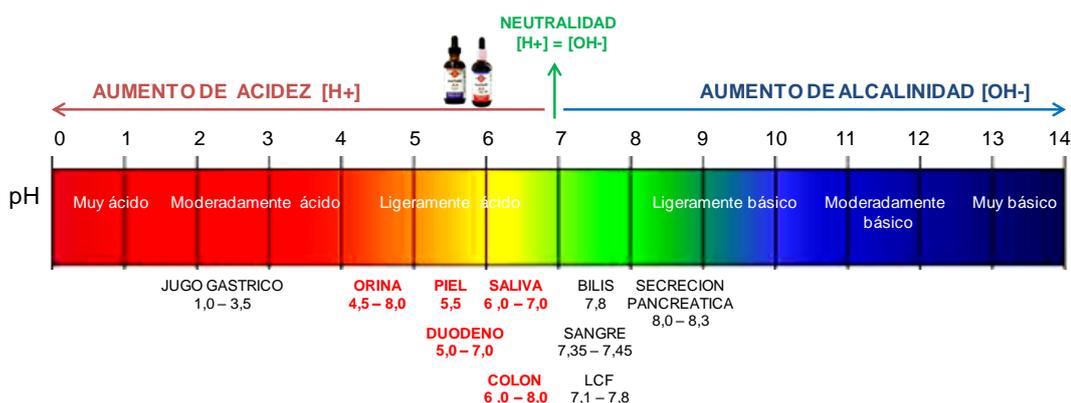
## IV.1 RESULTADOS DE ESTUDIOS FISICOQUIMICOS

### IV.1.1 pH

La naturaleza ácida o alcalina de los extractos purificados Maitake Standard y PRO4X de *G. frondosa*, se determinó por medición del pH a dos temperaturas diferentes (20°C y 37°C) por método potenciométrico a través de un pH-metro marca *Accumet, Fisher Scientific, USA*, empleando 3 puntos de calibración y exactitud de  $\text{pH}=0,01$ . Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.4 y la Fig. 1.4.

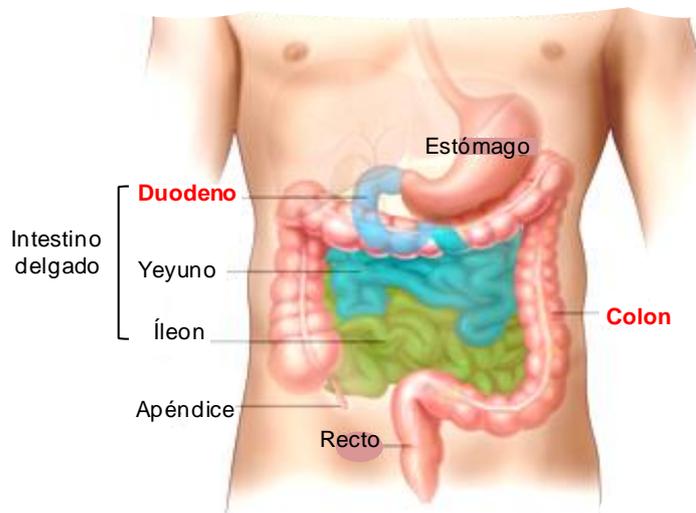
**Tabla 1.4.** *Determinación de pH.* Las mediciones de ambos extractos se realizaron a 20 °C y 37°C utilizando un pH-metro marca Accumet. Se indica además la concentración total de  $\beta$ -glucanos declaradas en los rótulos de los envases de 60 ml en ambas presentaciones comerciales.

EXTRACTO PURIFICADO DE MAITAKE	STANDARD	Pro4X
		
pH a 20 °C	5,63	5,82
pH a 37°C	5,64	5,77
CONCENTRACION $\beta$ -GLUCANOS (ROTULO)	450 mg/60 ml	1800 mg/60 ml



Los resultados de pH Consignados en la Tabla 1.4 indicaron un pH ácido para ambas versiones comerciales del extracto purificado, siendo 5,6 para Maitake Standard y 5,8 para Maitake PRO4X.

Considerando la vía oral de administración, hemos observado que los órganos gastrointestinales con pH cercano al de los extractos fueron Duodeno y Colon (Fig. 1.4).



**Figura 1.4.** Administración oral de Maitake. Considerando la vía oral de administración, los órganos gastrointestinales con pH similar al de los extractos purificados fueron colon y duodeno.

#### IV.1.2 Polaridad/solubilidad

La polaridad de ambos extractos de Maitake, se estableció por disolución de las muestras comerciales en disolventes de polaridad creciente. Se verificó si resultaron solubles, muy solubles, poco solubles o insolubles. Los resultados se indican en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4.** Polaridad/solubilidad de Maitake. Se verificó la solubilidad de las versiones comerciales Maitake Standard y PRO4X en disolventes de polaridad creciente.

Disolventes de polaridad creciente	Versiones comerciales del extracto purificado de Maitake	
	Maitake Standard	Maitake Pro4X
n-hexano	Insoluble	Insoluble
Acetato de etilo	Insoluble	Insoluble
Acetona	Soluble	Insoluble
Etanol	Soluble	Soluble
Metanol	Muy soluble	Muy soluble
Agua destilada	Muy soluble	Muy soluble

Aumento de la polaridad del disolvente ↓

↓ Aumento de la solubilidad de Maitake

Los resultados de la Tabla 2.4 de polaridad/solubilidad de los extractos purificados de Maitake en disolventes de polaridad creciente, demostraron que ambos extractos resultaron muy solubles en solventes polares, e insolubles en solventes apolares. Esto sugiere naturaleza hidrofílica y polar de las versiones comerciales.

La solubilidad en acetona, un solvente polar aprótico (sin enlaces O-H, N-H), fue diferencial para ambos extractos. Mientras que Maitake PRO4X resultó insoluble, la versión Standard fue soluble. Seguidamente, para verificar la relación solubilidad con nivel de  $\beta$ -glucanos, se realizó una dilución acuosa 1:4 de Maitake PRO4X; se tomó una alícuota de esta dilución en volumen similar al ensayado para Maitake Standard y se la disolvió en acetona, resultando soluble .

La disolución en solventes apolares (n-hexano y acetato de etilo), dio lugar a la formación de una fase superior insoluble de Maitake (sistema heterogéneo). En el caso del etanol, ambos extractos generaron un sistema homogéneo.

**Solubilidad de Maitake PRO4X.** Los resultados de solubilidad de Maitake PRO4X en sustancias hidrosolubles o liposolubles, de naturaleza ácida o alcalina, se resumen en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** *Solubilidad de Maitake PRO4X.* Se examinó su solubilidad en disolventes de carácter ácido o alcalino. Los resultados obtenidos se consignaron como soluble, muy soluble, poco soluble o insoluble.

Disolvente	Maitake Pro4X
Agua destilada	Muy soluble
Acido clorhídrico	Muy soluble
Bicarbonato al 7,5%	Soluble
Aceite	Insoluble



Los resultados de la Tabla 3.4 respecto de la solubilidad de Maitake PRO4X en disolventes de carácter ácido o alcalino, demostraron alta solubilidad en sustancias de pH ácido (ácido clorhídrico) y neutro (agua destilada). Se observó solubilidad en bicarbonato 7,5 % (m/v) (pH alcalino), con ligera ionización del extracto en forma de pequeños precipitados blanquecinos. Maitake PRO4X resultó insoluble en sustancias liposolubles (aceite).

#### IV.1.3 Cuantificación de 1,3-β-glucanos

El contenido total 1,3-β-glucanos de ambas versiones comerciales del extracto purificado de Maitake (Standard y PRO4X), se determinó mediante un ensayo cuantitativo a través del método colorimétrico *Megazyme* (Mushroom and yeast β-glucan). Las muestras de ambos extractos fueron tratadas como se describió en la sección *Materiales y Métodos*, y las absorbancias leídas a 510 nm de longitud de onda, consignándose los resultados en la Tabla 4.4.

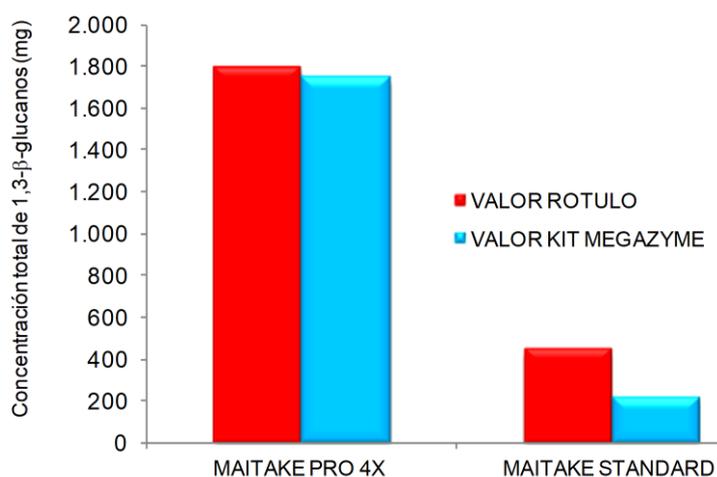
**Tabla 4.4.** Valores de absorbancia medidos a 510 nm. Los mismos corresponden a ambas versiones comerciales del extracto purificado de Maitake. El ensayo se realizó por triplicado con el método colorimétrico del kit enzimático *Megazyme*. La absorbancia a 510 nm se indicó como media  $\pm$  2 desvíos estándar.

RESULTADOS DE ABSORBANCIA A 510 nm				
	Réplica N° 1	Réplica N° 2	Réplica N° 3	Abs $\pm$ DS
BLANCO DE REACTIVOS	0,2016	0,2024	-	0,2020 $\pm$ 0,0006
MAITAKE PRO 4X	1,0045	0,9110	0,8570	0,9242 $\pm$ 0,0661
MAITAKE STANDARD	0,3079	0,3014	0,2764	0,2952 $\pm$ 0,0046
PATRON	0,9957	-	-	0,9957 $\pm$ 0,0000

Con los resultados de absorbancia de la Tabla 4.4, se calculó la concentración total de 1,3-β-glucanos de ambas versiones comerciales de Maitake (Tabla 5.4, Fig. 2.4).

**Tabla 5.4.** Concentración total de 1,3- $\beta$ -glucanos. Los mismos corresponden a las muestras comerciales Standard y PRO4X de Maitake. El ensayo se realizó por el método colorimétrico del kit enzimático Megazyme midiéndose las absorbancias de las muestras a 510 nm.

CONCENTRACION TOTAL DE 1,3- $\beta$ -GLUCANOS		
PRODUCTO COMERCIAL	MAITAKE PRO 4X	MAITAKE STANDARD
VALOR DECLARADO EN ROTULO COMERCIAL	1800 mg $\beta$ -gluc/60 ml	450 mg $\beta$ -gluc/60 ml
VALOR OBTENIDO DEL ENSAYO COLORIMETRICO	1747,20 mg $\beta$ -gluc/60 ml	225,42 mg $\beta$ -gluc/60 ml
% $\beta$ -GLUCANOS RESPECTO DEL ROTULO	97,07%	50,09%



**Figura 2.4.** Concentración total de glucanos  $\beta$ -1,3. La figura compara la concentración de los mismos declarada en el rótulo y según el ensayo colorimétrico del kit Megazyme, en ambas versiones comerciales de Maitake.

Los resultados consignados en la Tabla 5.4 y la Fig. 2.4 respecto de la concentración total de  $\beta$ -1,3-glucanos presentes en los extractos Standard y PRO4X de Maitake, demostraron que la concentración de total de los mismos determinada por el método colorimétrico *Megazyme (Mushroom and yeast  $\beta$ -glucan)* coincidió en un 97,07% con lo declarado en el rótulo para Maitake PRO4X. Mientras que para Maitake Standard, solo se observó la mitad de la concentración de  $\beta$ -glucanos declarada en el rótulo (50,09%).

## IV.2 RESULTADOS DE ESTUDIOS *IN VITRO*

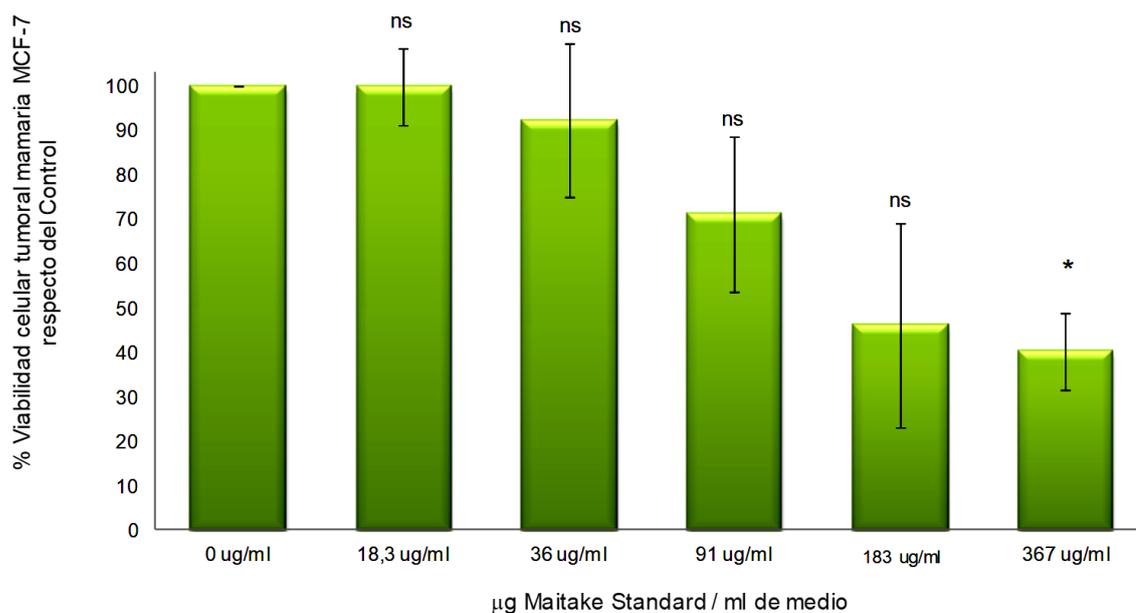
### IV.2.1 Ensayo dosis-respuesta

El efecto de distintas concentraciones de Maitake Standard sobre la viabilidad de células tumorales mamarias humanas MCF-7 en cultivo *in vitro*, se estudió mediante el método de biorreducción mitocondrial MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)], utilizando el kit colorimétrico *Cell Titer 96® Aqueous One* (Promega, Madison, USA) tal como se describió en la sección *Materiales y Métodos*.

Cultivos *in vitro* de células tumorales MCF-7 fueron tratados por 24 horas con concentraciones crecientes del extracto glicoproteico de Maitake Standard: 0 µg/ml (Control sin tratar), 18,3 µg/ml, 36 µg/ml, 91 µg/ml, 183 µg/ml y 367 µg/ml de medio de cultivo. Se adicionó un pequeño volumen de reactivo *Cell Titer 96® Aqueous One* a los cultivos de células tumorales MCF-7 y se leyó la absorbancia a 490 nm. Los resultados obtenidos se consignan en la Tabla 6.4 y la Fig. 3.4.

**Tabla 6.4.** % células tumorales MCF-7 vivas. Se indican las células que sobrevivieron al tratamiento con Maitake Standard. El ensayo se realizó por triplicado con el método colorimétrico de biorreducción mitocondrial de MTS. Los resultados se indicaron como media  $\pm$  2 desvíos estándar. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

%Células MCF-7 vivas respecto del Control	
GRUPOS EXPERIMENTALES	MEDIA $\pm$ DS
Control sin tratar (0 µg/ml Maitake)	100 $\pm$ 0
Tratado 18,3 µg/ml Maitake	100 $\pm$ 8,65
Tratado 36 µg/ml Maitake	92,31 $\pm$ 17,31
Tratado 91 µg/ml Maitake	71,15 $\pm$ 17,31
Tratado 183 µg/ml Maitake	46,15 $\pm$ 23,08
Tratado 367 µg/ml Maitake	40,38 $\pm$ 8,65 (* vs Control)



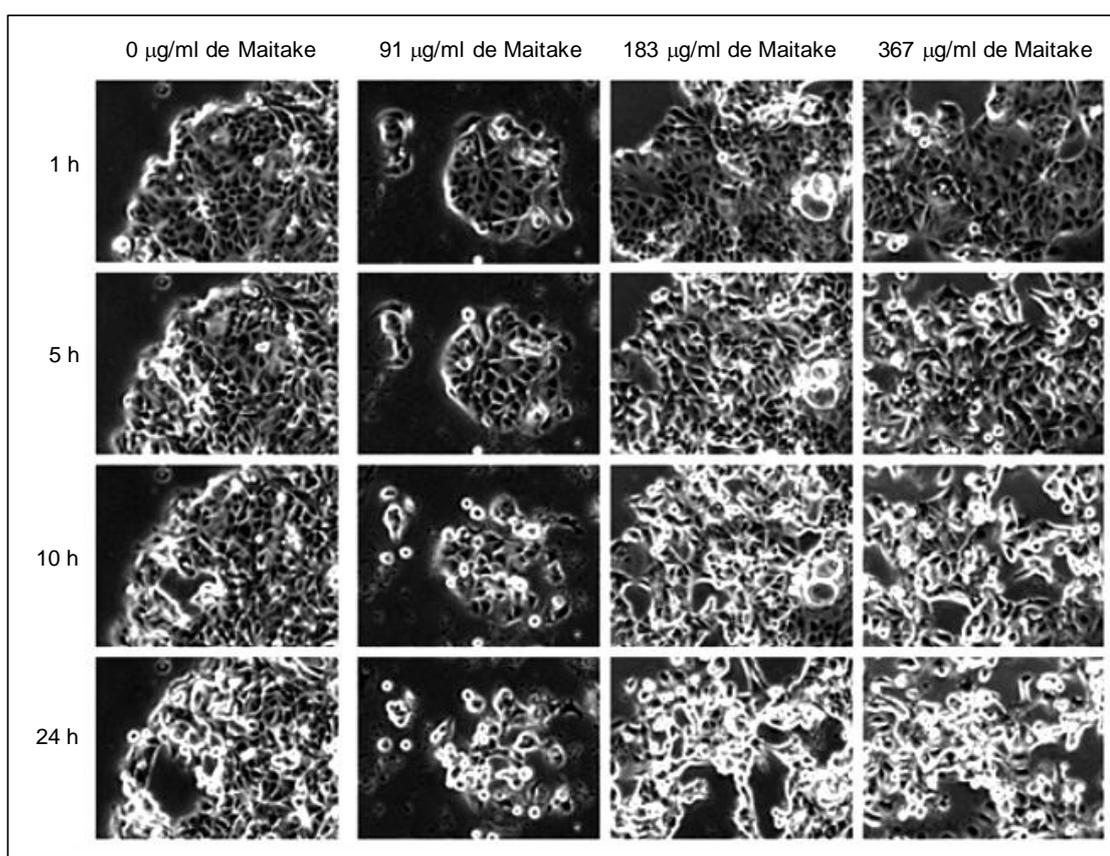
**Figura 3.4.** Efecto de Maitake Standard en células tumorales MCF-7. Las mismas fueron tratadas con dosis crecientes de Maitake Standard, a los fines de verificar su viabilidad. El ensayo se realizó por triplicado con el método colorimétrico de biorreducción mitocondrial de MTS. Los resultados se indicaron como media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ) entre los distintos grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Tabla 6.4 y la Fig. 3.4 respecto de la viabilidad celular tras la incubación con Maitake Standard, sugieren que el extracto glicoproteico estudiado tendió a reducir la viabilidad de las células tratadas respecto del Control a partir de la dosis de 36  $\mu\text{g/ml}$ , aunque sin significancia estadística (ns,  $p > 0,05$ ). En ese sentido, se observó menor viabilidad de las células tumorales al aumentar la concentración de Maitake Standard, aunque sin significancia estadística (ns,  $p > 0,05$  vs Control). Sin embargo, a la máxima concentración de Maitake ensayada (367  $\mu\text{g/ml}$ ), le correspondió el valor porcentual más bajo de viabilidad celular ( $40,38 \pm 8,65$  %) con significancia estadística ( $*p < 0,05$  vs Control).

#### IV.2.2 Microscopía Time Lapse

El estudio tuvo por finalidad establecer si el tratamiento con el extracto glicoproteico de Maitake Standard era capaz de inducir directamente muerte de células tumorales MCF-7. Para ello, se realizaron 3 experimentos independientes, en los cuales se trató a las células tumorales MCF-7 con concentraciones crecientes de Maitake Standard. El microscopio Time Lapse fue registrando imágenes con amplificación 20X de los cultivo a intervalos preprogramados de 10 minutos en un período total de 24 horas. Con dichas microfotografías se realizó un montaje para una secuencia de video (Fig. 4.4).

#### CELULAS TUMORALES MCF-7 TRATADAS POR 24 HORAS CON MAITAKE STANDARD ( $\mu\text{g/ml}$ )

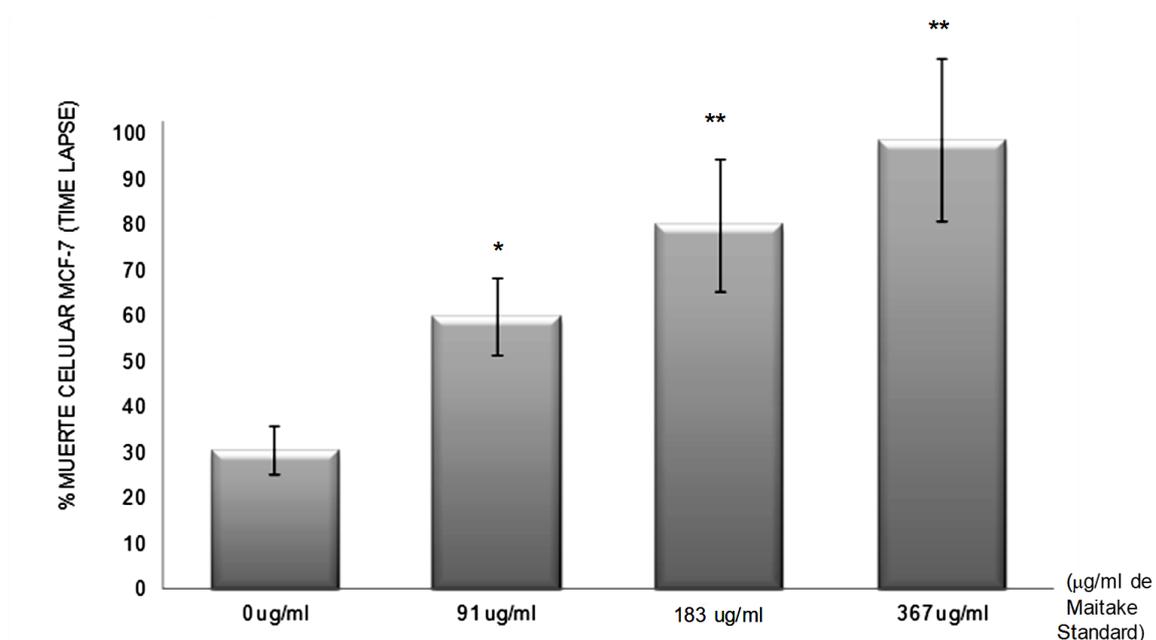


**Figura 4.4.** *Ensayo Time-Lapse.* El mismo corresponde a células tumorales MCF-7 tratadas con dosis crecientes de Maitake Standard. La figura muestra microfotografías 20X tomadas a distintos tiempos de las células tumorales Control y Tratadas con las concentraciones indicadas del extracto rico en  $\beta$ -glucanos.

Las microfotografías de muerte celular consignadas en la Fig. 4.4 obtenidas de microscopía Time-Lapse, permitieron armar una secuencia de video para verificar los porcentajes de muerte celular indicados en la Tabla 7.4 y la Fig. 5.4.

**Tabla 7.4.** Porcentaje de muerte de células tumorales MCF-7. Los cultivos *in vitro* fueron tratados por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake Standard. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como % de muerte celular, observándose diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$ ) entre los grupos experimentales.

% Células muertas MCF-7 (ensayo Time Lapse)	
GRUPOS EXPERIMENTALES	MEDIA $\pm$ DS
Control sin tratar (0 $\mu\text{g/ml}$ Maitake)	30,67 $\pm$ 5,33
Tratado 91 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	60,00 $\pm$ 8,48 (* vs Control)
Tratado 183 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	80,00 $\pm$ 14,43 (** vs Control)
Tratado 367 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	98,68 $\pm$ 17,76 (** vs Control)



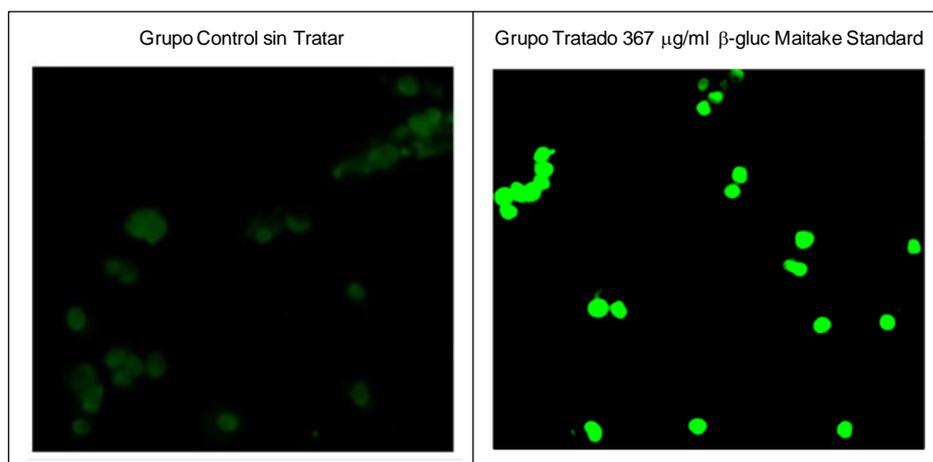
**Figura 5.4.** Porcentaje de muerte de células tumorales MCF-7. Las mismas fueron tratadas por 24 horas con concentraciones crecientes de Maitake Standard. El ensayo se realizó por triplicado empleando microscopía Time-Lapse. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$  vs control) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$  vs control) entre los grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Tabla 7.4 y la Fig. 5.4 respecto de la muerte de células tumorales MCF-7 tras el tratamiento con concentraciones crecientes de Maitake Standard, demostraron que el aumento de la dosis del extracto rico en  $\beta$ -glucanos incrementa significativamente el porcentaje de muerte celular, de forma dosis-dependiente (con  $*p < 0,05$  y  $**p < 0,01$ ). La máxima concentración estudiada del extracto de Maitake ( $367 \mu\text{g/ml}$ ) indujo el valor porcentual más alto de muerte de células tumorales MCF-7 ( $98,68 \pm 17,76 \%$ ) con significancia estadística ( $**p < 0,01$  vs Control). Esto coincide con los resultados del estudio de viabilidad de células tumorales MCF-7 tratadas con Maitake, en el cual la dosis de  $367 \mu\text{g/ml}$  del extracto indujo el porcentaje más bajo de viabilidad de células tumorales MCF-7 (con  $*p < 0,05$ ).

#### IV.2.3 Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) tuvo por finalidad verificar la existencia de un mecanismo apoptótico de muerte celular vinculado al tratamiento con Maitake, a fin de asociarlo con la reducción de la viabilidad celular y el aumento de muerte de células tumorales MCF-7 en los resultados previamente descriptos.

El ensayo TUNEL se realizó por triplicado en cultivos *in vitro* de células tumorales MCF-7 tratadas por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake Standard, tal y como se describió en la sección *Materiales y Métodos*. La inmunofluorescencia verde que generan las células apoptóticas se detectó mediante un microscopio óptico de fluorescencia Olympus, BH-2, UK (Fig. 6.4).

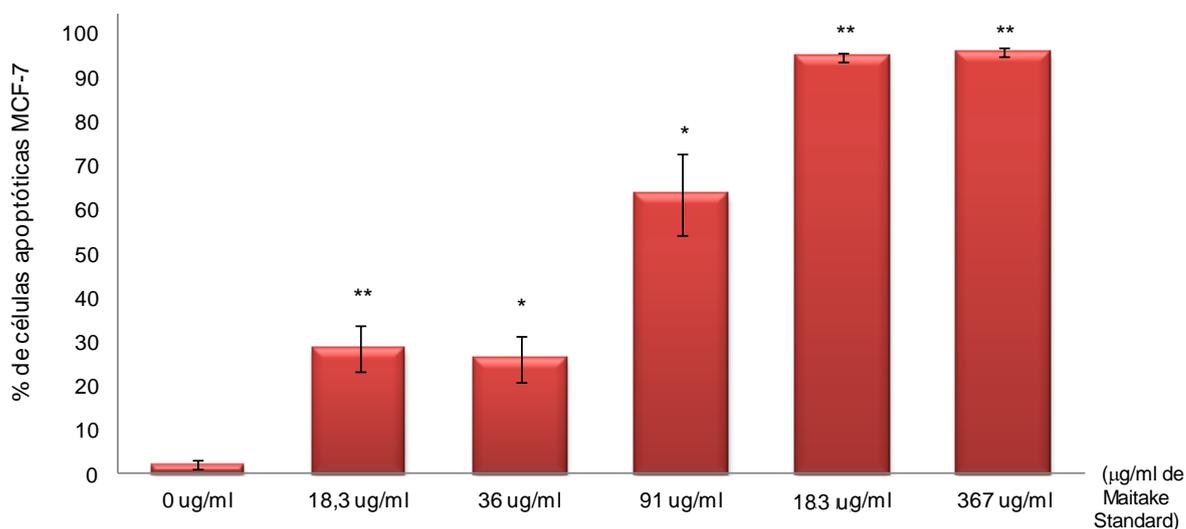


**Figura 6.4.** *Ensayo TUNEL.* El mismo indica células tumorales MCF-7 en apoptosis. La inmunofluorescencia verde de las células apoptóticas tratadas con Maitake Standard se detectó con un microscopio óptico de fluorescencia Olympus, BH-2, UK luego de la incubación por 24 horas con  $367 \mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard.

Los resultados de apoptosis del ensayo TUNEL se resumen en la Tabla 8.4 y la Fig. 7.4.

**Tabla 8.** Porcentaje de células apoptóticas MCF-7. Se indica el % de apoptosis tras el tratamiento con concentraciones crecientes de Maitake Standard. El ensayo enzimático TUNEL se realizó por triplicado. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, demostraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$ ) respecto del grupo Control.

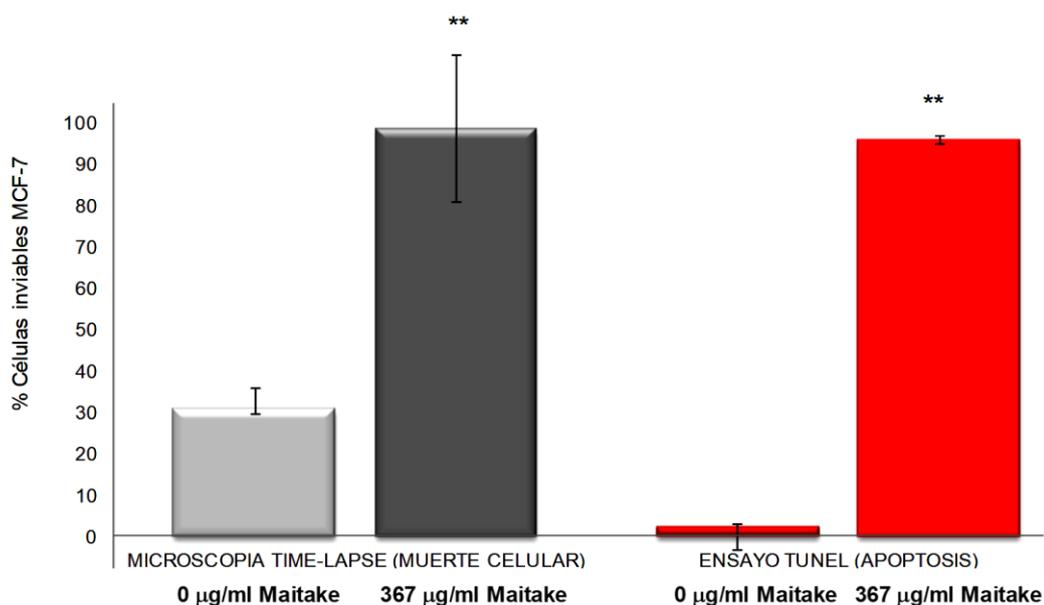
% Células apoptóticas MCF-7 (ensayo TUNEL)	
GRUPOS EXPERIMENTALES	MEDIA $\pm$ DS
Control sin tratar (0 $\mu\text{g/ml}$ Maitake)	2,08 $\pm$ 1,04
Tratado 18,3 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	28,65 $\pm$ 5,21 (** vs Control)
Tratado 36 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	26,04 $\pm$ 5,21 (* vs Control)
Tratado 91 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	63,54 $\pm$ 9,38 (* vs Control)
Tratado 183 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	94,79 $\pm$ 1,04 (** vs Control)
Tratado 367 $\mu\text{g/ml}$ Maitake	95,83 $\pm$ 1,04 (** vs Control)



**Figura 7.4.** Apoptosis de células tumorales MCF-7. Se indica el porcentaje de células apoptóticas MCF-7 tratadas con concentraciones crecientes de Maitake Standard en el ensayo TUNEL. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$ ) respecto del grupo Control.

Los resultados consignados en la Tabla 8.4 y la Fig. 7.4 respecto de la apoptosis de células tumorales inducida por Maitake, indicaron que el aumento de la dosis del extracto glicoproteico incrementó el % de apoptosis MCF-7 de forma dosis-dependiente con significancia estadística (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ), encontrándose una relación de proporcionalidad directa a partir de la concentración de 36  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake. La máxima dosis del extracto estudiada (367  $\mu\text{g/ml}$ ) indujo el mayor porcentaje de apoptosis celular MCF-7 ( $95,83 \pm 1,04$  %) con significancia estadística (\*\* $p < 0,01$  vs Control).

Los resultados obtenidos son semejantes a los del ensayo Time-Lapse de muerte tumoral: 367  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard inducen un 98,68% de muerte tumoral, mientras que el ensayo TUNEL indica que 367  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard induce un 95,83 % de muerte apoptótica. Estos resultados sugieren que el 95% de la muerte tumoral inducida por Maitake Standard (98,68 %) se debe a un proceso apoptótico. Mientras que el 2% de las muertes del grupo Control (30%) se deben a un proceso apoptótico (Fig. 8.4).

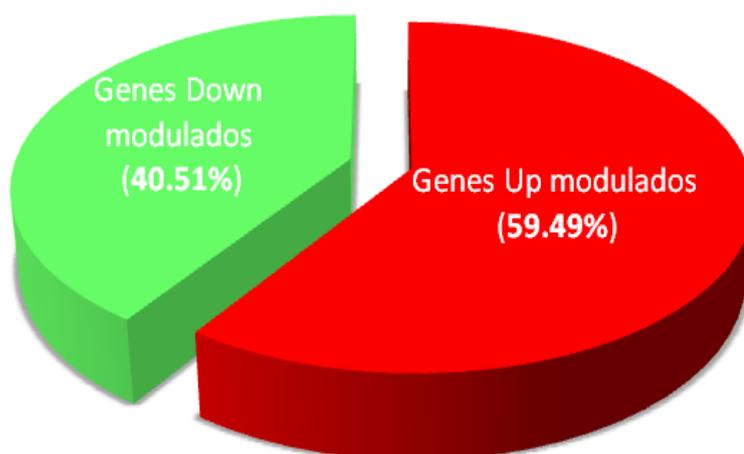


**Figura 8.4.** Muerte tumoral MCF-7. Los gráficos indican los % de muerte de células tumorales MCF-7 en cultivos *in vitro* de los ensayos Time-Lapse y TUNEL, tras el tratamiento con 367  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard durante 24 horas. Los resultados indicados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron significancia estadística con \*\* $p < 0,01$  vs Control.

#### IV.2.4 Microarreglos de cDNA

Se investigó el efecto de los  $\beta$ -glucanos de Maitake Standard sobre la expresión de genes específicos asociados al fenotipo tumoral mamario, usando microarreglos de cDNA. Este tipo de ensayo genómico permitió monitorear simultáneamente el nivel de expresión de 25000 genes asociados al fenotipo tumoral mamario en cultivos de células tumorales mamarias humanas MCF-7 tratadas por 24 h con concentraciones crecientes de Maitake Standard. Los resultados obtenidos demostraron que Maitake Standard modificó la expresión de 7842 genes (31,37%).

Sin embargo, se realizó un análisis estadístico más estricto y riguroso que consideró como up-regulación significativa valores génicos por encima de las 6 unidades y como down-regulación significativa valores por debajo de las -7 unidades respecto del Control. Bajo este análisis más riguroso, se obtuvo que Maitake indujo modificaciones significativas (\* $p < 0,05$  vs Control) en la expresión de 4068 genes (16,27 %), de los cuales 1648 fueron down-modulados (40,51 %) y 2420 up-modulados (59,49 %) (Fig. 9.4).

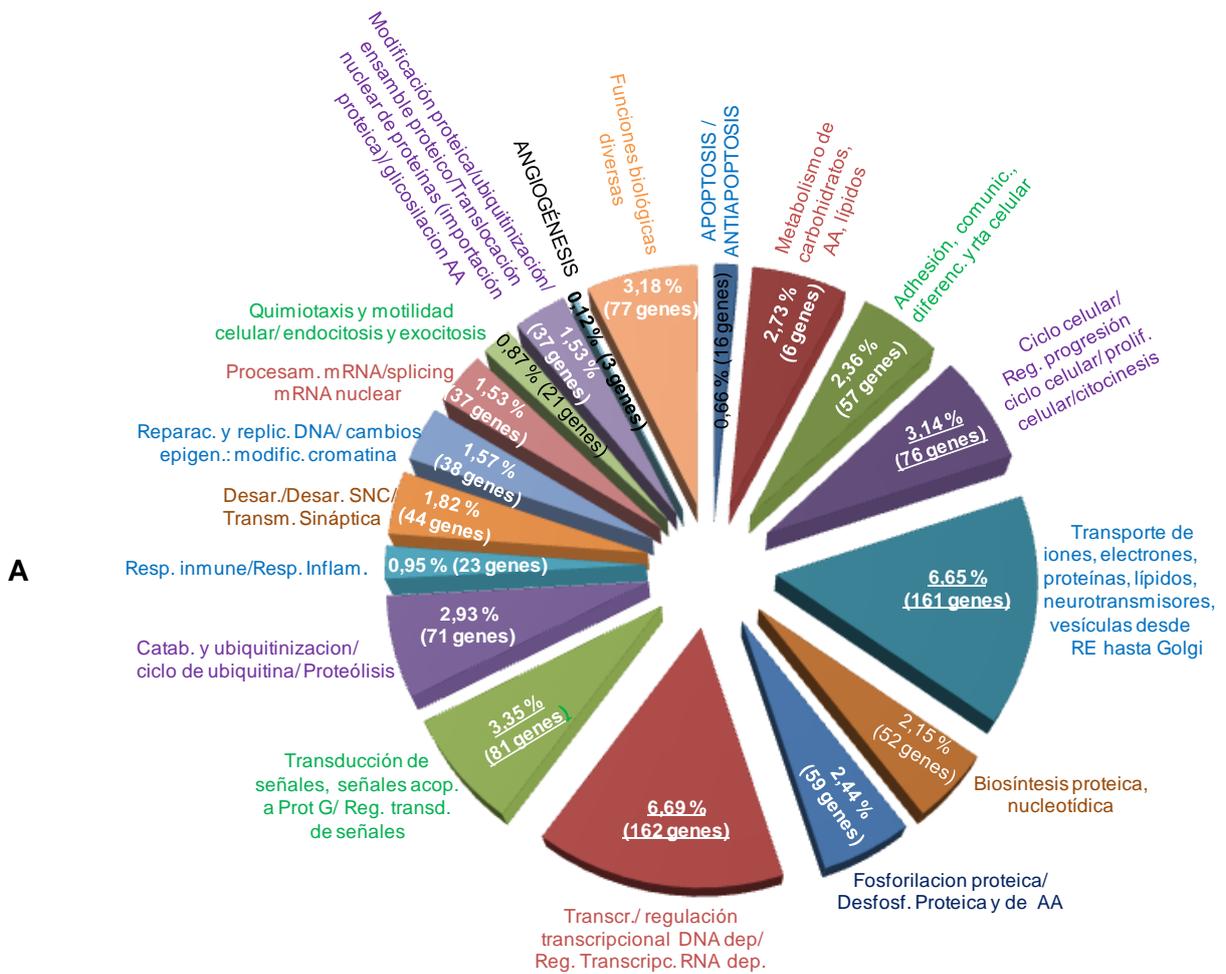


**Figura 9.4.** *Expresión génica de células tumorales.* Se analizó el efecto de Maitake Standard en la regulación génica up y down de células tumorales MCF-7 mediante microarreglos de cDNA. El ensayo permitió monitorear el nivel de expresión de 25000 genes asociados al fenotipo tumoral mamario. En color verde se indican los genes down modulados por Maitake, y en rojo los up regulados de un total de 4068 genes que resultaron significativamente modulados.

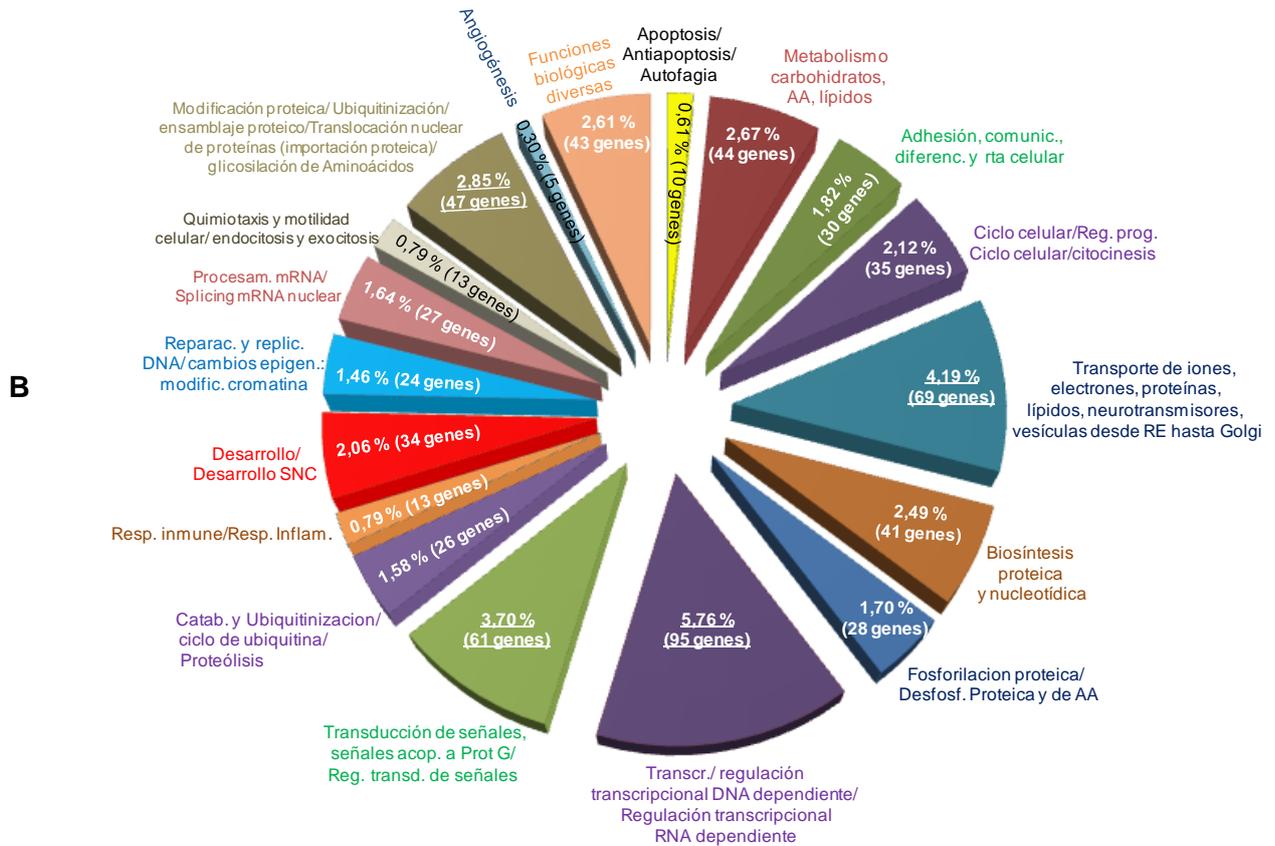
Los 4068 genes modulados por Maitake se vinculan con diversas funciones biológicas, algunas de las cuales se hallan desreguladas en el proceso tumoral -por ejemplo, apoptosis, supresión tumoral, crecimiento y proliferación celular, adhesión intercelular y adhesión a la matriz extracelular, migración y metástasis-, confiriendo a las células tumorales la capacidad de proliferar descontroladamente e inhibir el proceso apoptótico.

En ese sentido, Maitake posee efectos directos sobre la expresión de genes con funciones biológicas habitualmente desreguladas en el proceso tumorigénico mamario. Cabe destacar que el 55 % de los genes up-regulados y el 60 % de los down regulados por los  $\beta$ -glucanos no posee una función biológica conocida. Los genes cuya función biológica es bien conocida se resumen en la Fig. 10.4.

**FUNCIONES BIOLÓGICAS DE ALGUNOS DE LOS 2420 GENES UP-REGULADOS POR MAITAKE**

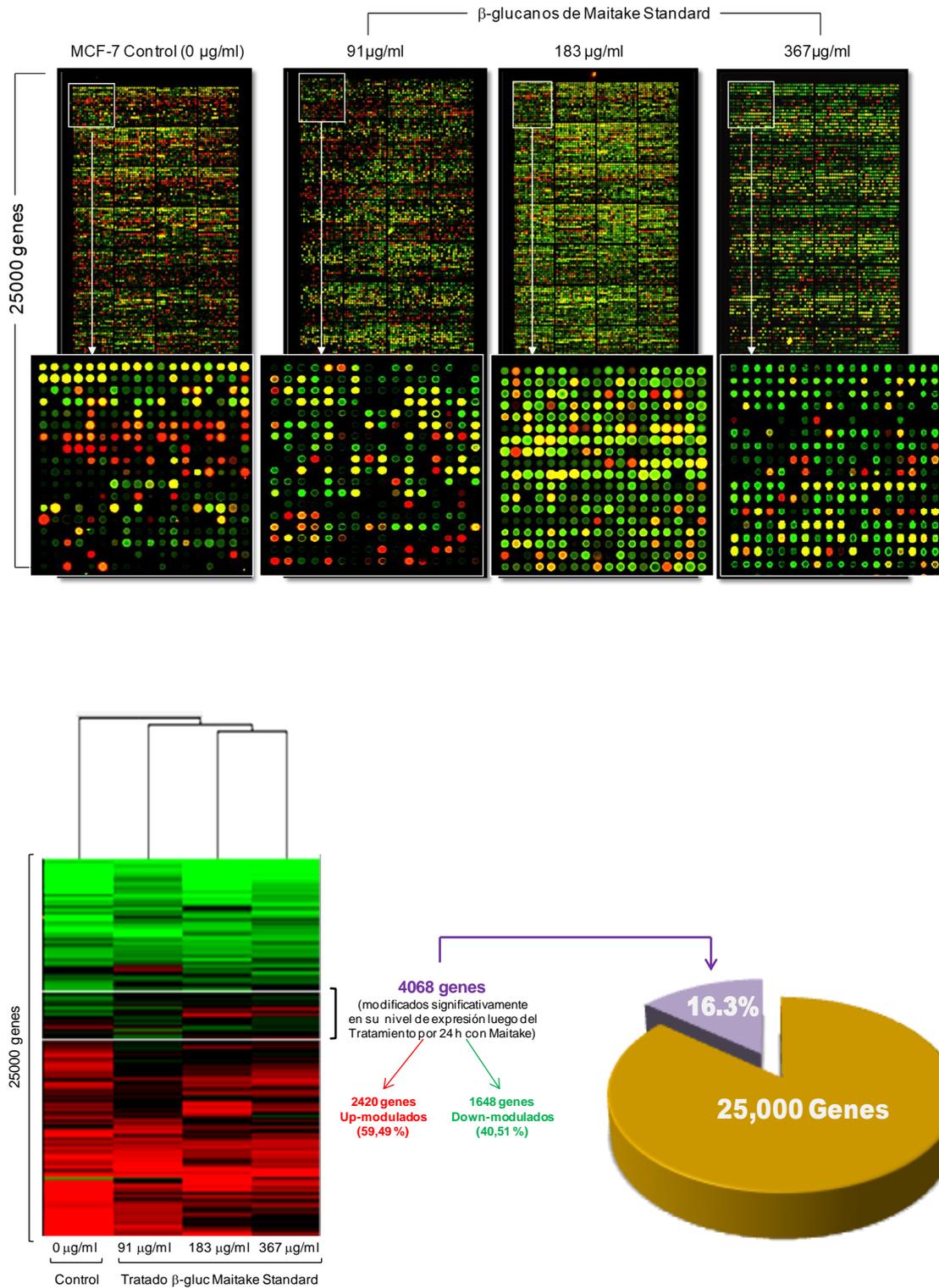


FUNCIONES BIOLÓGICAS DE ALGUNOS DE LOS 1648 GENES DOWN-REGULADOS POR MAITAKE



**Figura 10.4.** Funciones biológicas de genes asociados al fenotipo tumoral mamario. Los mismos resultaron modulados por los β-glucanos de Maitake, ya sea mediante **A)** up-regulación o **B)** down-regulación.

El ensayo de Microarreglos de cDNA demostró que 430 genes tuvieron la máxima up-modulación luego del tratamiento con 183 μg/ml de Maitake Standard, y 75 genes presentaron la máxima down-modulación con 91 μg/ml del extracto glicoproteico rico en β-glucanos (Fig. 11.4).

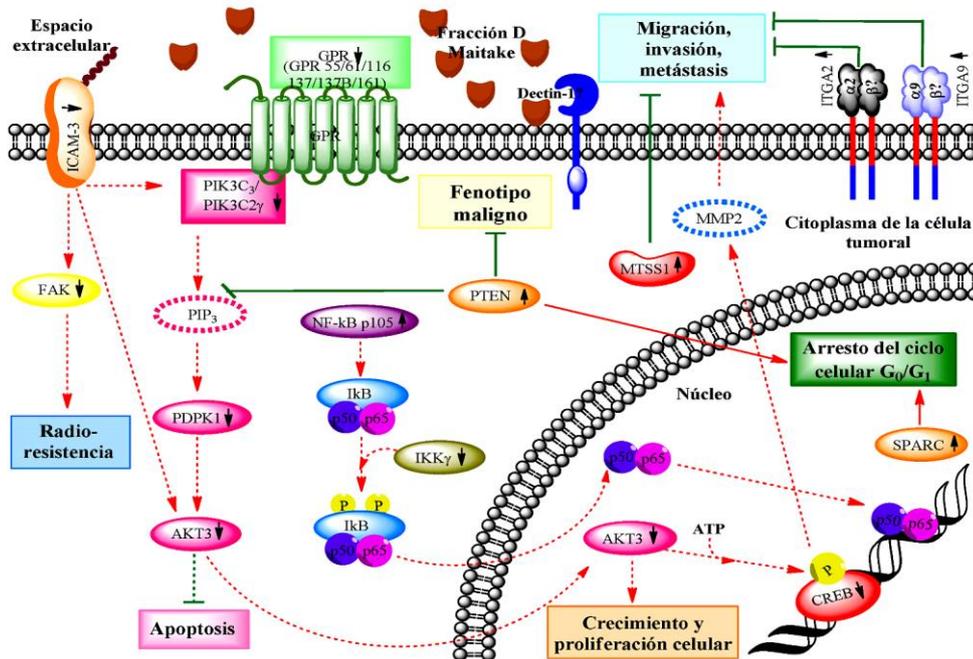


**Figura 11.4. Análisis de Jerarquía génica.** Se ilustran los perfiles génicos modificados por el aumento de la concentración de Maitake Standard en células tumorales MCF-7. De 25000 genes monitoreados simultáneamente, el 16,3 % de ellos resultó significativamente modificado (\*p<0,05 vs Control).

Los resultados del ensayo génico demostraron que Maitake reguló la expresión de genes asociados con apoptosis celular, supresión tumoral y reparación de DNA. Además, se obtuvieron los siguientes resultados:

- Sobreexpresión de 29 genes apoptóticos, como genes pro-apoptóticos que conducen a la muerte celular programada (BAK1, BCLAF1, BCL2L13, RASSF2, FADD y SPARC) (Tabla 9.4).
- Inactivación de la vía anti-apoptótica PI3K-AKT (bloqueadora de muerte tumoral).
- Activación de genes supresores de tumores, como PTEN y RASSF2.
- Sobreexpresión de genes bloqueadores del crecimiento y proliferación tumoral, (RBBP4, IGFBP5, CAV1, p27/kip1), como también de la vía antiproliferativa TGF- $\beta$ . Inactivación de las vías proliferativas AKT, IGF y NF-kappa-B.
- Sobreexpresión de genes bloqueadores de metástasis e invasividad tumoral (ITGA2, ITGA9, MTSS1, CAV1) y disminución de la expresión CD44 asociada a metástasis.

Las vías moleculares reguladas por Maitake se indican en la Fig. 12.4, y el listado de genes modulados por Maitake se consigna en la Tabla 9.4.



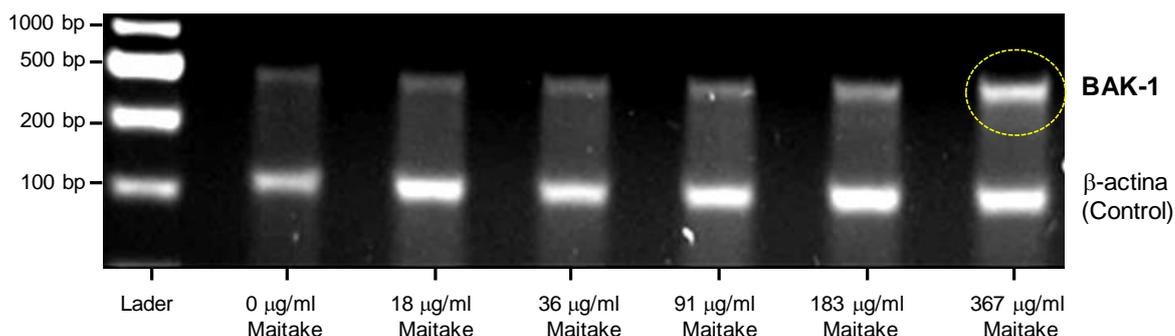
**Figura 12.4.** Vías moleculares reguladas por Maitake. Se detallan las rutas moleculares estimuladas (líneas rojas), inhibidas (líneas verdes) o no moduladas (líneas punteadas) por efecto del tratamiento con Maitake en células tumorales MCF-7. Esquema tomado de Alonso et al, 2013 [200].

**Tabla 9.4.** *Expresión génica de apoptosis, proapoptosis y anti-apoptosis.* Corresponden a células tumorales MCF-7 tratadas con concentraciones crecientes de Maitake Standard. La expresión génica diferencial se determinó como  $\text{Log}_2$  de R siendo  $R \geq 6$  para los genes sobre-expresados (\* $p < 0.05$ ). En color naranja se indican los genes up-modulados y en verde los down-modulados.

Numero	Gene ID	Simbolo del Gen	Nombre del Gen	Funcion Biologica	Control (Intensidad)	Fraction D 5.5mg/15ml (Intensidad)	Relacion
1	AA457705	IER3	Immediate early response 3	apoptosis	0.10	4.11	40.13
2	AA703058	MPO	Myeloperoxidase	anti-apoptosis	0.55	13.27	24.13
3	AA700443	SEMA6A	Sema domain, transmembrane domain <sup>TM</sup>	apoptosis	0.16	3.19	19.49
4	R55303	NGFR	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	apoptosis	1.39	22.75	16.43
5	AA454588	BCL2L2	BCL2-like 2	anti-apoptosis	2.11	27.86	13.22
6	AA927951	FXR1	Fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	apoptosis	0.15	1.83	12.06
7	AA002126	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	anti-apoptosis	0.49	5.20	10.56
8	H57855	TNFAIP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	anti-apoptosis	1.89	17.85	9.45
9	AA872011	AXUD1	AXIN1 up-regulated 1	apoptosis	0.10	0.79	7.66
10	N32514	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	anti-apoptosis	1.60	12.17	7.61
11	AA703531	IL24	Interleukin 24	anti-apoptosis	0.77	5.67	7.32
12	R96507	ADAMTSL4	ADAMTS-like 4	apoptosis	0.04	0.26	6.84
13	AA018124	HD	Huntingtin (Huntington disease)	apoptosis	0.18	1.14	6.16
14	AA625671	DAP3	Death associated protein 3	apoptosis	0.08	0.45	5.95
15	AA634466	PPP1R13B	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B	apoptosis	0.05	0.28	5.79
16	AA777555	TNFRSF19	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	apoptosis	0.15	0.83	5.59
17	N70382	CCAR1	Cell division cycle and apoptosis regulator 1	apoptosis	0.16	0.87	5.54
18	AA878235	UNC5D	Unc-5 homolog D (C. elegans)	apoptosis	0.13	0.66	5.00
19	AA236957	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	apoptosis	0.12	0.56	4.73
20	AA181808	APIP	APAF1 interacting protein	apoptosis	0.16	0.72	4.64
21	AA702008	CTNBL1	Catenin, beta like 1	apoptosis	0.85	3.90	4.59
22	AA704483	ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	apoptosis	0.10	0.29	2.96
23	R82978	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	apoptosis	7.02	4.19	0.60
24	N68032	DAP3	Death associated protein 3	apoptosis	0.61	0.36	0.59
25	N72138	SH3GLB1	SH3-domain GRB2-like endophilin B1	apoptosis	0.36	0.21	0.57
26	R42714	DAD1	Defender against cell death 1	apoptosis	0.83	0.42	0.51
27	N53505	TRIM35	Tripartite motif-containing 35	apoptosis	19.87	9.80	0.49
28	AA133199	MAGI3	Membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing	apoptosis	5.20	1.96	0.38
29	AA447587	CROP	Cisplatin resistance-associated overexpressed protein	apoptosis	2.31	0.51	0.22

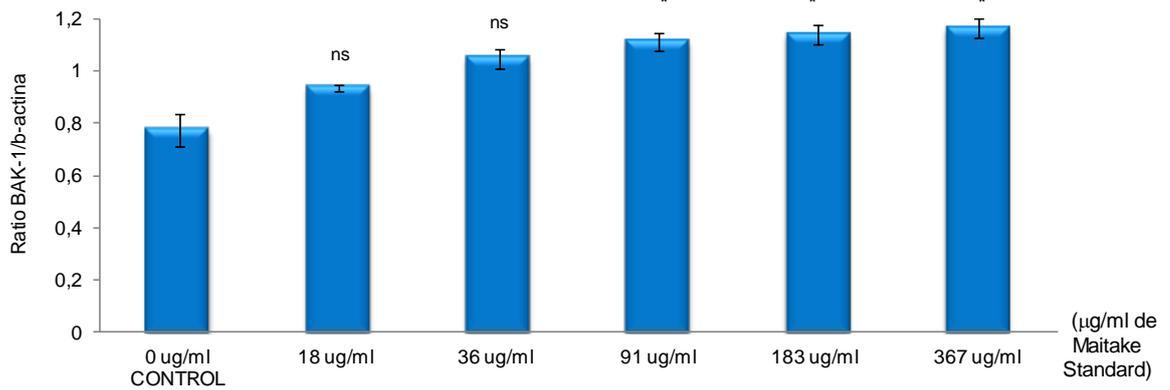
#### IV.2.5 RT-PCR gen BAK-1

Se investigó el efecto de Maitake Standard sobre la expresión del gen proapoptótico BAK-1, uno de los más sobreexpresados en el ensayo de microarreglos de cDNA. Para ello, se realizaron tres ensayos independientes de RT-PCR, en los cuales células tumorales MCF-7 en cultivo *in vitro* fueron tratadas por 24 horas con concentraciones crecientes del extracto glicoproteico de Maitake Standard (Fig. 13.4).



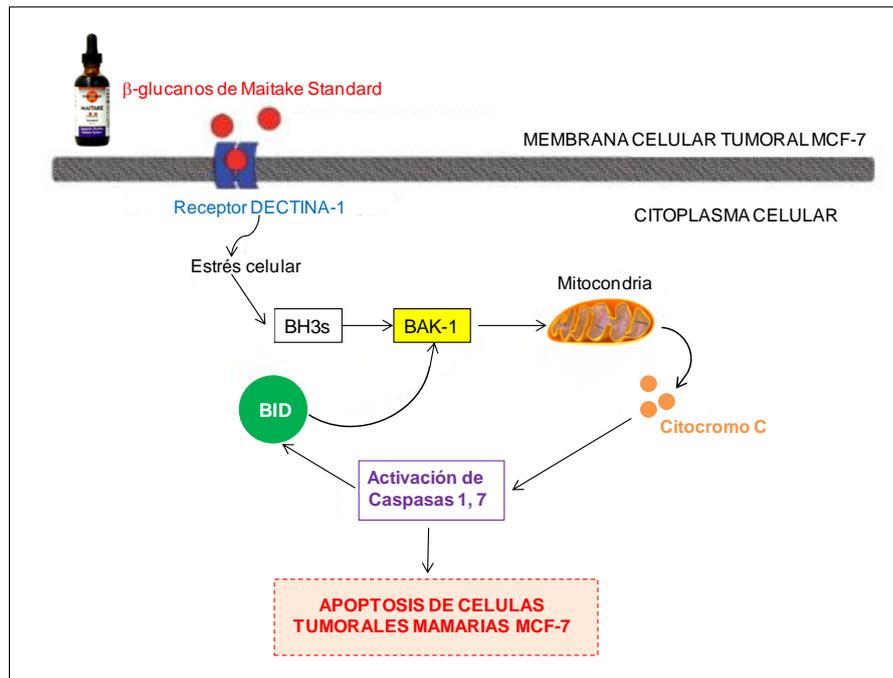
**Figura 13.4.** RT-PCR gen proapoptótico BAK-1. Este gen había resultado sobreexpresado en los ensayos de microarreglos de cDNA previamente descritos. Para analizar su expresión, se tomó como Control la expresión de la  $\beta$ -actina (banda inferior). En círculo amarillo se indica la máxima intensidad de BAK-1 y la correspondiente dosis de extracto glicoproteico ensayado (367  $\mu\text{g/ml}$ ).

Los resultados de la Fig. 13.4 de expresión de mRNA del gen BAK-1 en células tumorales MCF-7 tratadas con Maitake Standard, demostraron que la intensidad de BAK-1 se incrementó al aumentar las concentraciones del extracto glicoproteico de forma dosis-dependiente. La expresión de BAK-1 fue significativamente más intensa ( $*p < 0,05$  vs Control) con las mayores concentraciones del producto (91  $\mu\text{g/ml}$ , 183  $\mu\text{g/ml}$  y 367  $\mu\text{g/ml}$ ), alcanzándose la máxima intensidad de la banda con 367  $\mu\text{g/ml}$  Maitake Standard (Fig. 13.4).



**Figura 14.4.** Expresión del gen BAK-1. Se graficó la intensidad de la expresión génica en relación a la β-actina para células tumorales MCF-7 *in vitro* incubadas con dosis crecientes de Maitake Standard. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Se encontraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$  vs Control) a partir de la dosis 91 µg/ml de producto.

Considerando el efecto de los β-glucanos de Maitake Standard, se propone el siguiente mecanismo apoptótico de muerte de células tumorales MCF-7 en cultivo *in vitro*.



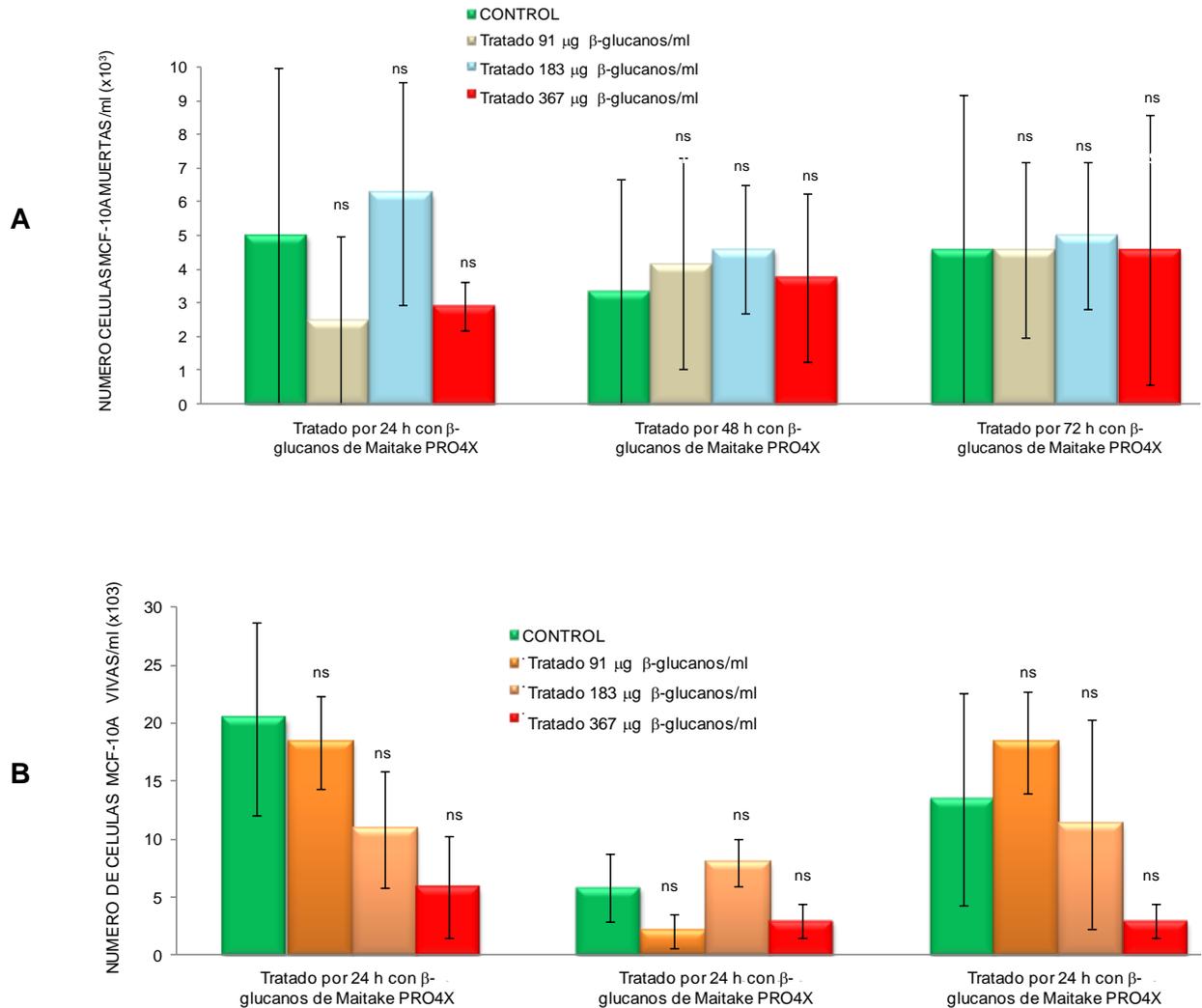
**Figura 15.4.** Mecanismo apoptótico posible. Se propone un mecanismo de acción mediante el cual la unión de los β-glucanos a su receptor membranal específico en células tumorales MCF-7, dispararía una señal intracelular de estrés conducente a la activación de BAK-1, culminando en el desencadenamiento del proceso apoptótico.

#### IV.2.6 Efecto de Maitake en células humanas sanas

Se investigó si los  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X inducen muerte en células mamarias normales del mismo modo que lo hacen en células tumorales. Para ello, se realizó un ensayo por triplicado de viabilidad y muerte empleando la línea celular mamaria humana normal MCF-10A. Cultivos *in vitro* de estas células fueron tratados a distintos tiempos con concentraciones crecientes de Maitake PRO4X. El recuento de células vivas y muertas se realizó en cámara de Neubauer, empleando la técnica de exclusión azul de Tripán. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 10.4 y la Fig. 15.4.

**Tabla 10.4.** Viabilidad y muerte celular MCF-10A por efecto de Maitake. Cultivos *in vitro* fueron tratados por 24, 48 y 72 horas con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como número de células muertas/ml y número células vivas-proliferantes/ml. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (ns,  $p > 0,05$ ).

TIEMPO DE TRATAMIENTO CON $\beta$ -GLUCANOS DE MAITAKE PRO4X	GRUPOS EXPERIMENTALES DE CELULAS MAMARIAS HUMANAS NORMALES MCF-10A	MEDIA $\pm$ DS		Valor p vs Control
		Número células vivas MCF-10A/ml	Número células muertas MCF-10A/ml	
24 h	Control	20417 $\pm$ 8323	5000 $\pm$ 5449	
	Tratado 91 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	18333 $\pm$ 4018	2500 $\pm$ 2500	ns
	Tratado 183 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	10833 $\pm$ 5052	6250 $\pm$ 3307	ns
	Tratado 367 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	5833 $\pm$ 4390	2917 $\pm$ 722	ns
48 h	Control	5833 $\pm$ 2887	3333 $\pm$ 1443	
	Tratado 91 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	2083 $\pm$ 1443	4167 $\pm$ 3146	ns
	Tratado 183 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	8000 $\pm$ 2046	4583 $\pm$ 1909	ns
	Tratado 367 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	2917 $\pm$ 1443	3750 $\pm$ 2500	ns
72 h	Control	13417 $\pm$ 9170	4583 $\pm$ 2602	
	Tratado 91 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	18333 $\pm$ 4390	4583 $\pm$ 2602	ns
	Tratado 183 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	11250 $\pm$ 9014	5000 $\pm$ 2165	ns
	Tratado 367 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml	2917 $\pm$ 1443	4583 $\pm$ 4018	ns



**Figura 15.4.** Viabilidad y muerte celular MCF-10A por efecto de Maitake. Cultivos *in vitro* fueron tratados con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como **A)** numero de células muertas/ml, y **B)** número células vivas-proliferantes/ml.

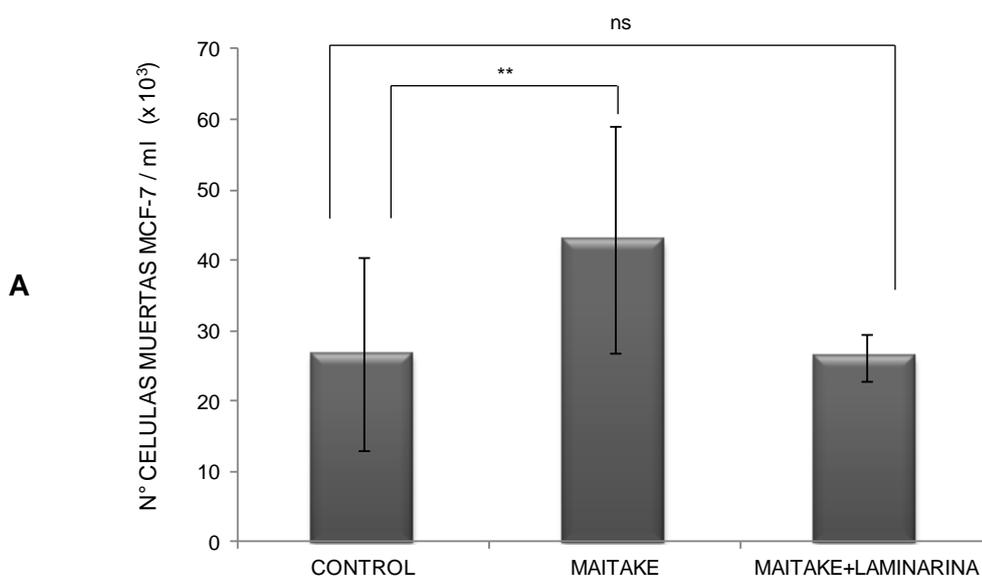
Los resultados consignados en la Tabla 10.4 y la Fig. 15.4 sobre los efectos de muerte de células mamarias normales, demostraron que ninguna concentración de  $\beta$ -glucanos de Maitake a ningún tiempo de tratamiento, indujo muerte celular significativa (ns,  $p > 0,05$  vs Control). Asimismo, ninguna dosis del extracto glicoproteico indujo disminución significativa de la viabilidad celular MCF-10A para ningún tiempo de tratamiento (ns,  $p > 0,05$  vs Control).

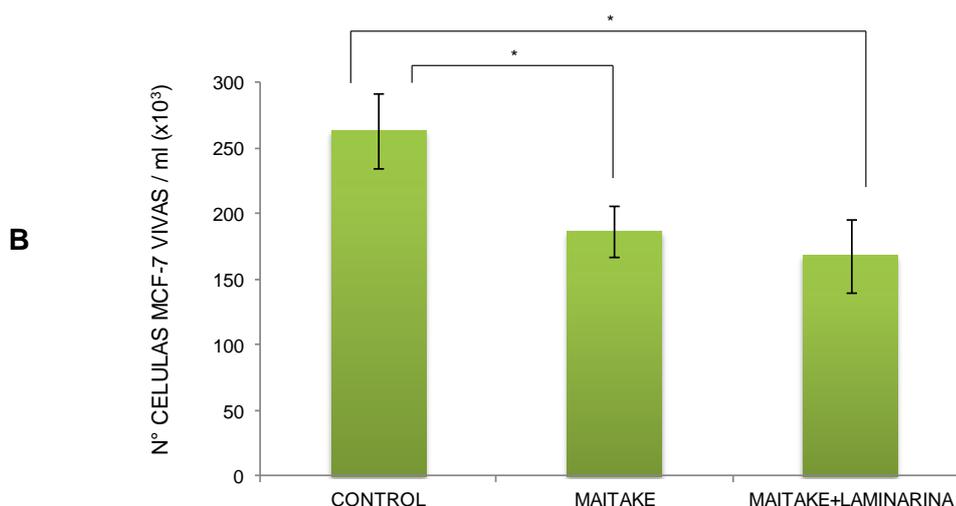
#### IV.2.7 Efecto de Maitake en células tumorales humanas con bloqueo Dectina-1

Se investigó el efecto de Maitake sobre la viabilidad y muerte de células tumorales MCF-7 al mediar bloqueo de los receptores transmembrana Dectina-1 [201] con Laminarina. Para ello, cultivos *in vitro* de dichas células fueron tratados por 24 h con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X. El recuento de células vivas y muertas se realizó en cámara de Neubauer, empleando la técnica de exclusión azul de Tripán. Se conformaron los siguientes grupos por triplicado: Control, Tratado con 367  $\mu$ g/ml de  $\beta$ -glucanos, Tratado con 367  $\mu$ g/ml de  $\beta$ -glucanos + Laminarina 200  $\mu$ g/ml. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 11.4 y Fig. 16.4.

**Tabla 11.4.** Viabilidad y muerte celular por efecto de Maitake al mediar bloqueo Dectina-1. Cultivos *in vitro* de células tumorales MCF-7 fueron tratados por 24 horas con  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X y Laminarina. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como número de células muertas/ml y número células vivas-proliferantes/ml.

GRUPOS EXPERIMENTALES DE CELULAS TUMORALES MAMARIAS HUMANAS MCF-7	MEDIA $\pm$ DESVIO ESTANDAR	
	N° CELULAS MCF-7 MUERTAS/ml	N° CELULAS MCF-7 VIVAS/ml
CONTROL	26666,67 $\pm$ 13712,07	263750,00 $\pm$ 28750,00
MAITAKE	42916,67 $\pm$ 16072,75 **vs Control	186666,67 $\pm$ 19934,79 *vs Control
MAITAKE + LAMINARINA	26250,00 $\pm$ 3307,19	168333,33 $\pm$ 28127,31 *vs Control





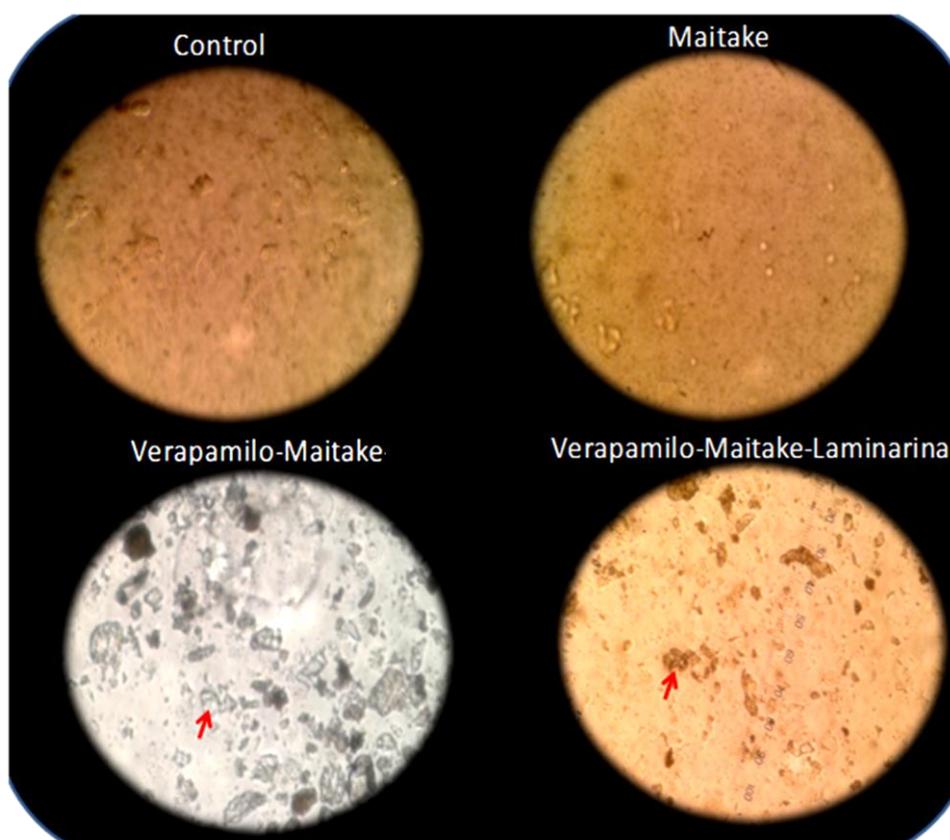
**Figura 16.4.** Viabilidad y muerte celular por efecto de Maitake al mediar bloqueo Dectina-1. Se trabajó por triplicado con cultivos *in vitro* de células tumorales MCF-7 en los cuales se realizó recuento de **A)** Muerte celular/ml, y **B)** Viabilidad/proliferación celular/ml en cámara de Neubauer empleando la técnica de exclusión de azul de Tripán. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, presentaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Tabla 11.4 y Fig. 16.4 sobre la muerte de células tumorales MCF-7, demostraron que el tratamiento con Maitake aumentó significativamente (\* $p < 0,05$ ) la muerte de las células tumorales (de  $26666,67 \pm 13712,07$  a  $42916,67 \pm 16072,75$ ), y disminuyó significativamente (\* $p < 0,05$ ) la viabilidad celular (de  $263750 \pm 28750$  a  $186666,67 \pm 19934,79$ ) mientras no hubo mediado el bloqueo de receptores Dectina-1 con Laminarina.

Por su parte, la incubación Maitake + Laminarina no indujo muerte celular significativa ( $p > 0,05$ ) (Fig. 16.4-A), pero sí indujo reducción significativa (\* $p < 0,05$ ) de viabilidad/proliferación celular (de  $263750 \pm 28750$  a  $168333,33 \pm 28127,31$ ) (Fig. 16.4-B).

#### IV.2.8 Efecto de Maitake en células tumorales humanas con bloqueo cálcico

Se investigó si el mecanismo de muerte de células tumorales inducido por Maitake estaba asociado a la activación de canales de calcio. Para ello, cultivos *in vitro* de células tumorales MCF-7 se trataron por 24 h con  $\beta$ -glucanos 367  $\mu\text{g/ml}$ , Laminarina 200  $\mu\text{g/ml}$  (inhibidor Dectina-1) y Verapamilo 734  $\mu\text{g/ml}$  (inhibidor de canales cálcicos voltaje-dependientes). Los resultados obtenidos se consignaron en la Fig. 17.4.



**Figura 17.4.** Efecto de Maitake en células tumorales al mediar bloqueo cálcico. La figura ilustra las cuatro condiciones ensayadas. Las microfotografías superiores corresponden a los grupos Control y Tratado con 367  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X, mientras que las inferiores corresponden a los tratamientos de Maitake + Verapamilo en ausencia y presencia de laminarina respectivamente. La flecha roja señala toxicidad celular observada en los tratamientos con Verapamilo.

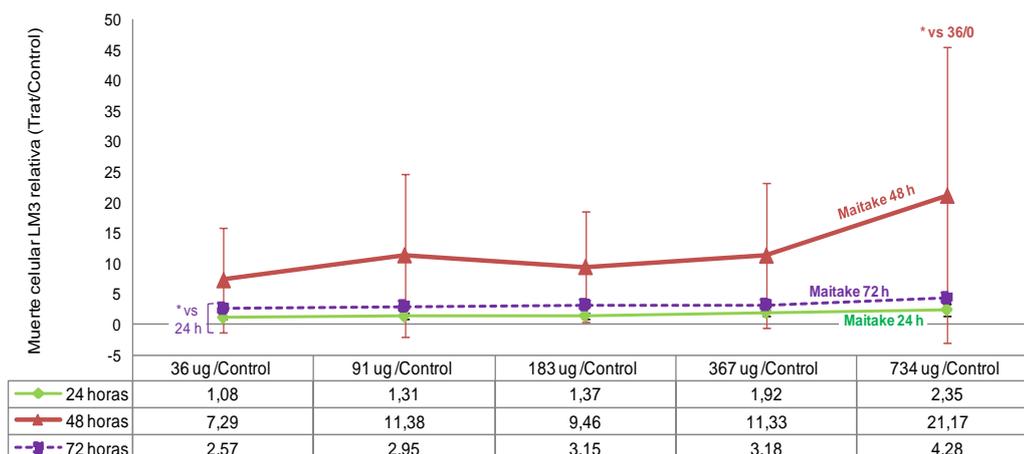
Los resultados consignados en la Fig. 17.4 respecto del tratamiento de células tumorales MCF-7 con Verapamilo, demostraron que todas las condiciones en las cuales estuvo presente el inhibidor cálcico hubo destrucción celular masiva con presencia de detritos y restos celulares, y ausencia de células vivas. Esto sugiere el efecto de toxicidad celular de Verapamilo a la dosis ensayada (734  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### IV.2.9 Efecto de Maitake en células tumorales no humanas

El efecto de muerte celular de Maitake PRO4X sobre una especie animal diferente a la humana, se investigó para células tumorales mamarias murinas LM3. Cultivos *in vitro* de células LM3 fueron tratados por 24 h, 48 h y 72 h con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X. La cuantificación de muerte celular se realizó en cámara de Neubauer empleando la técnica de exclusión de azul de Tripán. Los resultados de % células muertas/ml se indican en la Tabla 12.4 y la Fig. 18.4.

**Tabla 12.4.** Muerte celular LM3 por efecto de Maitake. Cultivos *in vitro* fueron tratados por 24 h, 48 h y 72 h con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como % células muertas/ml y Muerte celular Relativa al control.

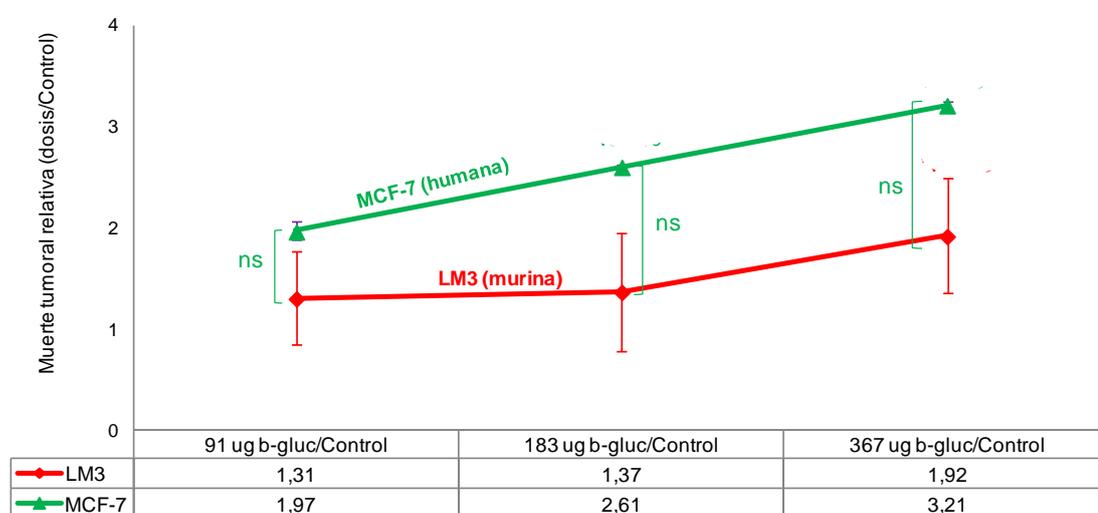
MUERTE DE CELULAS TUMORALES MAMARIAS MURINAS LM3 TRATADAS CON $\beta$ -GLUCANOS DE MAITAKE PRO4X						
GRUPOS EXPERIMENTALES	% MUERTE CELULAR LM3/ml (MEDIA $\pm$ DS)			MUERTE CELULAR LM3 RELATIVA AL CONTROL (MEDIA $\pm$ DS)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control sin tratar (0 $\mu$ g $\beta$ -glucanos/ml)	15,04 $\pm$ 0,72	6,77 $\pm$ 5,72	14,41 $\pm$ 1,37			
Tratado 36 $\mu$ g de $\beta$ -glucanos/ml	16,29 $\pm$ 1,90	15,40 $\pm$ 0,07	37,10 $\pm$ 3,68 (* vs Control) (* vs 24 h)	1,08 $\pm$ 0,11	7,29 $\pm$ 8,54	2,57 $\pm$ 0,02 (* vs 24 h)
Tratado 91 $\mu$ g de $\beta$ -glucanos/ml	19,87 $\pm$ 5,83	24,02 $\pm$ 0,08	42,25 $\pm$ 1,16 (** vs Control) (* vs 48 h)	1,31 $\pm$ 0,46	11,38 $\pm$ 13,35	2,95 $\pm$ 0,28
Tratado 183 $\mu$ g de $\beta$ -glucanos/ml	20,90 $\pm$ 7,17	28,06 $\pm$ 9,82	45,18 $\pm$ 1,80 (** vs Control)	1,37 $\pm$ 0,58	9,46 $\pm$ 9,05	3,15 $\pm$ 0,25
Tratado 367 $\mu$ g de $\beta$ -glucanos/ml	29,18 $\pm$ 7,37	29,57 $\pm$ 6,90 (* vs Control)	45,68 $\pm$ 2,38 (* vs Control)	1,92 $\pm$ 0,56	11,33 $\pm$ 11,86	3,18 $\pm$ 0,19
Tratado 734 $\mu$ g de $\beta$ -glucanos/ml	35,85 $\pm$ 12,04	46,78 $\pm$ 2,67 (* vs Control)	61,52 $\pm$ 4,24 (* vs Control) (* vs 48 h)	2,35 $\pm$ 0,97	21,17 $\pm$ 24,30	4,28 $\pm$ 0,16 (* vs 36/0)



**Figura 18.4.** Muerte celular LM3 por efecto de Maitake. Cultivos *in vitro* fueron tratados con concentraciones crecientes de  $\beta$ -glucanos. Los resultados correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se graficaron como Muerte celular relativa al control, observándose diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y no significativas ( $p > 0,05$ ) de muerte entre los grupos.

Los resultados consignados en la Tabla 12.4 y la Fig. 18.4 respecto de la muerte celular LM3 inducida por Maitake PRO4X, sugieren que la muerte relativa no presentó diferencias significativas entre los tiempos de tratamiento y las concentraciones ensayadas, excepto para la dosis 734/0 a las 48 h que fue significativamente más alta que la dosis inicial de 36/0 (\* $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que la muerte relativa de células tumorales murinas podría resultar independiente de la concentración de  $\beta$ -glucanos y del tiempo de incubación.

**Muerte celular murina vs humana.** Al comparar la muerte relativa de las líneas tumorales humana (MCF-7) y murina (LM3) tras el tratamiento de 24 h con Maitake, obtuvimos los siguientes resultados (Fig. 19.4).



**Figura 19.4.** Muerte celular relativa humana vs murina. Se comparó el tratamiento por 24 horas con  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X sobre cultivos *in vitro* de las líneas celulares MCF-7 (humana) y LM3 (murina). La muerte se determinó por la técnica de exclusión azul de Tripán en LM3, y microscopía Time-Lapse en MCF-7. Los resultados, correspondieron a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, no mostraron diferencias significativas entre los grupos (ns,  $p > 0,05$ ).

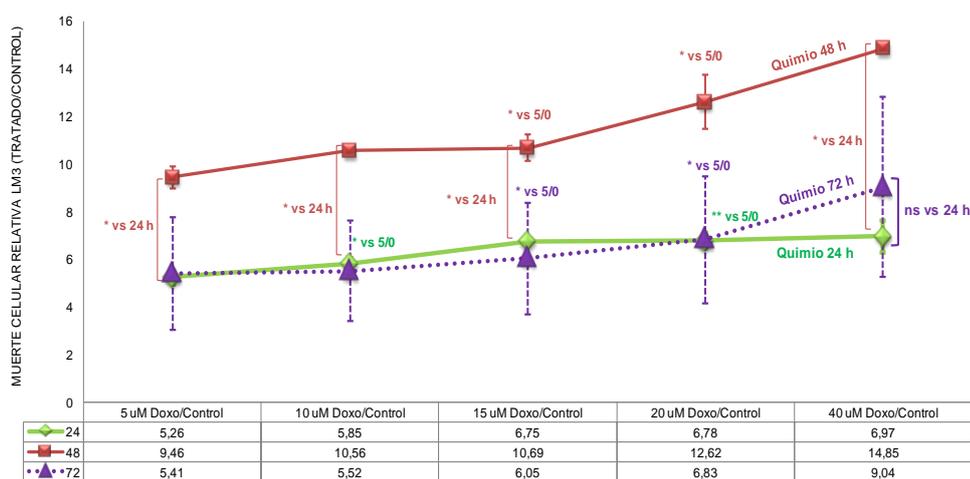
Los resultados consignados en la Fig. 19.4 sobre muerte relativa de células tumorales murina y humana inducida por Maitake, no mostró diferencias significativas de muerte entre ambas especies (ns,  $p > 0,05$ ).

#### IV.2.10 Efecto del tratamiento quimioterápico en células tumorales murinas

Se investigó el efecto de muerte celular del tratamiento quimioterápico combinado (Ciclofosfamida + Doxorrubicina) en células tumorales murinas LM3. Para ello, se emplearon concentraciones crecientes de quimioterapia a distintos tiempos de incubación (24 h, 48 h y 72 h). La cuantificación de muerte celular se realizó en cámara de Neubauer con la técnica de exclusión Azul de Tripan. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 13.4 y la Fig. 20.4.

**Tabla 13.4.** Muerte celular LM3 por efecto del tratamiento quimioterápico combinado. Cultivos *in vitro* fueron tratados por 24 h, 48 h y 72 h con concentraciones crecientes de Ciclofosfamida + Doxorrubicina. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como % células muertas/ml y Muerte celular Relativa al control.

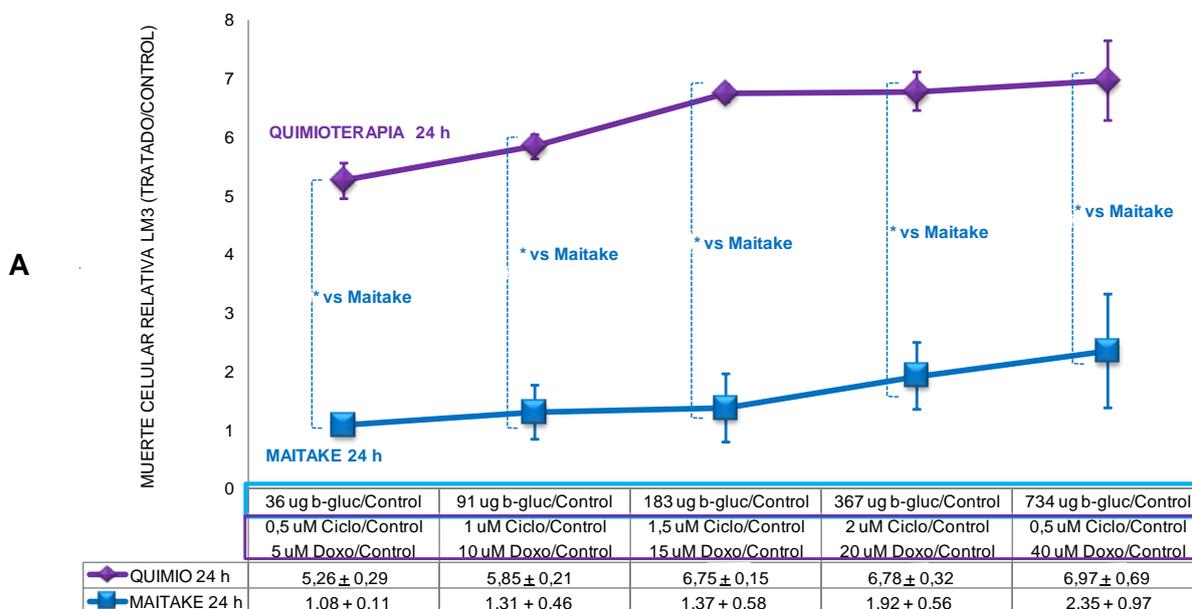
MUERTE CELULAR TUMORAL MAMARIA MURINA POR TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA						
GRUPO EXPERIMENTAL	% MUERTE CELULAR MURINA LM3/ml (MEDIA $\pm$ DS)			MUERTE CELULAR LM3 RELATIVA AL CONTROL (MEDIA $\pm$ DS)		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
0 $\mu$ M Doxo + 0 $\mu$ M Ciclo	8,71 $\pm$ 0,43	5,09 + 0,29 (*vs 24 h)	11,78 $\pm$ 3,68			
5 $\mu$ M Doxo + 0,5 $\mu$ M Ciclo	45,69 $\pm$ 0,45 (**vs Control)	48,24 + 4,41 (*vs Control)	57,5 $\pm$ 0,12 (*vs Control) (** vs 24 h)	5,26 $\pm$ 0,29	9,46 $\pm$ 0,46 (*vs 24 h)	5,41 $\pm$ 2,37
10 $\mu$ M Doxo + 1 $\mu$ M Ciclo	50,87 $\pm$ 1,23 (**vs Control)	53,75 + 3,02 (*vs Control)	59,51 $\pm$ 2,67 (*vs Control) (*vs 48 h)	5,85 $\pm$ 0,21 (*vs 5 $\mu$ M Control)	10,56 $\pm$ 0,01 (*vs 24 h)	5,52 $\pm$ 2,12
15 $\mu$ M Doxo + 1,5 $\mu$ M Ciclo	58,80 $\pm$ 3,83 (*vs Control)	54,55 + 5,10 (*vs Control)	65,12 $\pm$ 2,72 (**vs Control)	6,75 $\pm$ 0,15	10,69 $\pm$ 0,56 (*vs 24 h) (*vs 5 $\mu$ M Control)	6,05 $\pm$ 2,34 (*vs 5 $\mu$ M Control)
20 $\mu$ M Doxo + 2 $\mu$ M Ciclo	58,99 $\pm$ 0,93 (**vs Control)	64,49 + 7,76 (*vs Control)	73,59 $\pm$ 3,05 (**vs Control) (*vs 24 h)	6,78 $\pm$ 0,32 (*vs 5 $\mu$ M Control)	12,62 $\pm$ 1,14 (*vs 5 $\mu$ M Control)	6,83 $\pm$ 2,65 (*vs 5 $\mu$ M Control)
40 $\mu$ M Doxo + 2,5 $\mu$ M Ciclo	60,90 $\pm$ 7,22 (*vs Control)	75,63 + 4,82 (*vs Control)	96,7 $\pm$ 1,9 (** vs Control) (*vs 24 h) (*vs 48 h)	6,97 $\pm$ 0,69	14,85 $\pm$ 0,14 (*vs 24 h) (*vs 5 $\mu$ M Control)	9,04 $\pm$ 3,77

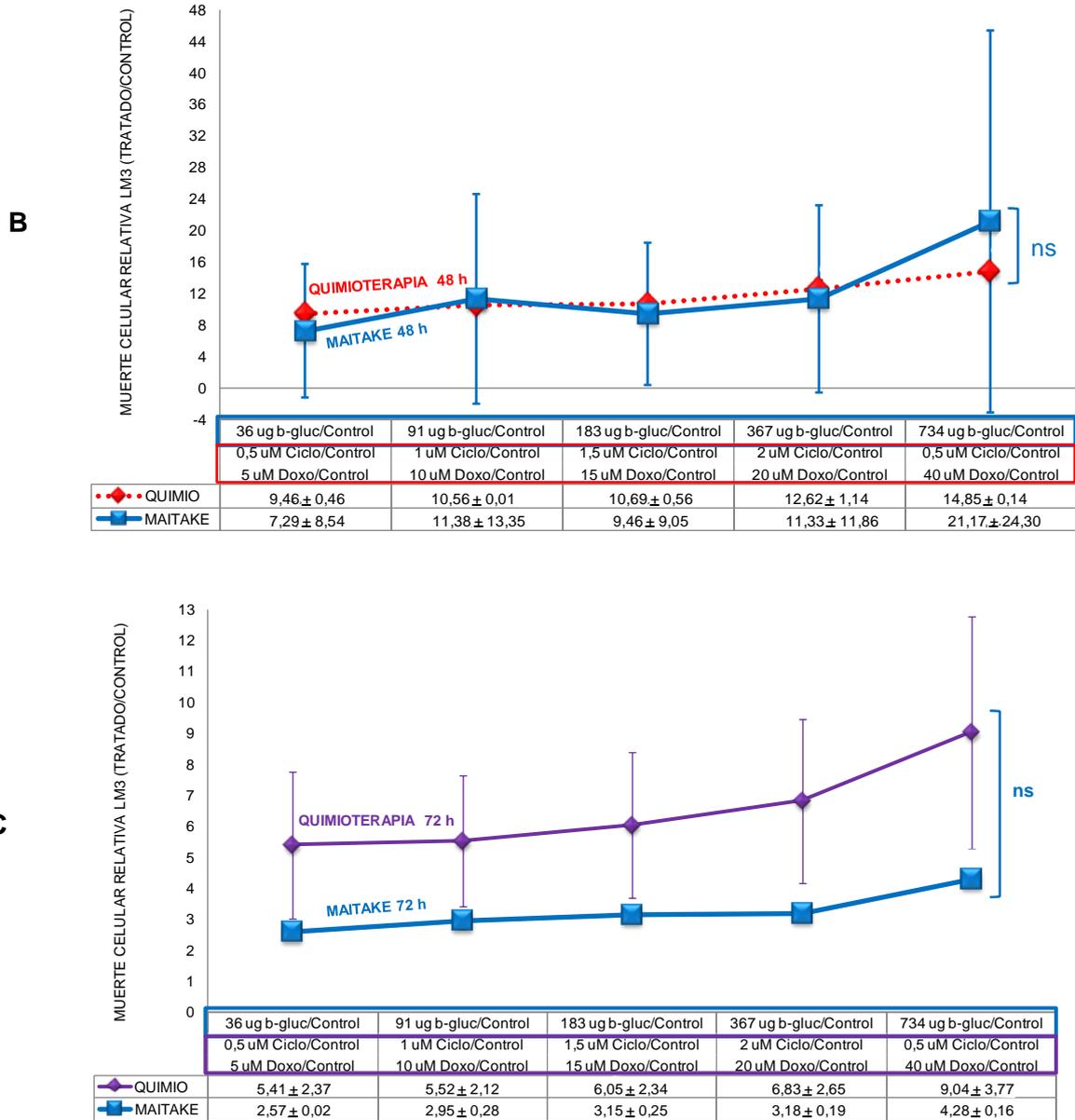


**Figura 20.4.** Muerte celular LM3 por efecto del tratamiento quimioterápico combinado. Cultivos *in vitro* fueron tratados con concentraciones crecientes de Ciclofosfamida + Doxorrubicina por 24 h, 48 h y 72 h. Los resultados correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se graficaron como Muerte celular relativa al control.

Los resultados de la Tabla 13.4 y la Fig. 20.4 respecto de la muerte celular relativa LM3 por quimioterapia, indicaron que la misma se incrementó significativamente para una dosis alta de quimioterapia (20  $\mu$ M Doxorubicina + 2  $\mu$ M Ciclofosfamida), aunque no para la concentración más alta. La muerte relativa a las 48 h aumentó significativamente hasta casi duplicarse respecto de las 24 h (\* $p < 0,05$ ) para prácticamente todas las dosis ensayadas. Llamativamente, a las 72 h de tratamiento, no se observaron diferencias significativas de muerte celular respecto de las 48 h y 24 h (ns,  $p > 0,05$ ).

**Muerte celular murina por quimioterapia vs muerte por Maitake.** Se comparó la muerte celular relativa LM3 inducida por quimioterapia vs la inducida por Maitake PRO4X a las 24 h, 48 h y 72 h de incubación. Los resultados se grafican en la Fig. 21.4.





**Figura 21.4. Muerte celular LM3.** Se compararon los efectos de los tratamientos quimioterápico y Maitake a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como muerte celular relativa al Control (Tratado/Control) observándose diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Fig. 21.4 respecto de la muerte celular relativa por tratamiento con quimioterapia vs Maitake PRO4X, sugieren que a las 24 h hubo mayor muerte celular por quimioterapia que por Maitake PRO4X para todas las concentraciones ensayadas ( $*p < 0,05$ ) (Fig. 21.4-A). Sin embargo, a las 48 h y 72 h, no se observaron diferencias significativas de muerte celular entre ambos tratamientos (Fig. 21.4-B y 21.4-C).

### IV.3 RESULTADOS DE ESTUDIOS *IN VIVO*

#### IV.3.1 Toxicidad aguda

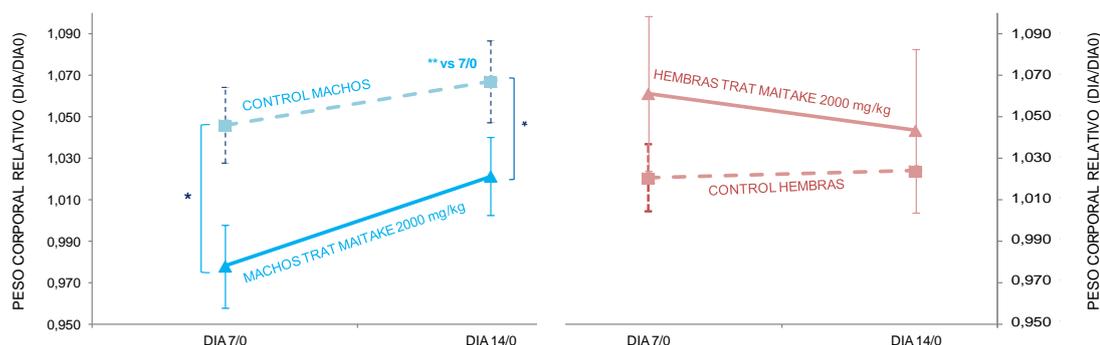
La toxicidad aguda de Maitake PRO4X, fue investigada administrando una dosis límite aguda de 2000 mg/kg peso. Se trabajó con ratones BALB/c sanos de ambos sexos, de 6-8 semanas de edad con un peso comprendido entre 19-25 gramos. Se conformaron dos grupos experimentales (n=5): Control (con 500  $\mu$ l de agua destilada) y Tratado con 2000 mg/kg de Maitake PRO4X (concentración 400 veces superior a la considerada terapéutica). Los animales fueron observados durante los 14 días siguientes, al cabo de los cuales se procedió al sacrificio.

**Mortalidad.** Tras 14 días de observación, la mortalidad fue del 0%, ya que ningún ratón tratado pereció. Estos resultados sugieren que la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de Maitake PRO4X se halla por encima de los 2000 mg/kg.

**Peso corporal.** Los resultados de peso corporal relativo a los 7 y 14 días post administración de Maitake PRO4X se consignan en la Tabla 14.4 y la Fig. 22.4.

**Tabla 14.4.** *Peso corporal relativo.* El mismo corresponde a la primera y segunda semana post administración de la dosis aguda de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X en ratones BALB/c de ambos sexos. Los resultados se indican como media  $\pm$  2 desvíos estándar, relativos al día 0. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) durante los chequeos semanales. Las diferencias no significativas ( $p > 0,05$ ) no fueron consignadas en la tabla.

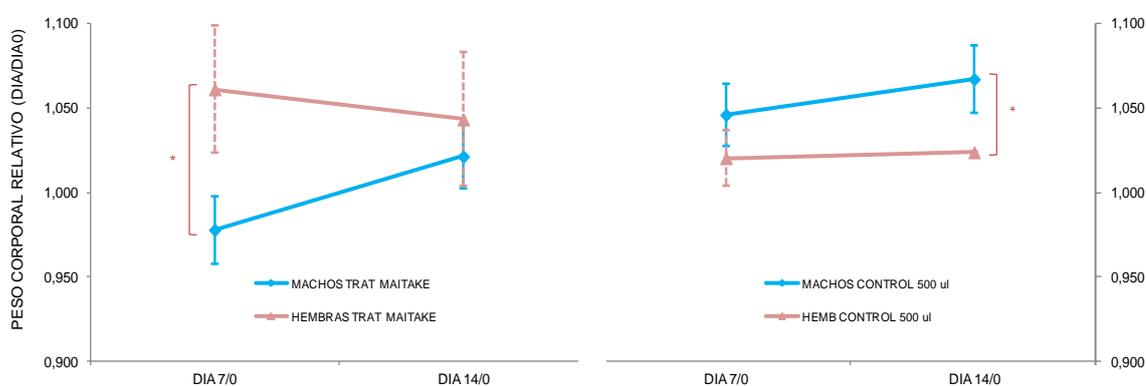
	CONTROL MACHOS	TRATADO MACHOS	Valos p vs Control	CONTROL HEMBRAS	TRATADO HEMBRAS	Valos p vs Control
DIA 7/0	1,046 $\pm$ 0,02	0,978 $\pm$ 0,02	significativo	1,021 $\pm$ 0,02	1,061 $\pm$ 0,04	ns
DIA 14/0	1,067 $\pm$ 0,02 (*vs 7/0)	1,021 $\pm$ 0,02	significativo	1,024 $\pm$ 0,00	1,044 $\pm$ 0,04	ns



**Figura 22.4.** *Efecto de la dosis aguda de Maitake sobre el peso corporal.* Se graficó el peso corporal relativo de machos BALB/c (izquierda celeste) y hembras BALB/c (derecha rosa) a los días 7 y 14 post administración aguda. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estandar, se expresaron como peso medio relativo al día 0. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) entre los grupos experimentales. Las diferencias no significativas ( $p > 0,05$ ) no se indicaron en la figura.

Los resultados consignados en la Tabla 14.4 y la Fig. 22.4 respecto del efecto de la dosis aguda en el peso corporal, han demostrado que la misma disminuyó significativamente el peso de los machos a los 7 y a los 14 días (\* $p < 0,05$  vs Control), mientras que en hembras no hubo diferencias significativas de peso ( $p > 0,05$  vs Control) (Fig. 22.4, derecha).

Al comparar los efectos de la dosis aguda en el peso según el sexo, hemos observado que al día 7 post administración hubo un efecto reductor de peso significativamente mayor en machos que en hembras (\* $p < 0,05$ ), mientras en el grupo Control, los machos tuvieron un peso significativamente mayor al de las hembras (día 14 del ensayo, \* $p < 0,05$ ) (Fig. 23.4).

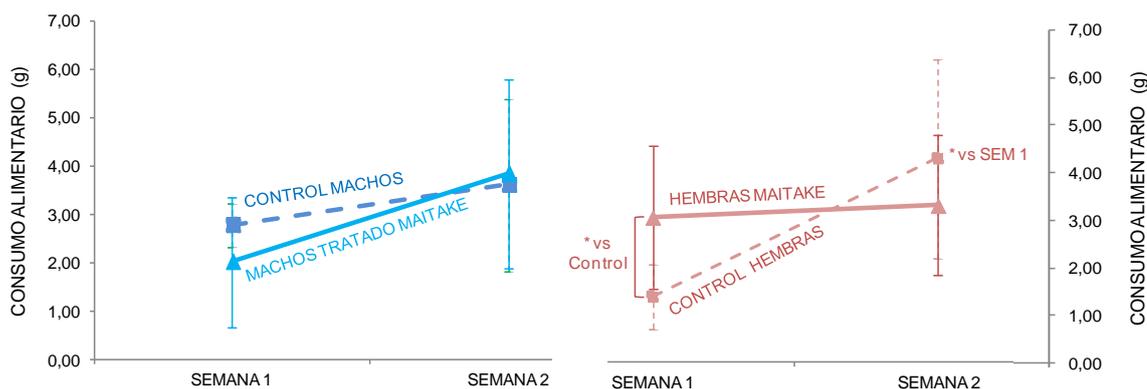


**Figura 23.4.** Efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X en el peso según el sexo. Se indica el peso corporal de machos y hembras BALB/c a los 7 y 14 días post administración. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como peso medio relativo al día 0. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ) durante los chequeos semanales.

**Consumo alimentario.** Los resultados de consumo alimentario diario correspondientes a la primera y segunda post administración de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X se consignan en la Tabla 15.4 y la Fig. 24.4.

**Tabla 15.4.** Consumo alimentario diario/ratón. Los datos pertenecen a la 1° y 2° semana post administración de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos. Se hallaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) de consumo alimentario durante los chequeos semanales.

GRUPOS EXPERIMENTALES	MACHOS		HEMBRAS	
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 1	SEMANA 2
CONTROL	2,78 $\pm$ 0,46	3,61 $\pm$ 1,79	1,35 $\pm$ 0,66	4,18 $\pm$ 2,03 (*vs Sem 1)
TRATADO MAITAKE 2000 mg/kg	2,02 $\pm$ 1,35	3,84 $\pm$ 1,95	2,97 $\pm$ 1,47 (*vs Control)	3,21 $\pm$ 1,43

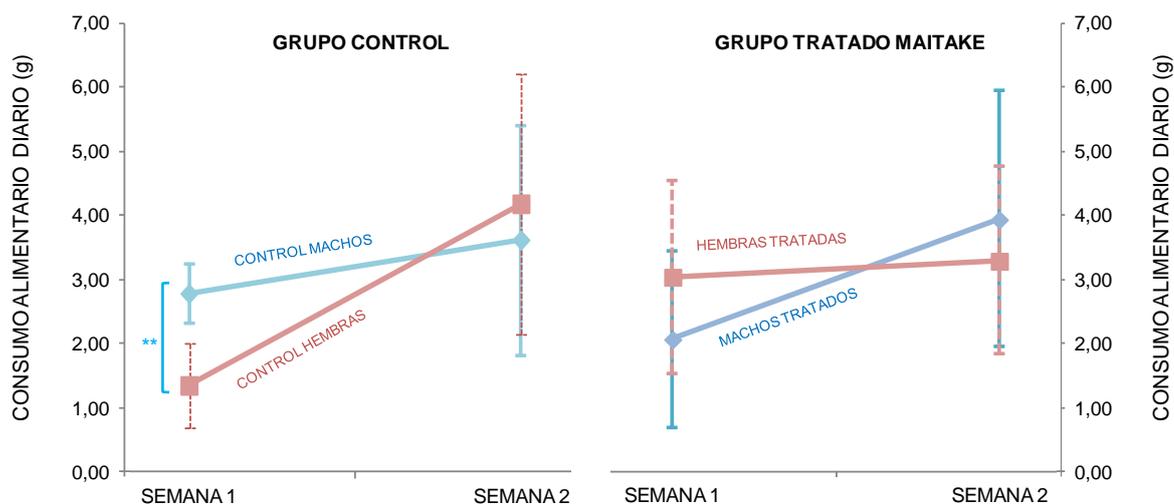


**Figura 24.4.** Efecto de 2000 mg/kg de Maitake sobre el consumo alimentario. Se grafica el efecto de la dosis aguda del extracto glicoproteico en machos BALB/c (izquierda color azul) y hembras (derecha color rosa). Los resultados, indicados en gramos, corresponden a la primera y segunda semana post administración de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X. Se indicó el valor medio  $\pm$  2 desvíos estándar del consumo alimentario. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y no significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Tabla 15.4 y la Fig. 24.4 sobre el efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X en el consumo alimentario, indicaron que 2000 mg/kg del extracto glicoproteico no indujeron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la cantidad de alimento ingerido por los machos BALB/c respecto del Control. Tampoco se observaron diferencias de consumo alimentario entre las semanas 1 y 2 post administración del extracto de *G. frondosa*.

Por el contrario, en hembras BALB/c Maitake indujo aumento significativo del consumo alimentario ( $*p < 0,05$ ) respecto del Control en la primera semana post administración. Mientras que no se observaron diferencias significativas de consumo alimentario en hembras Tratadas entre las semanas 1 y 2 post administración, a diferencia de las hembras Control que consumieron significativamente más alimento en la segunda semana respecto de la primera (con  $*p < 0,05$ ).

La comparación de consumo alimentario por sexo se indica en la Fig. 25.4.



**Figura 25.4.** Consumo alimentario según el sexo. Se indica el consumo de ratones BALB/c durante la primera y segunda semana post administración de la dosis aguda de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas durante los chequeos semanales.

Al comparar el consumo alimentario por sexo (Fig. 25.4), observamos que las hembras del Control consumieron significativamente menos alimento que los machos del mismo grupo durante la primera semana del ensayo (\*\* $p < 0,01$ ). Mientras que machos y hembras Tratados con Maitake PRO4X no mostraron diferencias significativas de consumo alimentario asociadas al sexo en ninguna de las dos semanas post administración de Maitake ( $p > 0,05$ ).

**Signos de toxicidad.** Las observaciones diarias correspondientes a la inspección clínica y conductual de los animales se consignan en la Tabla 16.4-A. Dichas observaciones fueron agrupadas según la Directiva EU 2016/63 del Parlamento europeo (Tabla 16.4-B), la cual reconoce la importancia de la utilización de los animales de experimentación en los avances científicos [202].

**Tabla 16.4.** Signos clínicos y conductuales. La inspección de los animales tratados con 2000 mg/kg del extracto glicoproteico se realizó diariamente. **A)** Signos clínicos y conductuales observados. **B)** Agrupación según la Directiva EU 2016/63 del Parlamento europeo.

A

RATON BALBC	MACHO CONTROL 1 (MC-NR)	MACHO CONTROL 2 (MC-RR)	MACHO CONTROL 3 (MC-R)	MACHO TRATADO 1 (MT-N)	MACHO TRATADO 2 (MT-NN)	HEMBRA CONTROL 1 (HC-RR)	HEMBRA CONTROL 2 (HC-R)	HEMBRA TRATADA 1 (HT-N)	HEMBRA TRATADA 2 (HT-NN)	HEMBRA TRATADA 3 (HT-NR)
INFLAMACION ABDOMINAL	Día 0-Día 1	Día 0-Día 1	Día 0-Día 1	NO	NO	Día 0	Día 0	NO	NO	NO
LETARGO	NO	NO	Día 0	NO	NO	Día 0	NO	NO	NO	NO
MIDRIASIS	NO	NO	NO	NO	NO	Día 0	Día 0	NO	Día 0	NO
PILOBRECCION	NO	NO	NO	Días 0-1-2-3-4	Días 1-2-3-4	NO	NO	NO	NO	Día 0
COMPORTAMIENTO EXTRAÑO	Día 2 (*)	Día 2 (*)	Día 0 (*)-Día 2(*)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CAMBIOS EN COLORACIÓN DE PELAJE	NO	NO	NO	Días 0-1-2-3	NO	NO	NO	NO	NO	NO
INFLAMACION URETRAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Día 1
AGRESIVIDAD	NO	NO	NO	Día 10-Día 11	Día 10-Día 11	NO	NO	NO	NO	NO
CAMBIOS EN MEMBRANAS MUCOSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CAMBIOS EN PIEL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SECRECIONES Y EXCRECIONES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
LA CRIMACION	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SALIVACION	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
PATRON RESPIRATORIO	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
CONVULSIONES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CONSISTENCIA DE HECES	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
CAMBIOS EN EL PASO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
POSTURA	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
RESPUESTA A LA MANIPULACION	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
ALTERACION MOV. TONICOS/CLONICOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CONDUCTA ESTEREOTIPADA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CATALEPSIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
TEMBLORES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SOMNOLENCIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

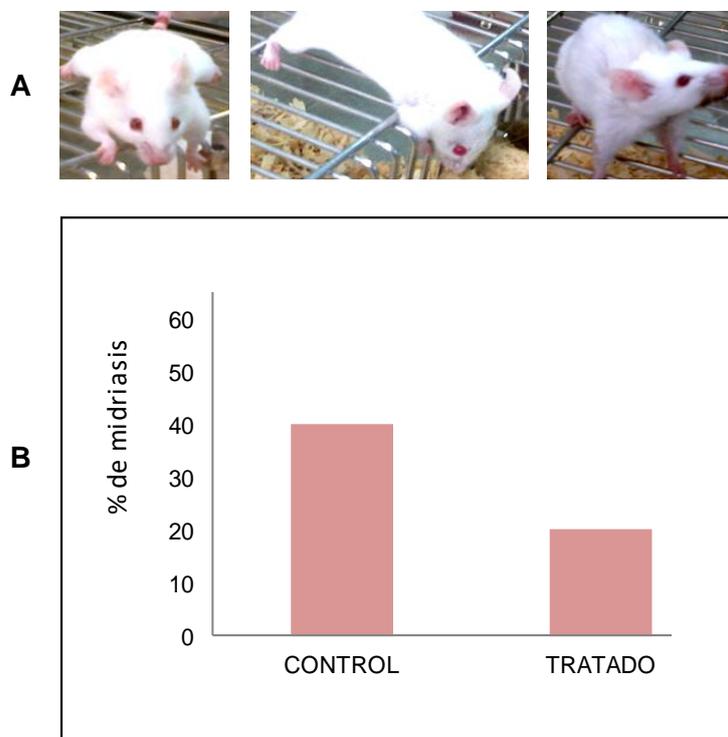
\*CAVO PARA ESCONDERSE BAJO LA VIRUTA

**B**

CATEGORIAS PRINCIPALES	PARAMETROS A CONSIDERAR SEGUN LA DIRECTIVA 2010/63 EU	CONTROL 3 µl de AGUA			CONTROL 500 µl de AGUA			TRATADO CON MITAKE 2000 mg/kg peso		
		MC	HC1	HC 2 y 3	MC	HEMBRAS	MT	HT 1	HT 2	HT 3
HABITAT NATURAL DE LOS ANIMALES	CICLO DE LUZ/OSCURIDAD	12/12horas	12/12horas	12/12horas						
	TEMPERATURA AMBIENTAL	20-22°C	20-22°C	20-22°C						
	HUMEDAD AMBIENTAL	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%
	RECAMBIO DE CAMAS DE VIRUTA	Semanal	Semanal	Semanal						
	NUMERO DE RATONES/JAULA	2	3	3	3	2	2	3	3	3
FACTORES FISICOS	VENTILACION	Monitoreada digitalmente	Monitoreada digitalmente	Monitoreada digitalmente						
	CAMBIOS EN LA RESPIRACION POR EFECTO DE LA VENTILACION	NO	NO	NO						
	SENSIBILIDAD A SONIDOS DE ALTA FRECUENCIA	NO	NO	NO						
COMPORTAMIENTO SOCIAL	AGRESIVIDAD DE MACHOS	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO
	EFFECTO DE ACCION DE FEROMONAS	NO	NO	NO						
COMUNICACIÓN Y SENTIDOS	EMISION DE SONIDOS AUDIBLES O ULTRASONICOS	NO	NO	NO						
	SENSIBILIDAD DE DETECCION DE CAMBIOS A TRAVES DE SUS VIGOTES	NO	NO	NO						
	PERCEPCION NOCTURNA OCULAR	NO	NO	NO						
NUTRICION	CANIBALISMO	NO	NO	NO						
	COPROFAGIA	NO	NO	NO						
	MDRIASIS	NO	SI	NO	NO	SI	NO	NO	SI	NO
PARAMETROS FISIOLOGICOS	INFLAMACION ABDOMINAL	NO	NO	NO	SI	SI	NO	NO	NO	NO
	PILOERRECCION	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI
COMPORTAMIENTO ASOCIADO AL DOLOR	DESHIDRATACION	NO	NO	NO						

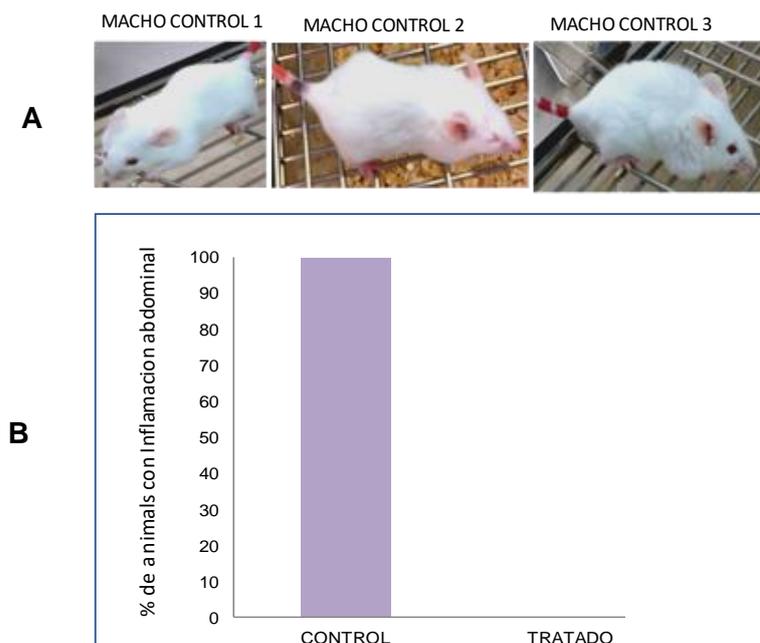
MC: MACHO CONTROL      HC: HEMBRA CONTROL      MT: MACHO TRATADO      HT: HEMBRA TRATADA

- I- MIDRIASIS. Tras la administración de la dosis aguda se observó dilatación pupilar sólo en hembras, Control y Tratado. El signo tuvo una persistencia de 24 h (Fig. 26.4).



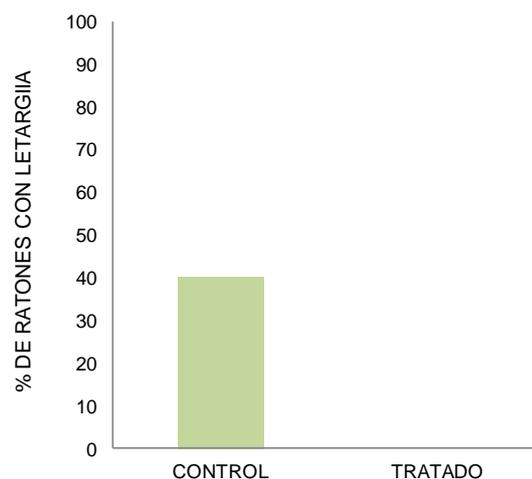
**Figura 26.4.** *Midriasis*. La misma corresponde al signo clínico de toxicidad observado tras la administración de las dosis agudas. **A)** Las fotografías ilustran midriasis observada solo en las hembras de ambos grupos experimentales con una persistencia de 24 h. **B)** El gráfico indica el % de midriasis en hembras Control y Tratadas con Maitake PRO4X.

- II- INFLAMACIÓN ABDOMINAL. Se observó distensión abdominal solo en animales del grupo Control, tanto machos como hembras, inmediatamente a la administración de 500  $\mu$ l de agua. El signo tuvo una persistencia de 24 h en las hembras, y 48 h en los machos (Fig. 27.4).



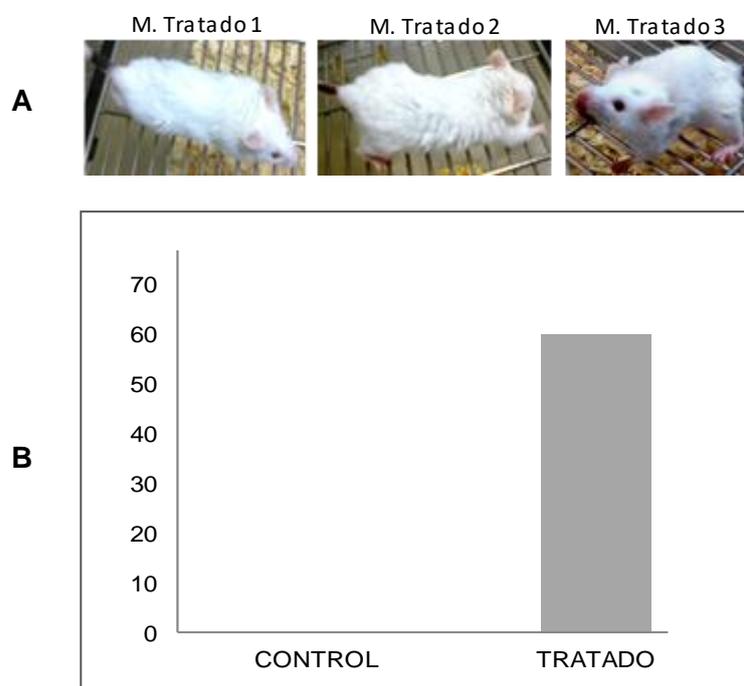
**Figura 27.4.** *Inflamación abdominal.* La misma corresponde al signo clínico de toxicidad observado tras la administración de las dosis agudas. **A)** Las fotografías corresponden a machos Control con inflamación abdominal. **B)** El gráfico indica los porcentajes de animales Control y Tratado con inflamación abdominal.

- III- LETARGIA. Se observó comportamiento aletargado, inmovilidad y escasa reacción a estímulos en 2 de los 5 ratones Control (Macho Control 3 y Hembra Control 1) tras la administración de 500  $\mu$ l de agua. El signo persistió por 24 h (Fig. 28.4).



**Figura 28.4.** *Letargia, inmovilidad y ausencia de reacción.* Los mismos corresponden al signo clínico de toxicidad observado tras la administración de las dosis agudas. El mismo se registró solo en animales Control de ambos sexos, indicándose los % de ratones con este signo.

- IV- PILOERRECCION.** Se observó piloercción solo en ratones Tratados de ambos sexos, tras la administración de la dosis aguda de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X. Este signo fue el más persistente en el tiempo (Fig. 29.4).



**Figura 29.4. Piloercción.** La misma corresponde al signo clínico de toxicidad observado tras la administración de la dosis aguda de Maitake PRO4X. **A)** Las fotografías ilustran la piloercción de los animales Tratados. **B)** El gráfico indica el % de piloercción en los animales de ambos grupos experimentales.

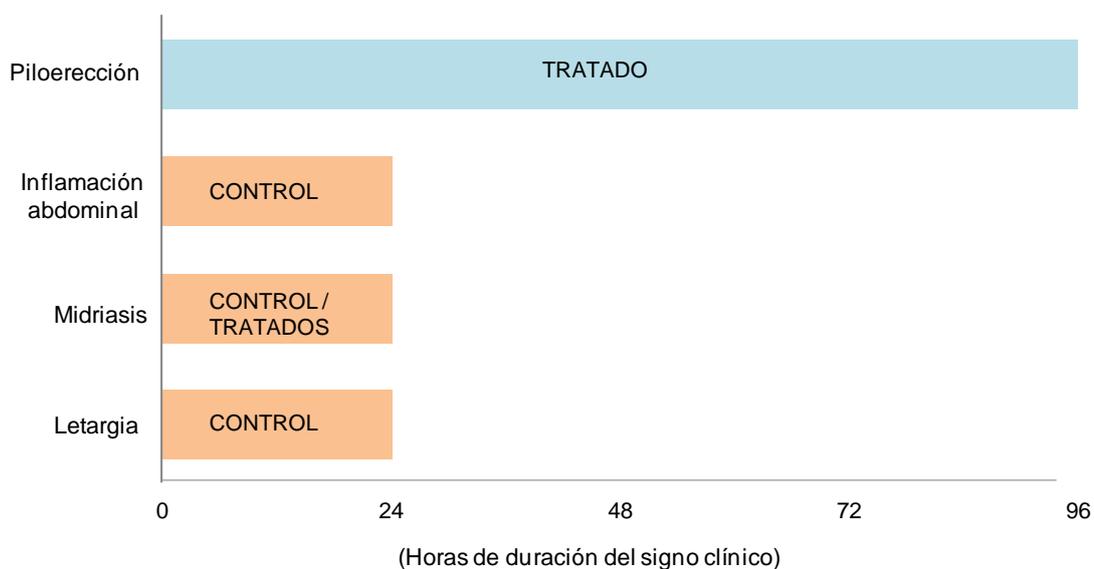
Además de piloercción, se observó cambios en la coloración del pelaje de uno de los animales tratados (Macho Tratado 1), el cual presentó color blanco-amarillento, tras la administración de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X, recuperando la coloración normal a las 96 h.

- V- CONDUCTA AGRESIVA.** Se observó conducta agresiva en el macho Tratado 1 hacia su compañero Macho Tratado 2, a partir del día 10 post administración (Fig. 30.4), registrándose en el primero una notoria dilatación testicular. Consecuentemente, los machos Tratados debieron ser separados, ubicándose en cajas distintas.



**Figura 30.4.** *Conducta agresiva.* La misma se observó en machos Tratados a partir del día 10 de la administración de la dosis aguda. Como resultado, los machos debieron ser separados y colocados en cajas individuales.

La duración de los signos clínicos y conductuales observados en la inspección de los animales se consigna en la Fig. 31.4.



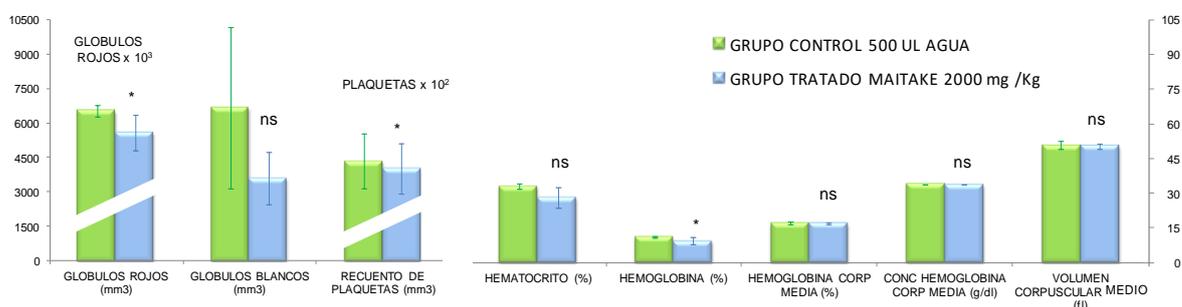
**Figura 31.4.** *Duración de signos clínicos y conductuales.* Los mismos fueron registrados durante la inspección de los animales tras la administración de las dosis agudas. La mayoría de ellos tuvieron una duración inferior a las 24 h.

A partir del día 5 del ensayo, los animales de ambos grupos experimentales presentaron conducta y reflejos posturales normales, hábitos de aseo y respuesta habitual a los estímulos, así como también normal consumo alimentario y de agua *ad libitum* en correspondencia a su especie. No se observaron conductas anormales, ni signos indicativos de toxicidad aguda y/o alteraciones fisiológicas graves, excepto la conducta agresiva de los machos tratados al día 10 del experimento.

**Resultados hematológicos.** Los resultados de hematología clínica en sangre periférica colectada durante la autopsia de los ratones, tras finalizar el ensayo de toxicidad aguda, se indican en la Tabla 17.4 y la Fig. 32.4.

**Tabla 17.4.** *Parámetros hematológicos en sangre periférica murina.* La misma fue colectada dos semanas después de la administración de la dosis aguda de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) entre ambos grupos experimentales.

PARAMETROS HEMATOLOGICOS	CONTROL	MAITAKE 2000 mg/kg	Valor p vs CONTROL
HEMATOCRITO (%)	33 $\pm$ 1,22	28,20 $\pm$ 4,44	* significativo
GLOBULOS ROJOS (mm <sup>3</sup> )	6,5 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 2,5 x 10 <sup>5</sup>	5,6 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 7,6 x 10 <sup>5</sup>	* significativo
GLOBULOS BLANCOS (mm <sup>3</sup> )	6660 $\pm$ 3510,41	3600 $\pm$ 1137,98	ns
HEMOGLOBINA (%)	11,18 $\pm$ 0,41	9,52 $\pm$ 1,53	* significativo
RECUESTO DE PLAQUETAS (mm <sup>3</sup> )	4,3 x 10 <sup>5</sup> $\pm$ 1,2 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup> $\pm$ 1,1 x 10 <sup>5</sup>	ns
VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (fl)	50,68 $\pm$ 1,72	50,41 $\pm$ 1,17	ns
HEMOGLOBINA CORP MEDIA (%)	17,17 $\pm$ 0,59	17,01 $\pm$ 0,45	ns
CONC HEMOGLOBINA CORP MEDIA (g/dl)	33,87 $\pm$ 0,06	33,74 $\pm$ 0,13	ns



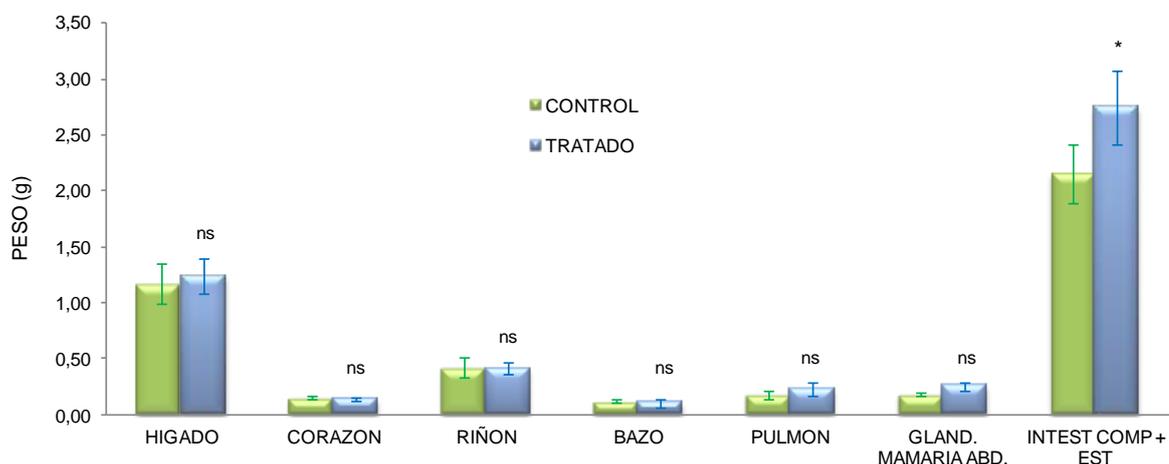
**Figura 32.4.** *Efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X sobre los parámetros hematológicos.* La sangre periférica para las determinaciones fue colectada durante la autopsia de los animales. Los resultados obtenidos, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y no significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Tabla 17.4 y la Fig. 32.4 respecto de los efectos de la dosis aguda de 2000 mg/kg de Maitake PROX sobre los parámetros hematológicos, mostraron que la dosis aguda indujo disminución significativa (\* $p < 0,05$  vs Control) en el número de glóbulos rojos (de 6,5 x 10<sup>6</sup>  $\pm$  2,5 x 10<sup>5</sup> a 5,6 x 10<sup>6</sup>  $\pm$  7,6 x 10<sup>5</sup>), plaquetas (de 4,3 x 10<sup>5</sup>  $\pm$  1,2 x 10<sup>5</sup> a 4,0 x 10<sup>5</sup>  $\pm$  1,1 x 10<sup>5</sup>) y % de hemoglobina (de 11,18  $\pm$  0,41 a 9,52  $\pm$  1,53). No se observaron cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en el recuento leucocitario (mm<sup>3</sup>), % hematocrito, volumen corpuscular medio (fl), hemoglobina corpuscular media (%) y concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl).

**Estudios de órganos internos.** El efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X sobre el peso de los órganos internos (hígado, pulmón, riñón, corazón, intestino delgado y grueso, bazo, estómago y glándula mamaria en hembras) de ratones BALB/c se indica en la Tabla 18.4 y Fig. 33.4.

**Tabla 18.4.** Peso de órganos internos al finalizar el ensayo de toxicidad aguda. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar se expresaron en gramos, observándose diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) no significativas ( $p > 0,05$ ) en los grupos experimentales.

ORGANOS INTERNOS	CONTROL	MAITAKE 2000 mg	Valor p vs CONTROL
HIGADO	1,17 $\pm$ 0,18	1,24 $\pm$ 0,16	ns
CORAZON	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	ns
RIÑON	0,42 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,05	ns
BAZO	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,04	ns
PULMON	0,18 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,06	ns
GLAND. MAMARIA ABD.	0,18 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,04	ns
INTEST COMP + ESTOM	2,16 $\pm$ 0,26	2,75 $\pm$ 0,33	* significativo

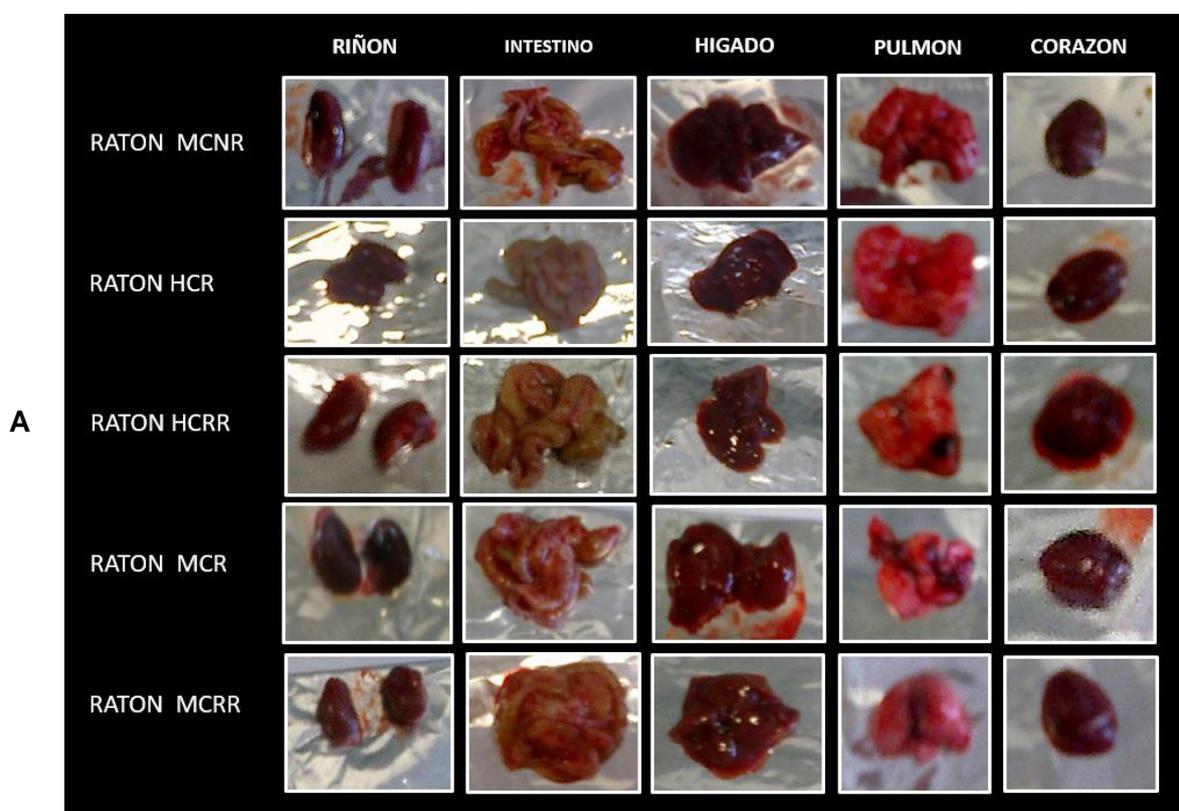


**Figura 33.4.** Efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X sobre el peso de órganos internos. El peso se determinó durante la autopsia de ratones BALB/c, a las dos semanas de la administración de 2000 mg/kg peso de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos.

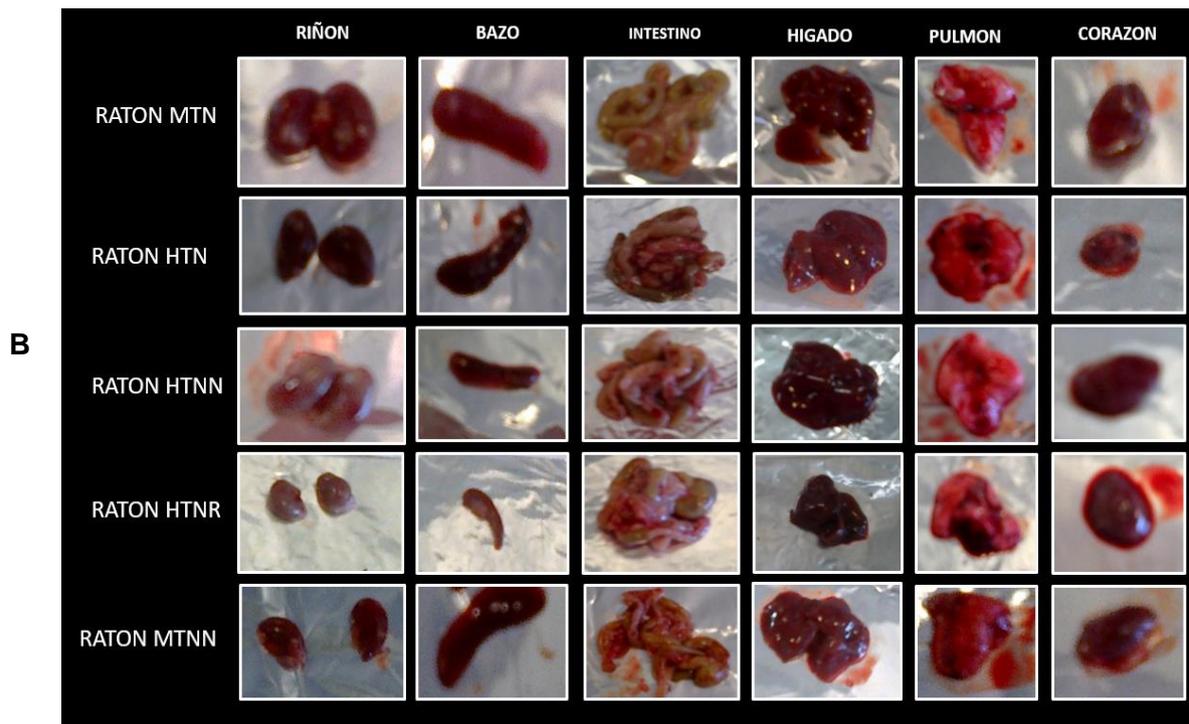
Los resultados consignados en la Tabla 18.4 y la Fig. 33.4 respecto del efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X en el peso de órganos internos, demostró que los ratones Tratados presentaron un peso significativamente mayor ( $*p < 0,05$ ) en intestino completo + estómago (de  $2,16 \pm 0,26$  a  $2,75 \pm 0,33$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de peso para corazón, bazo, glándula mamaria, hígado, riñones y pulmones respecto del Control.

Análisis macroscópico. El examen macroscópico de los órganos internos se efectuó durante la autopsia de los animales, tras finalizar el ensayo de toxicidad aguda. No se observaron diferencias evidentes de aspecto, estructura o coloración para los órganos estudiados (hígado, corazón, riñón, bazo, pulmón, intestino completo + estómago) (Fig. 34.4).

#### GRUPO CONTROL



## GRUPO TRATADO MAITAKE



**Figura 34.4.** Efecto de la dosis aguda sobre el aspecto macroscópico de los órganos internos. Los mismos fueron removidos durante la autopsia de los animales, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda del extracto glicoproteico. **A)** Fotografías de los órganos internos del grupo Control. **B)** Fotografías de los órganos internos del Grupo tratado con 2000mg/kg de Maitake PRO4X.

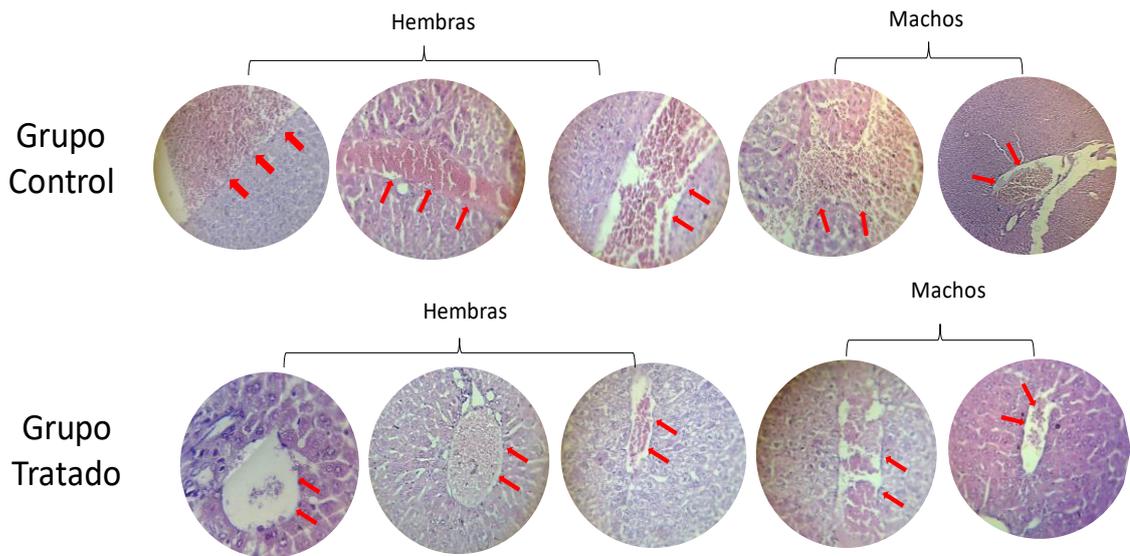
La glándula mamaria abdominal de hembras BALB/c no presentó diferencias evidentes de aspecto y coloración entre los grupos experimentales (Fig. 35.4).



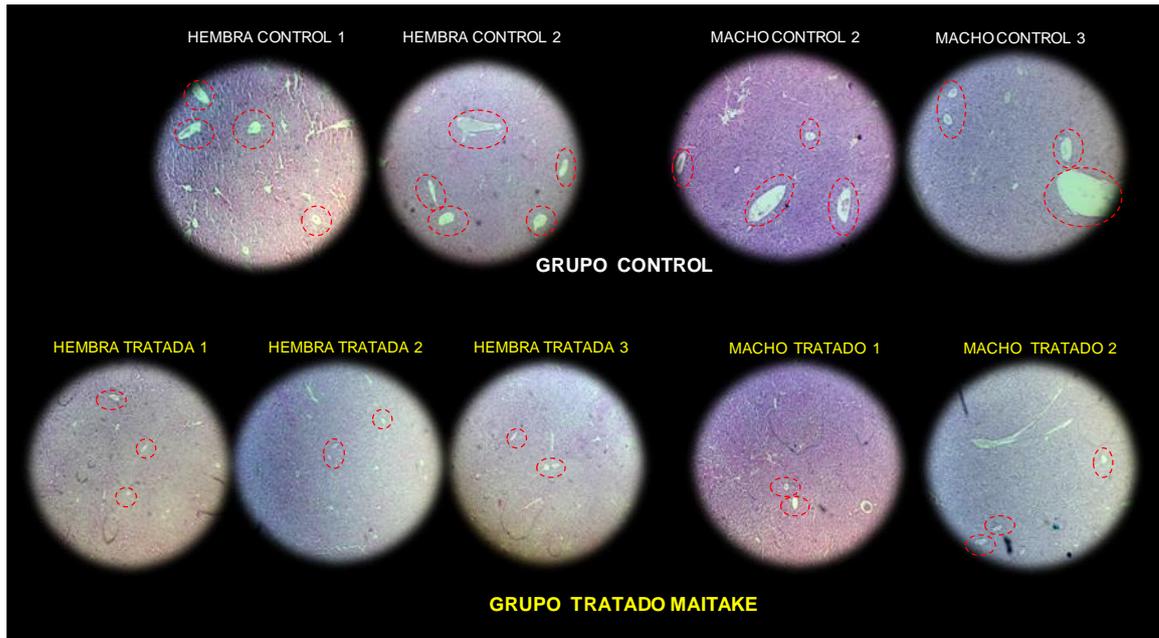
**Figura 35.4.** Efecto de la dosis aguda de Maitake PRO4X sobre el aspecto macroscópico de la glándula mamaria abdominal. El tejido fue removido durante la autopsia de las hembras BALB/c, al finalizar el ensayo de administración de la dosis aguda de Maitake PRO4X.

Estudio histológico. El examen microscópico de los órganos internos, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X, permitió registrar las siguientes observaciones:

**I) Tejido Hepático.** Los animales Tratados presentaron menor densidad de vasos sanguíneos/unidad de área en el tejido, con calibre más reducido (Fig. 36.4 y 37.4). El interior de los vasos sanguíneos presentó pocos eritrocitos, de aspecto normal, con excepción del Macho Tratado 1.

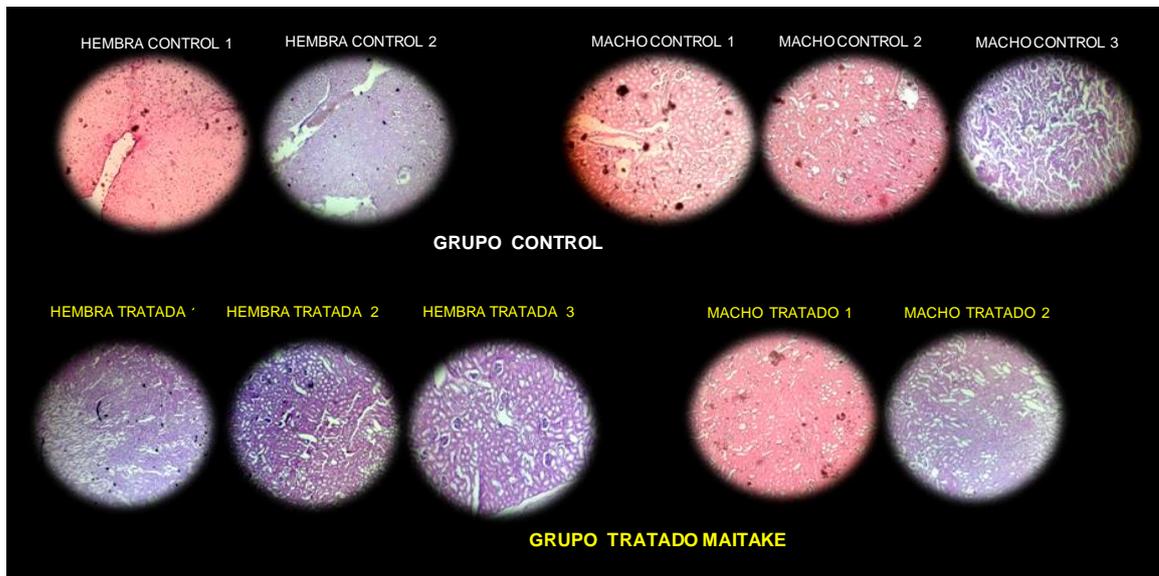


**Figura 36.4.** Corte transversal de tejido hepático murino. Las microfotografías corresponden al tejido incluido en parafina y teñidos con H-E. El mismo fue removido durante la autopsia de los animales, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda. Las flechas rojas indican la dimensión de los vasos sanguíneos.



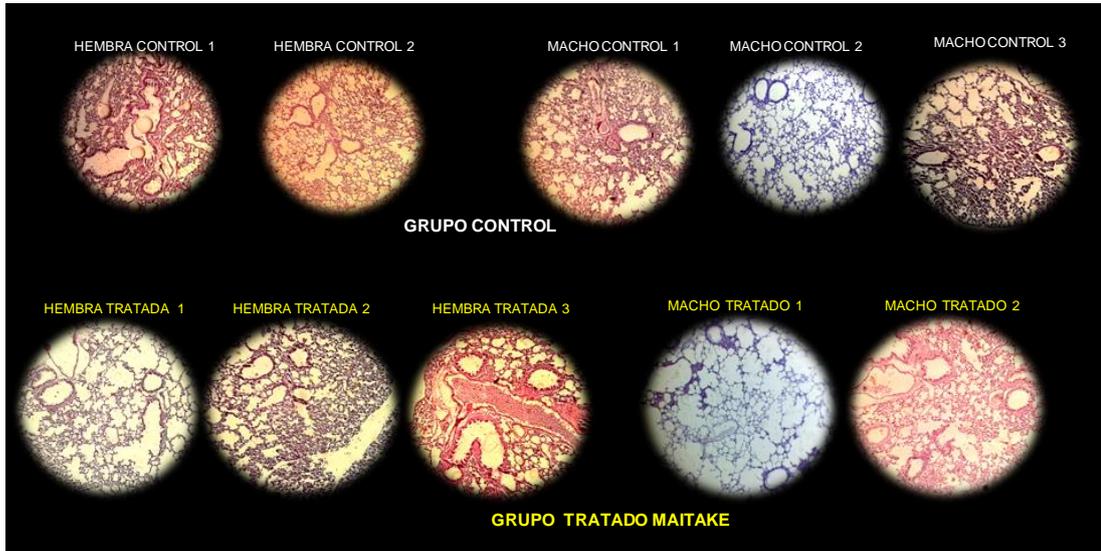
**Figura 37.4.** Corte transversal de tejido hepático murino. Las microfotografías corresponden al tejido incluido en parafina y teñidos con H-E. El mismo fue removido durante la autopsia de los animales, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda. En círculo rojo punteado se indica la ubicación de vasos sanguíneos hepáticos.

**II) Tejido renal.** Los ratones tratados presentaron estructura renal normal, sin alteraciones evidentes ni presencia de infiltrados leucocitarios indicativos de inflamación (Fig. 38.4).



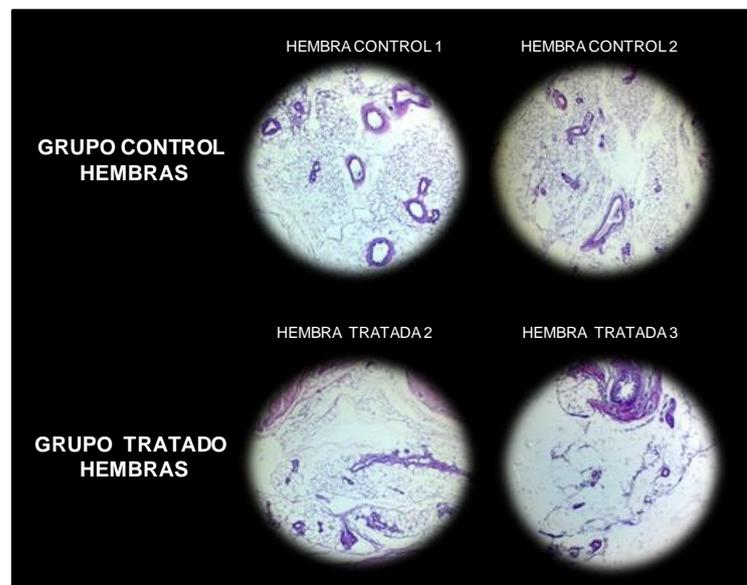
**Figura 38.4.** Corte transversal de tejido renal murino. Las microfotografías corresponden al tejido incluido en parafina y teñidos con H-E x100. El mismo fue removido durante la autopsia de los animales, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda de Maitake PRO4X.

**III) Tejido Pulmonar.** Se observó estructura pulmonar normal en ambos grupos experimentales, Control y Tratado (Fig. 39.4).



**Figura 39.4.** Corte transversal de tejido pulmonar murino. Las microfotografías corresponden al tejido incluido en parafina y teñidos con H-E x100. El mismo fue removido durante la autopsia de los animales, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda.

**IV) Tejido Mamario.** La arquitectura glandular mamaria se observó normal para ambos grupos experimentales, sin alteraciones estructurales evidentes (Fig. 40.4).



**Figura 40.4.** Corte transversal de tejido glandular mamario abdominal. Las microfotografías corresponden al tejido murino incluido en parafina y teñidos con H-E x100. El mismo fue removido durante la autopsia de los animales, a las dos semanas de la administración de la dosis aguda de Maitake PRO4X.

**Expresión de genes específicos.** El efecto de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X en la expresión de genes específicos de tejido mamario abdominal de hembras BALB/c se investigó para los genes ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC. La expresión de estos había resultado modulada por Maitake en estudios previos de nuestro grupo [200]. Los resultados de espectrofotometría correspondientes a concentración, pureza e integridad del RNA total aislado de tejido mamario, se consignaron en la Tabla 19.4.

**Tabla 19.4.** *Concentración, pureza e integridad del RNA de tejido mamario.* El mismo fue removido a las dos semanas de la administración de una dosis aguda de Maitake PRO4X. La concentración, pureza e integridad de RNA se determinó por espectrofotometría y absorbancia a 260 nm, empleando electroforesis en gel de agarosa al 3%.

CUANTIFICACION RNA <sub>r</sub> DE TEJIDO MAMARIO ABDOMINAL DE HEMBRAS BALBc								
GRUPO EXPERIMENTAL	HEMBRA	Dilucion	Abs260 nm	Ratio	% PUREZA	ng RNA/ $\mu$ l	ng RNA en 9 $\mu$ l	ng RNA puros en 9 $\mu$ l
CONTROL 500 $\mu$ l agua	1	1/100	0,146	1,361	68	584	5256	3574,08
	2	1/100	0,27	1,48	73	1080	9720	7095,60
TRATADO MAITAKE 2000 mg/kg	1	1/100	0,08	1,215	60	320	2880	1728,00
	2	1/100	0,108	0,854	42	432	3888	1632,96
	3	1/100	0,153	1,187	59	612	5508	3249,72

Posteriormente, con el RNA purificado y cuantificado, se realizaron reacciones de RT-PCR para estudiar expresión específica de los genes ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC. Como control se consideró la expresión génica de la  $\beta$ -actina. Los resultados obtenidos se indican en la Fig. 41. Estos indicaron que las bandas específicas de 90 pb del gen  $\beta$ -actina se expresaron en los tejidos mamaros de ambos grupos experimentales. La expresión de  $\beta$ -actina se utilizó como control de expresión proteica para normalizar los niveles de los demás genes investigados.

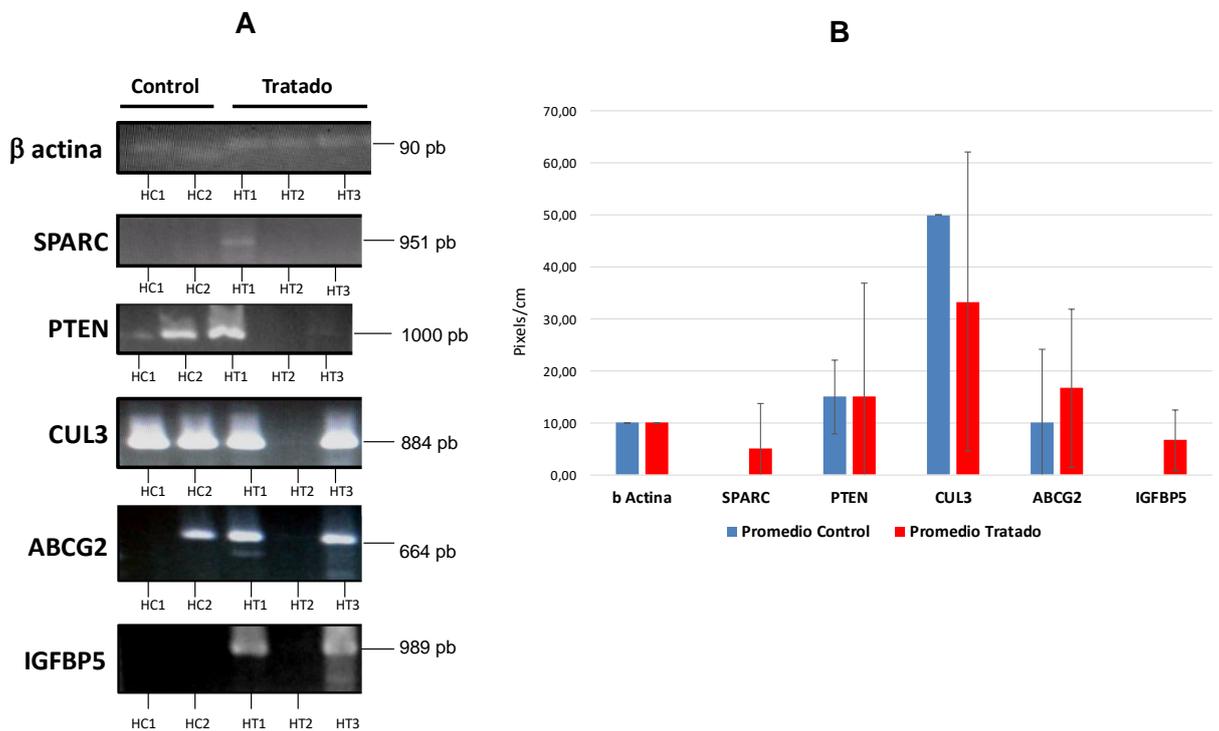
Las bandas específicas de 951 pb correspondientes al gen SPARC se visualizaron en el ratón HT-1 del grupo Tratado. No se observaron bandas en ninguno de los tejidos mamaros del grupo Control. Por otra parte, la gráfica de la Fig. 41.4-B indica que la expresión del gen SPARC del Grupo Tratado no mostro diferencias significativas respecto del control.

El gen PTEN se expresó tanto en el grupo Control como en uno de los animales del grupo Tratado, por lo cual su semicuantificación (Fig. 41.4-B) no mostro diferencias significativas de expresión entre ambos grupos experimentales. El gen CUL3 se expresó en los tejidos mamaros de ambos grupos, excepto el ratón HT-2 (Fig. 41.4-A), de modo que su semicuantificación no mostró diferencias significativas en los dos grupos experimentales. El gen ABCG2 también se expresó en ambos grupos experimentales, y como consecuencia no se hallaron diferencias significativas de su semicuantificación (Fig. 41.4-B).

Sin embargo, el gen IGFBP5 se expresó solo en el grupo Tratado con Maitake estando ausente su expresión en el grupo Control, de modo que hubo diferencia significativa de expresión, siendo el único gen que mostro diferencias entre Control y Tratado.

El ratón HT-2 Tratado solo presentó bandas de expresión para  $\beta$ -actina, lo cual indica que, a pesar de no haber registrado bandas en el gel desnaturizante, el RNA podría haber sido degradado.

Cabe señalar que los tejidos mamarios analizados en esta sección fueron normales y libres de tumor ya que pertenecían a animales sanos sin inducción tumoral.



**Figura 41.4.** Efecto de la dosis aguda de Maitake sobre la expresión de genes específicos de tejido mamario. **A)** Fotografía de los genes SPARC, PTEN, IGFBP5, ABCG2 y CUL3 de ambos grupos experimentales sembrados en gel de agarosa al 3%, tomando como control la expresión génica de la  $\beta$ -actina. **B)** Gráfico de semicuantificación de la expresión génica de cada uno de los genes investigados; las columnas azules indican valores promedio y D.S del grupo control, mientras que en rojo se señalan valor medio y D.S del grupo Tratado (\*  $p < 0,05$ ).

### IV.3.2 Toxicidad subaguda

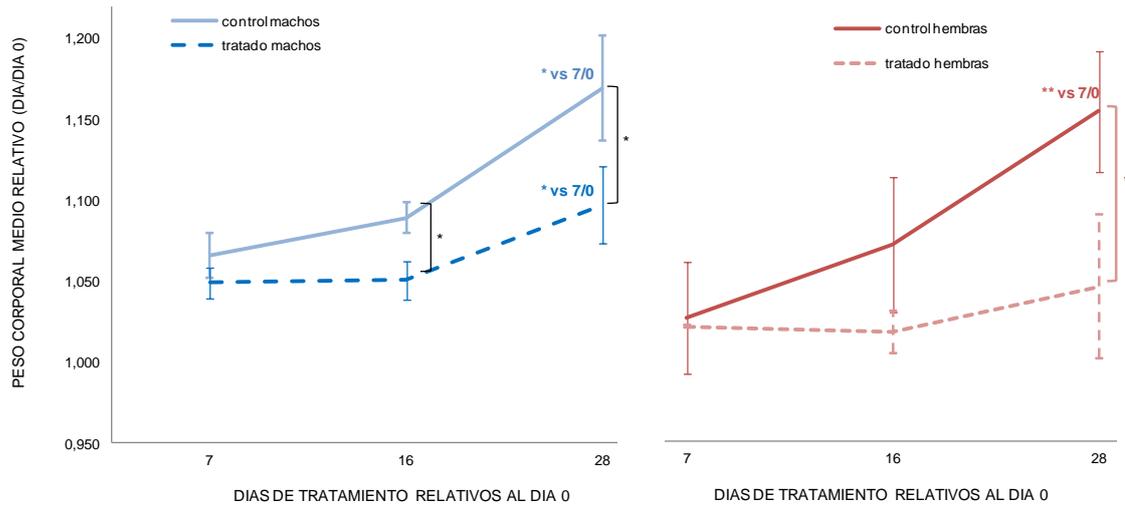
Este ensayo de administración a dosis repetida durante 28 días tuvo por finalidad completar la caracterización toxicológica del extracto glicoproteico de Maitake. Para ello, ratones BALB/c sanos de ambos sexos, de 6-8 semanas de edad con un peso comprendido entre 19-25 g, se dividieron en dos grupos experimentales: Control (que recibió 20  $\mu$ l/día de agua destilada) y Tratado oralmente con 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X -llevado a volumen final de 20  $\mu$ l con agua destilada-. Al día 28 los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

**Mortalidad.** Tras 28 días de tratamiento oral con Maitake PRO4X, no se produjo mortalidad de ningún ratón por administración de 5 mg/kg/día del producto. Resultados previos de toxicidad aguda demostraron que la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) del extracto glicoproteico se halla por encima de los 2000 mg/kg.

**Peso corporal.** Los resultados de peso corporal medio, relativo al día 0, durante las semanas 1, 2 y 3 de administración diaria de Maitake PRO4X se consignan en la Tabla 20.4 y Fig. 42.4.

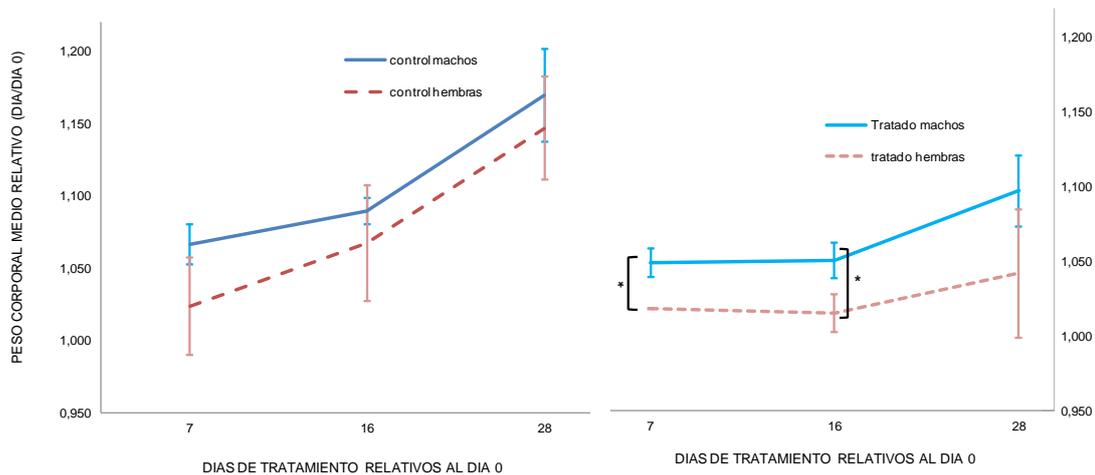
**Tabla 20.4. Peso corporal relativo.** El mismo pertenece a ratones BALB/c, a los días 7, 16 y 28 de administración de Maitake PRO4X 5 mg/kg/día. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estandar, se expresaron como peso medio relativo al día 0. Se hallaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$ ) de peso durante los chequeos semanales.

CAMBIOS EN PESO CORPORAL MEDIO (g) EN RELACION AL DIA 0						
GRUPOS EXPERIMENTALES	PESO MEDIO RELATIVO DE MACHOS RESPECTO DEL DIA 0 (MEDIA $\pm$ DS)			PESO MEDIO RELATIVO DE HEMBRAS RESPECTO DEL DIA 0 (MEDIA $\pm$ DS)		
	DIA 7	DIA 16	DIA 28	DIA 7	DIA 16	DIA 28
CONTROL	1,066 $\pm$ 0,01	1,089 $\pm$ 0,01 (*vs 7/0)	1,170 $\pm$ 0,03 (*vs 7/0)	1,024 $\pm$ 0,03	1,067 $\pm$ 0,04 (**vs 7/0)	1,147 $\pm$ 0,04 (**vs 7/0)
TRAT MAITAKE 5 mg/kg peso	1,049 $\pm$ 0,01	1,051 $\pm$ 0,01 (*vs Control)	1,097 $\pm$ 0,02 (*vs Control) (*vs 7/0)	1,019 $\pm$ 0,001	1,015 $\pm$ 0,01	1,042 $\pm$ 0,04 (*vs Control)



**Figura 42.4.** Efecto de la dosis repetida de Maitake PRO4X en el peso corporal. Se determinó el peso relativo al día 0 de ratones BALB/c machos (izquierda color azul) y hembras (derecha color rosa). El mismo se registró a los días 0, 7, 16 y 28 de tratamiento. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como peso relativo al día 0.

Los resultados de la Tabla 20.4 y la Fig. 42.4 sobre el efecto de la dosis repetida de Maitake PRO4X en el peso corporal relativo, demostraron que los machos Tratados presentaron descensos significativos de peso ( $*p < 0,05$  vs Control) a los días 16 y 28, mientras que las hembras Tratadas presentaron descensos significativos solo al día 28 ( $*p < 0,05$  vs Control). El efecto de Maitake en el peso comparando el sexo de los animales, se indica en la Fig. 43.4.



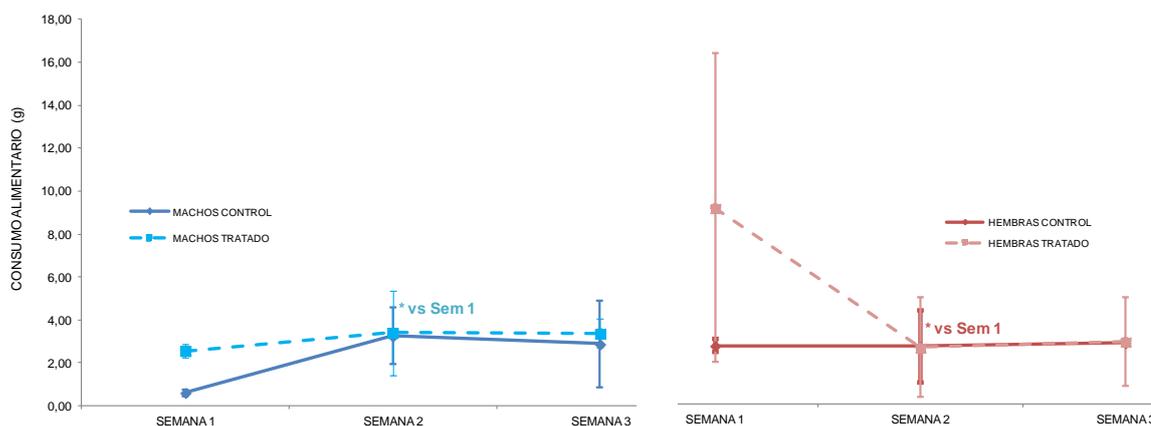
**Figura 43.4.** Efecto de la dosis repetida de Maitake PRO4X sobre el peso relativo de machos y hembras BALB/c a los días 7, 16 y 28 de tratamiento. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como peso medio relativo al día 0. Se observaron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y no significativas (n.s,  $p > 0,05$ ) durante los chequeos semanales.

Considerando el sexo de los animales, y el efecto de Maitake en el peso, hemos observado que el extracto glicoproteico tuvo un efecto reductor de peso más significativo en hembras que en machos a los días 7 y 16 (con  $*p < 0,05$ ) (Fig. 43.4), mientras que no se observó diferencias de peso en machos y hembras del grupo Control.

**Consumo alimentario.** Los resultados de consumo alimentario (en gramos), durante el tratamiento con 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X se consignan en la Tabla 21.4 y la Fig. 44.4.

**Tabla 21.4. Consumo alimentario.** El mismo pertenece a ratones BALB/c en las tres primeras semanas de tratamiento con 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos. Se observaron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ), muy significativas ( $**p < 0,01$ ) y no significativas ( $p > 0,05$ ) de consumo alimentario durante los chequeos semanales.

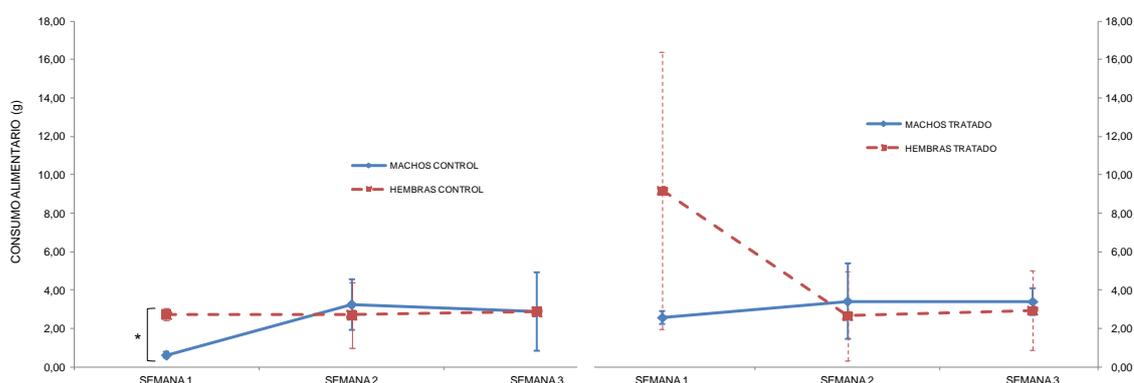
CAMBIOS EN EL CONSUMO ALIMENTARIO MEDIO DIARIO/RATON (g)						
GRUPOS EXPERIMENTALES	CONSUMO ALIMENTARIO DIARIO (g)/ MACHO BALBc (MEDIA $\pm$ DS)			CONSUMO ALIMENTARIO DIARIO (g)/ HEMBRAS BALBc (MEDIA $\pm$ DS)		
	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3
CONTROL	0,62 $\pm$ 0,16	3,25 $\pm$ 1,32 (*vs Sem 1)	2,88 $\pm$ 2,04	2,74 $\pm$ 0,30	2,71 $\pm$ 1,69	2,88 $\pm$ 0,002
TRAT MAITAKE 5 mg/kg peso	2,57 $\pm$ 0,33	3,41 $\pm$ 1,97	3,40 $\pm$ 0,69	9,18 $\pm$ 7,21	2,66 $\pm$ 2,32 (*vs Sem 1)	2,94 $\pm$ 2,08



**Figura 44.4. Efecto de la dosis repetida de Maitake PRO4X sobre el consumo alimentario.** Se estudió el consumo de machos y hembras BALB/c, siendo expresado en gramos. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como consumo alimentario semanal. Se observaron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y no significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de la ingesta durante los chequeos semanales.

Los resultados consignados en la Tabla 21.4 y la Fig. 44.4 respecto del efecto de 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X sobre el consumo alimentario semanal, demostraron que el extracto glicoproteico indujo un aumento significativo del consumo ( $*p<0,05$ ) en machos Tratados durante la segunda semana de tratamiento respecto de la primera (de  $2,57 \pm 0,33$  a  $3,41 \pm 1,97$ ). Mientras que, en hembras tratadas, Maitake generó reducción significativa de consumo alimentario ( $*p<0,05$ ) durante la segunda semana respecto de la primera (de  $9,18 \pm 7,21$  a  $2,66 \pm 2,32$ ). No se observaron diferencias significativas de consumo alimentario respecto de los Controles ( $p>0,05$ ).

El efecto de Maitake en el consumo alimentario comparando el sexo de los animales, se indica en la Fig. 45.4.



**Figura 45.4.** Efecto de las dosis repetidas de Maitake PRO4X en el consumo alimentario según el sexo. Se consideró el sexo de ratones BALB/c. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como consumo alimentario semanal. Se observaron diferencias significativas ( $*p<0,05$ ) y no significativas ( $p>0,05$ ) entre los valores de la ingesta durante los chequeos semanales.

Los resultados de consumo alimentario según el sexo de los animales (Fig. 45.4), demostraron que solo en la primera semana, las hembras Control tuvieron una ingesta alimentaria significativamente más alta que los machos Control ( $*p<0,05$ ). Mientras que Maitake no indujo en machos vs hembras diferencias significativas de consumo alimentario ( $p>0,05$ ) en ninguna semana del ensayo.

**Signos de toxicidad.** Las observaciones correspondientes a inspección clínica y conductual de los animales durante el tratamiento diario con Maitake PRO4X, se consigna en la Tabla 22.4-A. Las mismas fueron agrupadas según la Directiva EU 2016/63 del Parlamento europeo (Tabla 22.4-B) [202].

**Tabla 22.4. Signos clínicos y conductuales.** Los mismos corresponden a ratones BALB/c tratados con 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X. **A)** Observaciones registradas diariamente durante el transcurso del experimento. **B)** Observaciones agrupadas según la Directiva EU 2016/63 del Parlamento europeo.

A

IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES	MACHO CONTROL 1 (MC-N)	MACHO CONTROL 2 (MC-NN)	MACHO TRATADO 1 (MT-NR)	MACHO TRATADO 2 (MT-RR)	MACHO TRATADO 3 (MT-R)	HEMERA CONTROL 1 (HC-N)	HEMERA CONTROL 2 (HC-NN)	HEMERA CONTROL 3 (HC-NR)	HEMERA TRATADA 1 (HT-RR)	HEMERA TRATADA 2 (HT-R)
INFLAMACION ABDOMINAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Día 12 (**)	NO
LETARGO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
MIDRIASIS	NO	NO	NO	NO	NO	Días 4 y 12	NO	NO	Día 3	NO
PILOERRECCION	NO	NO	Días 1 a 3, 5 a 7, 14 a 16	Días 1 a 3, 5 a 7, 14 a 17	Días 1 a 3, 5 a 7, 14 a 18	NO	NO	NO	NO	NO
COMPORTAMIENTO EXTRAÑO	NO	Días 4 (*) y 12(*)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CAMBIOS EN COLORACIÓN DE PELAJE	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
INFLAMACION URETRAL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	Día 2	NO	NO
AGRESIVIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CAMBIOS EN MEMBRANAS MUCOSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CAMBIOS EN PIEL	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SECRECIONES Y EXCRECIONES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
LACRIMACION	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SALIVACION	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
PATRON RESPIRATORIO	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
CONVULSIONES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CONSISTENCIA DE HECES	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
CAMBIOS EN EL PASO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
POSTURA	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
RESPUESTA A LA MANIPULACION	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
ALTERACION MOV. TONICOS/CLONICOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CONDUCTA ESTEREOTIPADA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CATALEPSIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
TEMBLORES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SOMNOLENCIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

\*CAVO PARA ESCONDERSE BAJO LA VIRUTA

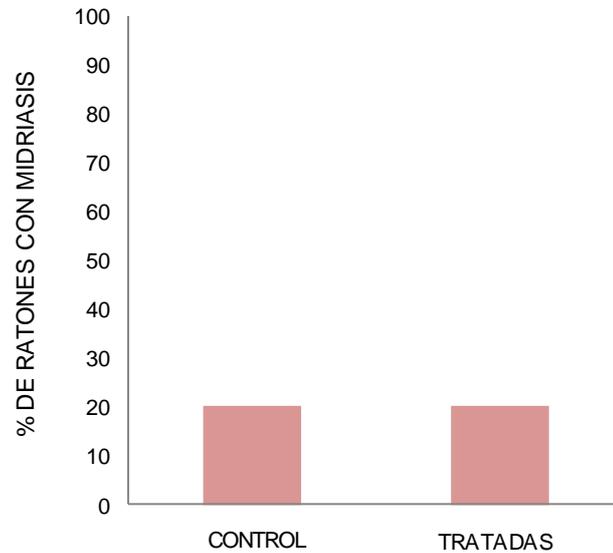
\*\*TENIA INFLAMADA LA GLANDULA MAMARIA IZQUIERDA

0

CATEGORIAS PRINCIPALES	PARAMETROS A CONSIDERAR SEGÚN LA DIRECTIVA 2010/63 EU	CONTROL			TRATADO CON MAITAKE 5 mg/kg/día		
		MC	HC1	HC 2/HC 3	MT	HT 1	HT 2
HABITAT NATURAL DE LOS ANIMALES	CICLO DE LUZ/OSCURIDAD	12/12HS	12/12HS	12/12HS	12/12HS	12/12HS	12/12HS
	TEMPERATURA AMBIENTAL	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C
	HUMEDAD AMBIENTAL	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%	50-60%
	RECAMBIO DE CAMAS DE VIRUTA	semanal	semanal	semanal	semanal	semanal	semanal
	NUMERO DE RATONES/JAULA	2	3	3	3	2	2
FACTORES FISICOS	VENTILACION	monitoreada digitalmente	monitoreada digitalmente	monitoreada digitalmente	monitoreada digitalmente	monitoreada digitalmente	monitoreada digitalmente
	CAMBIOS EN LA RESPIRACION POR EFECTO DE LA VENTILACION	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SENSIBILIDAD A SONIDOS DE ALTA FRECUENCIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO
COMPORTAMIENTO SOCIAL	AGRESIVIDAD DE MACHOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	EFECTO DE ACCION DE FEROMONAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
COMUNICACIÓN Y SENTIDOS	EMISION DE SONIDOS AUDIBLES O ULTRASONICOS	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	SENSIBILIDAD DE DETECCION DE CAMBIOS ATRAVES DE SUS VIGOTES	NO	NO	NO	NO	NO	NO
NUTRICION	PERCEPCION NOCTURNA OCULAR	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	CANIBALISMO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	COPROFAGIA	NO	NO	NO	NO	NO	NO
PARAMETROS FSIOLÓGICOS	MIDRIASIS	NO	SI	NO	NO	NO	SI
	INFLAMACION ABDOMINAL	NO	NO	NO	NO	NO	SI
COMPORTAMIENTO ASOCIADO AL DOLOR	PILOERECCIÓN	NO	NO	NO	SI	NO	NO
	DESHIDRATACION	NO	NO	NO	NO	NO	NO

MC: MACHO CONTROL      HC: HEMBRA CONTROL      MT: MACHO TRATADO      HT: HEMBRA TRATADA

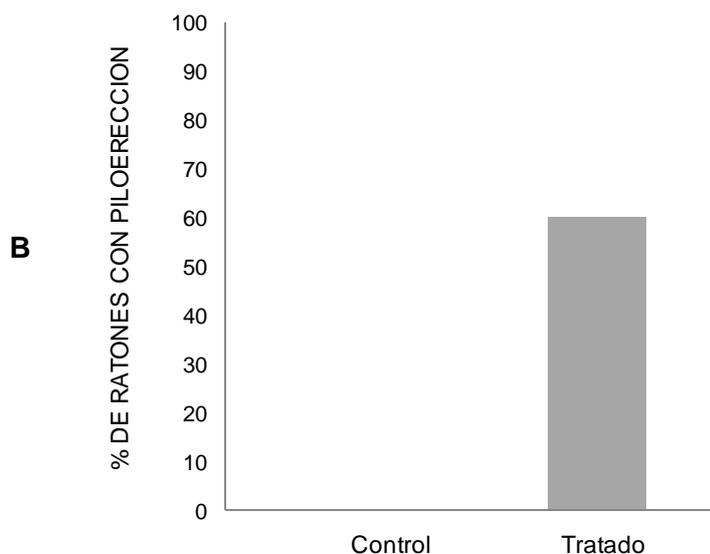
**MIDRIASIS.** Se observó dilatación pupilar en hembras de ambos grupos experimentales. La misma tuvo una persistencia de 24 h (Fig. 46.4).



**Figura 46.4. Midriasis.** La misma corresponde al signo clínico de toxicidad observado tras la administración de la dosis diaria de agua y Maitake. El grafico indica el % de midriasis en hembras Control y Tratadas, el cual tuvo una persistencia de 24 horas.

**PILOERECCION.** Se observó piloerección solo en machos Tratados. Fue el signo clínico de mayor persistencia en el tiempo, aunque de aparición intermitente. Inicialmente, los machos presentaron piloerección dorsal leve, pero a partir del día 5, cambió a ventral. Desde el día 7, la piloerección fue tanto dorsal como ventral (Fig. 47.4).





**Figura 47.4. Piloerección.** La misma corresponde al signo clínico de toxicidad observado tras la administración de la dosis diaria de Maitake. El signo fue el de mayor persistencia en el tiempo. **A)** Las fotografías ilustran la piloerección observada solo en los machos Tratados, con 96 horas de persistencia. **B)** El gráfico indica el % de piloerección en los grupos Control y Tratado.

**INFLAMACION MAMARIA.** Se registró leve inflamación de la glándula mamaria izquierda correspondiente a la Hembra Tratada 1, el día 12 de tratamiento con Maitake (Fig. 48.4).



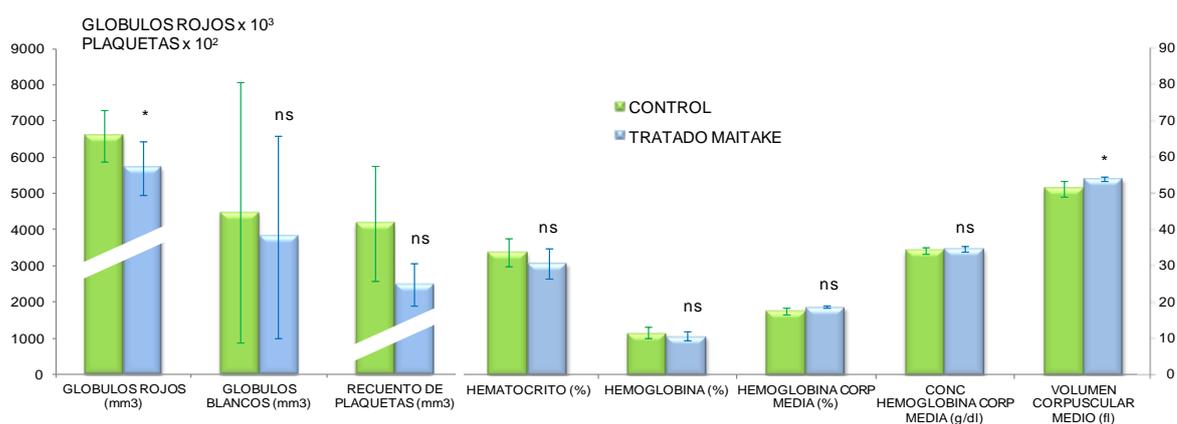
**Figura 48.4. Inflamación mamaria.** La misma se observó en la glándula mamaria izquierda de una de las hembras BALB/c del grupo Tratado con Maitake. El círculo punteado indica la región mamaria afectada por la inflamación.

Al finalizar el período de observación, todos los animales presentaron conducta y reflejos posturales normales, hábitos de aseo y respuesta habitual a los estímulos nociceptivos, así como consumo alimentario y agua en correspondencia a su especie. No se observaron conductas anormales ni signos indicativos de toxicidad.

**RESULTADOS HEMATOLÓGICOS.** Los resultados de hematología clínica en sangre periférica se consignan en la Tabla 23.4 y la Fig. 49.4.

**Tabla 23.4. Parámetros hematológicos murinos.** Se determinaron dichos parámetros en sangre periférica tras finalizar el tratamiento diario con Maitake PRO4X 5 mg/kg. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  2 desvíos estándar. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ), y no significativas (n.s  $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

	CONTROL	TRAT. MAITAKE 5 mg	Valor p vs Control
HEMATOCRITO (%)	33,75 $\pm$ 3,95	30,75 $\pm$ 4,11	ns
GLOBULOS ROJOS (mm <sup>3</sup> )	6,59x10 <sup>6</sup> $\pm$ 7,18x10 <sup>5</sup>	5,70x10 <sup>6</sup> $\pm$ 7,36x10 <sup>5</sup>	* ( $p < 0,05$ )
GLOBULOS BLANCOS (mm <sup>3</sup> )	4,48x10 <sup>3</sup> $\pm$ 3,58x10 <sup>3</sup>	3,80x10 <sup>3</sup> $\pm$ 2,80x10 <sup>3</sup>	ns
HEMOGLOBINA (%)	11,58 $\pm$ 1,59	10,68 $\pm$ 1,31	ns
RECUENTO DE PLAQUETAS (mm <sup>3</sup> )	4,17x10 <sup>5</sup> $\pm$ 1,59x10 <sup>5</sup>	2,48x10 <sup>5</sup> $\pm$ 5,77x10 <sup>4</sup>	ns
VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (fl)	51,24 $\pm$ 2,19	53,95 $\pm$ 0,56	* ( $p < 0,05$ )
HEMOGLOBINA CORP MEDIA (%)	17,54 $\pm$ 1,03	18,74 $\pm$ 0,22	ns
CONC HEMOGLOBINA CORP MEDIA (g/dl)	34,23 $\pm$ 0,79	34,75 $\pm$ 0,68	ns



**Figura 49.4. Efecto de Maitake en parámetros hematológicos murinos.** La sangre periférica sobre la cual se efectuaron las determinaciones fue colectada durante la autopsia de ratones BALB/c al finalizar el tratamiento. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, mostraron diferencias significativas (\* $p < 0,05$  vs control) y no significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

Los resultados consignados en la Tabla 23.4 y Fig. 49.4 respecto del efecto de Maitake PRO4X en los parámetros hematológicos murinos, demostraron que la administración diaria del extracto glicoproteico indujo disminución significativa (\* $p < 0,05$ ) del recuento eritrocitario (de  $6,59 \times 10^6 \pm 7,18 \times 10^5/\text{mm}^3$  hasta  $5,70 \times 10^6 \pm 7,36 \times 10^5/\text{mm}^3$ ) y reducción significativa (con  $p < 0,05$ ) del volumen corpuscular medio (de  $51,24 \pm 2,19$  a  $53,95 \pm 0,56$ ).

**Estudio de órganos internos.** Los efectos del tratamiento a dosis repetida de Maitake en el peso de los órganos internos (hígado, pulmón, riñón, corazón, intestino delgado y grueso, bazo, estómago y glándula mamaria) se indican en la Tabla 24.4 y la Fig. 50.4.

**Tabla 24.4.** *Peso de órganos murinos.* Los mismos corresponden a ratones BALB/c de ambos sexos al finalizar el tratamiento con 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X. Los resultados se indicaron en gramos y se expresaron como media  $\pm$  2 desvíos estándar. No se observaron diferencias significativas en el peso de órganos entre ambos grupos experimentales ( $p>0,05$ ).

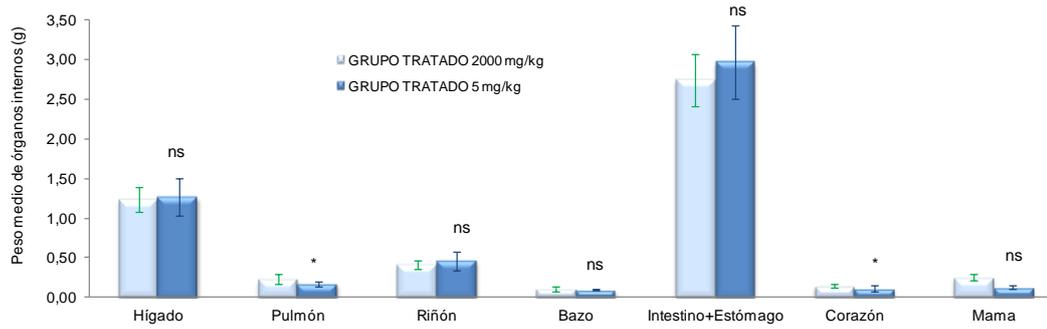
	CONTROL 3 ul AGUA	TRAT MAITAKE 5 mg/kg/día	Valor p Trat Maitake/Control
HIGADO	1,28 $\pm$ 0,18	1,27 $\pm$ 0,24	no significativo
CORAZON	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,03	no significativo
RIÑON	0,39 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,12	no significativo
BAZO	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	no significativo
PULMON	0,17 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,03	no significativo
GLAND. MAMARIA ABD.	0,13 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02	no significativo
INTEST COMP + ESTOMAGO	3,02 $\pm$ 0,29	2,97 $\pm$ 0,47	no significativo



**Figura 50.4.** *Efecto de Maitake en el peso de órganos murinos.* Los mismos corresponden a ratones BALB/c de ambos sexos al finalizar el tratamiento a dosis repetida. Los resultados correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, no mostraron diferencias significativas de peso ( $p>0,05$  vs Control) entre ambos grupos experimentales.

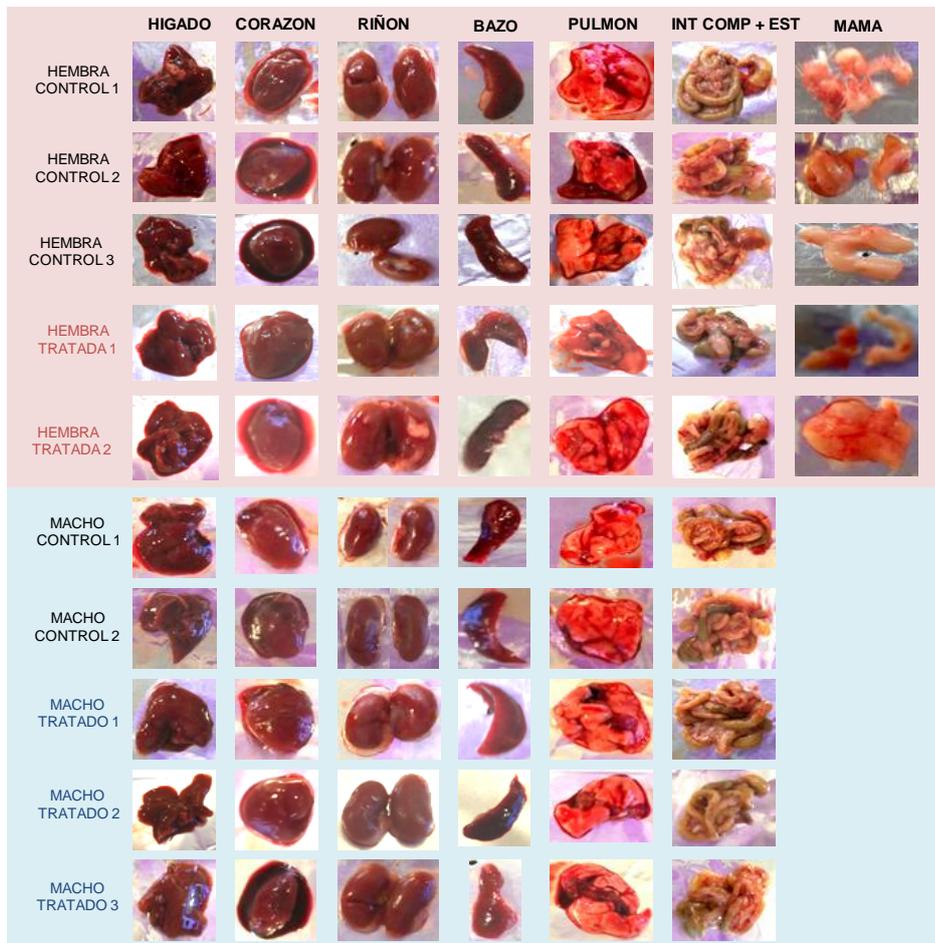
Los resultados consignados en la Tabla 24.4 y la Fig. 50.4 respecto del efecto de Maitake PRO4X 5 mg/kg/día sobre el peso de los órganos internos, demostraron que el extracto glicoproteico no indujo cambios significativos en el peso de ninguno los órganos estudiados ( $p>0,05$ ).

Peso de órganos internos a dosis aguda y dosis repetida de Maitake. Comparando la administración aguda (2000 mg/kg) y repetida (5 mg/kg/día) de Maitake PRO4X, hemos observado que la primera indujo aumentos significativos de peso cardíaco (desde 0,11  $\pm$  0,03 hasta 0,14  $\pm$  0,02 con  $*p<0,05$ ) y pulmonar (de 0,17  $\pm$  0,03 a 0,23  $\pm$  0,06) ( $*p<0,05$ ) respecto de la dosis repetida (Fig. 51.4).



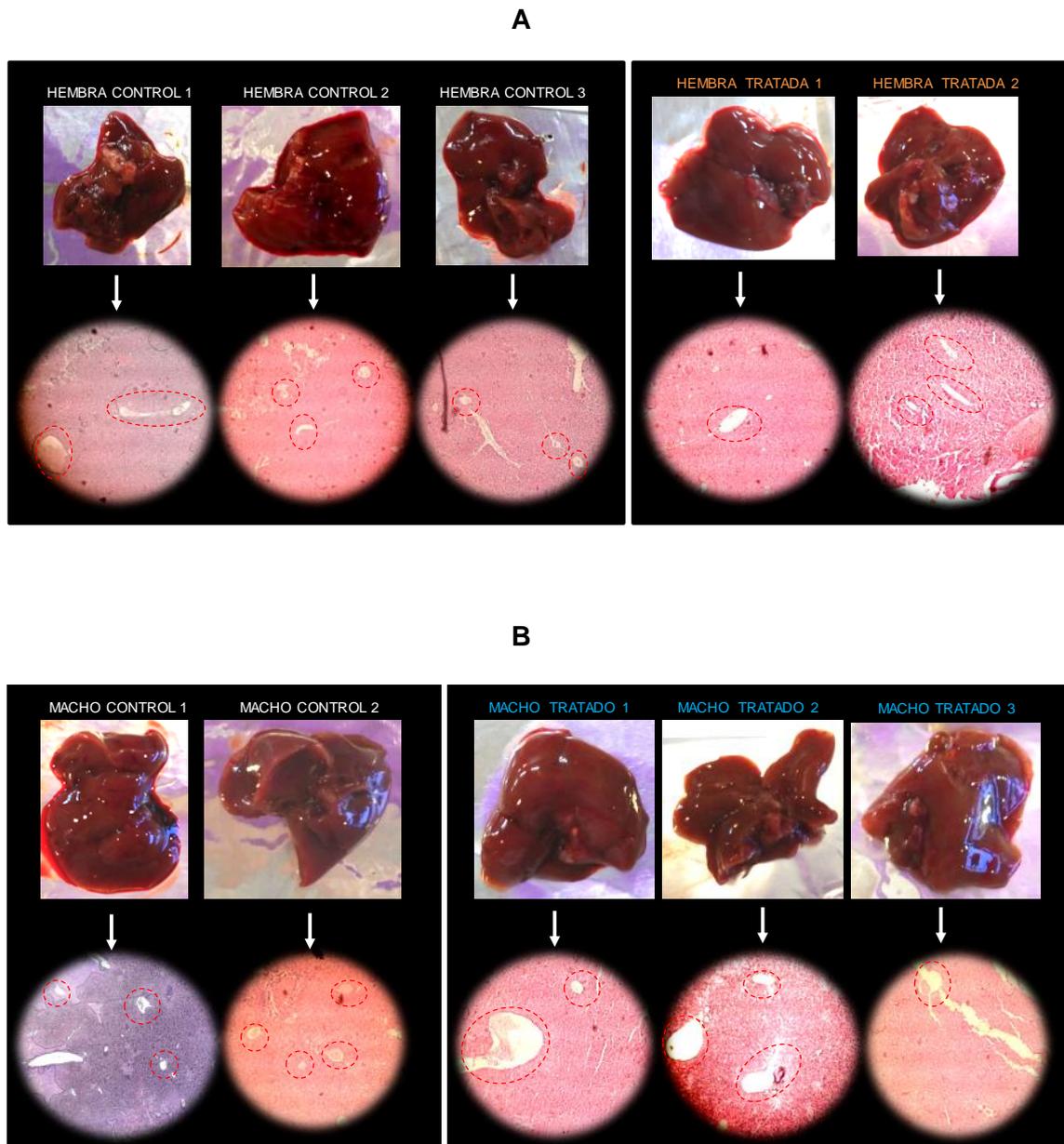
**Figura 51.4.** Efecto de la dosis aguda y repetida de Maitake en el peso de órganos murinos. La remoción y peso de los mismos se efectuó durante la autopsia de los animales al finalizar el tratamiento. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  2 desvíos estándar.

Análisis macroscópico e histológico de órganos internos. El examen macro y microscópico de órganos internos se efectuó al finalizar el tratamiento por 28 días con 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X (Fig. 52.4).



**Figura 52.4.** Efecto de dosis repetidas de Maitake en el aspecto macroscópico de órganos internos. Se indican las fotografías correspondientes a hembras BALB/c (arriba en rosado) y machos BALB/c (abajo en celeste). Los órganos fueron removidos durante la autopsia de los animales, tras finalizar el tratamiento a dosis repetidas.

**I) Hígado.** Macroscópicamente presentó aspecto sanguinolento y textura normal en ambos grupos experimentales. A nivel histológico, se observó arquitectura normal, densidad y calibre de vasos sanguíneos similares a los del grupo Control (Fig. 53.4).



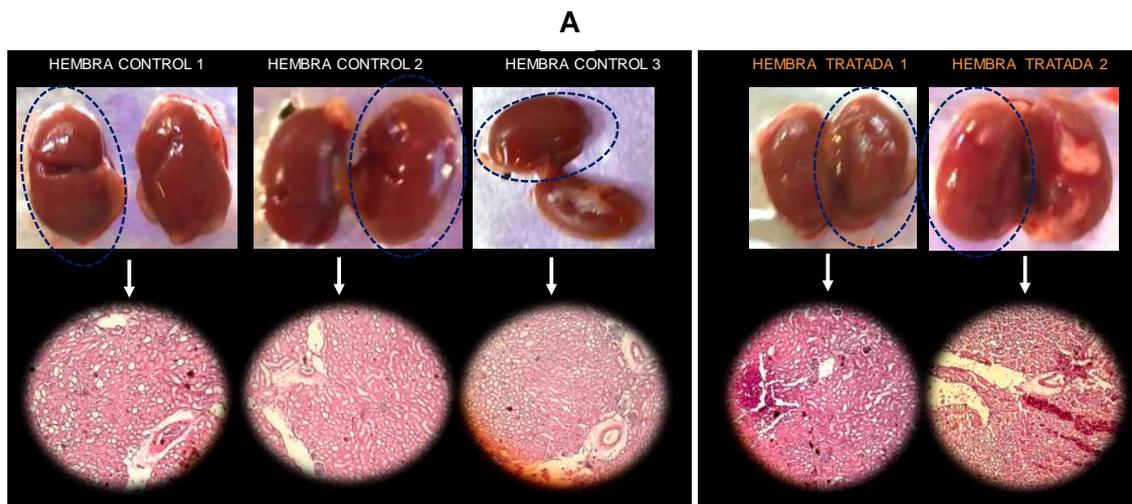
**Figura 53.4.** Efecto de dosis repetidas *Maitake* en el aspecto hepático. **A)** Aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de hígado de hembras BALB/c. **B)** Aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de hígado de machos BALB/c. El estudio microscópico incluyó el registro de microfotografías de corte transversal de tejido hepático incluido en parafina y teñido con H-E x100. En círculo rojo punteado se señala la presencia de vasos sanguíneos hepáticos.

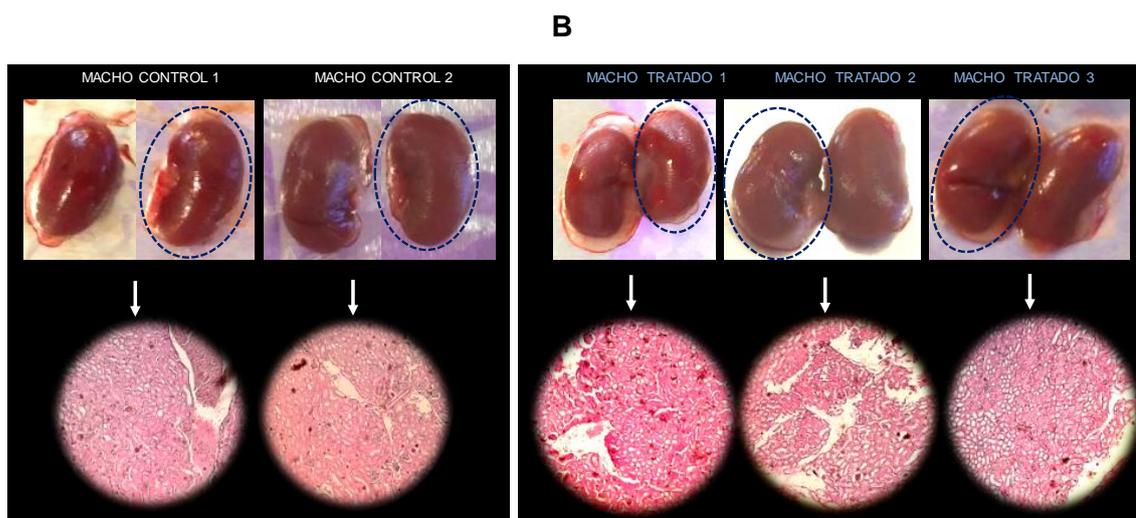
**II) Corazón.** No se observaron diferencias de aspecto y coloración en el órgano cardíaco de ambos grupos experimentales, presentando todos ellos una estructura normal (Fig. 54.4).



**Figura 54.4.** Efecto de dosis repetidas Maitake en el aspecto macroscópico cardíaco. El tejido fue removido durante la autopsia de los animales, tras finalizar el tratamiento. En la parte superior, en rosado, se indica el órgano de hembras BALB/c y en la inferior, en celeste, el de machos BALB/c.

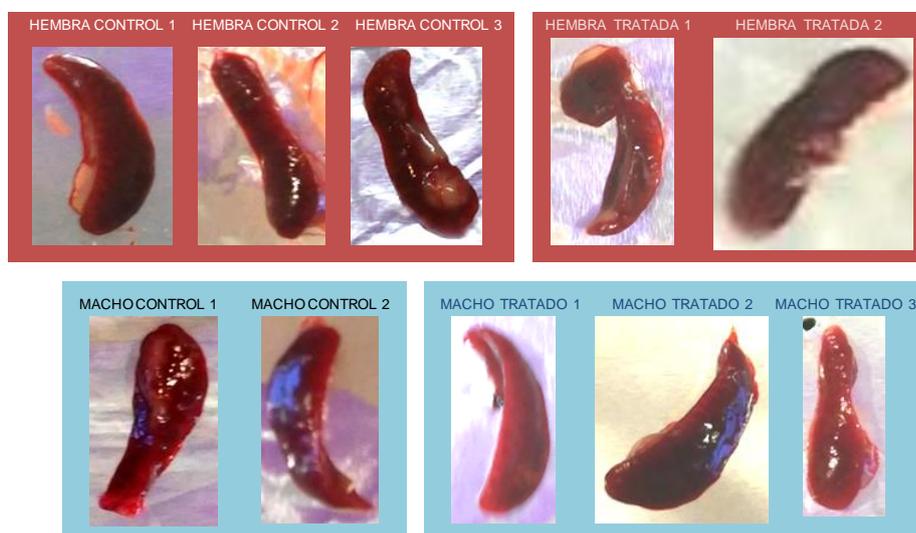
**III) Riñones.** Los animales Tratados con dosis repetidas de Maitake PRO4X 5 mg/kg/día presentaron riñones de aspecto turgente similar al Control. Histológicamente se observó una arquitectura renal normal para ambos grupos experimentales (Fig. 55.4).





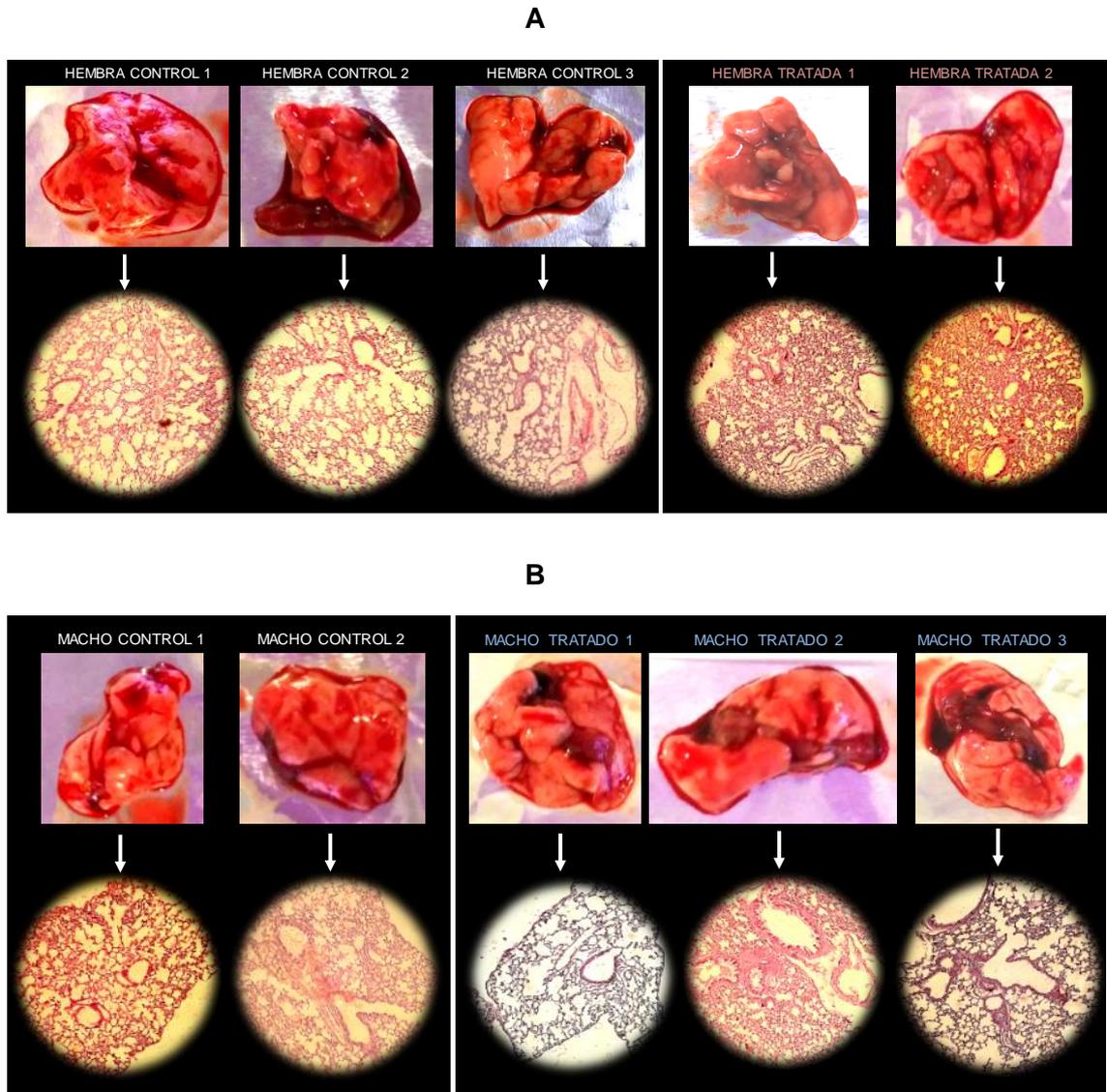
**Figura 55.4.** Efecto de dosis repetidas *Maitake* en el aspecto renal. **A)** Aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de riñones de hembras BALB/c. **B)** Aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de riñones de machos BALB/c. El estudio microscópico incluyó el registro de microfotografías de corte transversal de tejido renal incluido en parafina y teñido con H-E x100. En círculo punteado azul se indica la turgencia del órgano.

**IV) Bazo.** No se observó diferencias evidentes de aspecto y coloración a nivel macroscópico en el bazo de ambos grupos experimentales (Fig. 56.4).



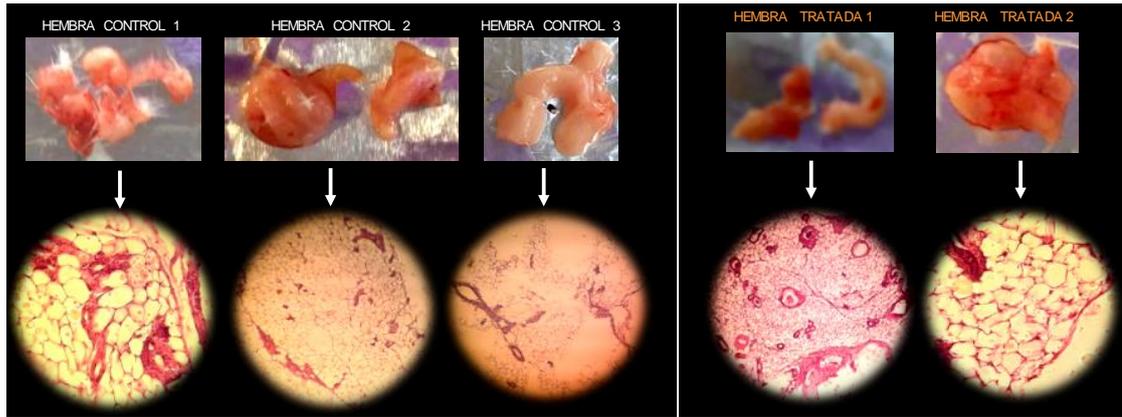
**Figura 56.4.** Efecto de dosis repetidas *Maitake* en el aspecto macroscópico esplénico. El tejido fue removido durante la autopsia de los animales, tras finalizar el tratamiento. En la parte superior, en rosado, se indica el órgano de hembras BALB/c y en la inferior, en celeste, el de machos BALB/c.

**V) Pulmones.** No se observaron diferencias de aspecto y coloración en los pulmones de ambos grupos experimentales. Histológicamente los animales Tratados presentaron estructura pulmonar normal, similar a la Del grupo Control (Fig. 57.4).



**Figura 57.4.** Efecto de dosis repetidas *Maitake* en el aspecto pulmonar. **A)** Aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de pulmones de hembras BALB/c. **B)** Aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de pulmones de machos BALB/c. El estudio microscópico incluyó el registro de microfotografías de corte transversal de tejido renal incluido en parafina y teñido con H-E x100.

**VI) Glándula mamaria.** No se observaron diferencias de aspecto y coloración en glándula mamaria abdominal de hembras BALB/c de ambos grupos experimentales. Histológicamente, la arquitectura mamaria se observó normal para todos los grupos experimentales, sin alteraciones estructurales evidentes (Fig. 58.4).



**Figura 58.4.** Efecto de dosis repetidas Maitake en el aspecto mamario. Se indican fotografías correspondientes al aspecto macroscópico (parte superior) y microscópico (inferior) de glándulas mamarias de ratones hembras BALB/c. El estudio microscópico incluyó el registro de microfotografías de corte transversal de tejido renal incluido en parafina y teñido con H-E x100.

**VII) Intestino delgado + grueso.** No se observaron diferencias de aspecto y coloración en el intestino murino de ambos grupos experimentales (Fig. 59.4).



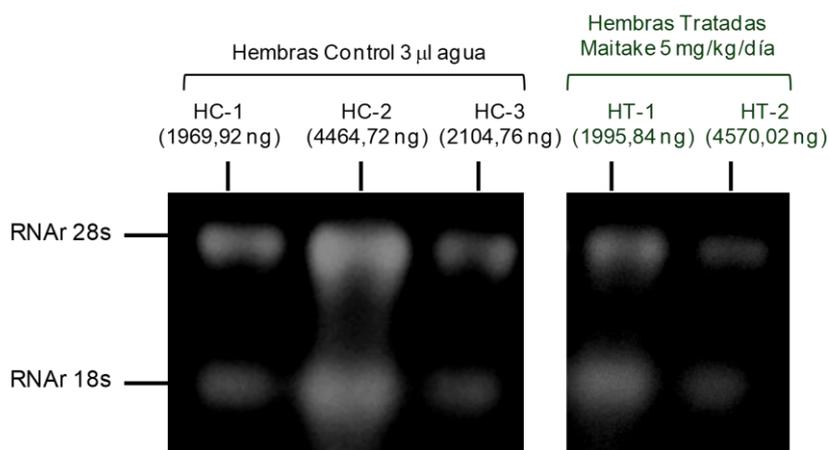
**Figura 59.4.** Efecto de dosis repetidas Maitake en el aspecto macroscópico intestinal. El tejido fue removido durante la autopsia de los animales, tras finalizar el tratamiento. En la parte superior, en rosado, se indica el intestino de hembras BALB/c y en la inferior, en celeste, el de machos BALB/c.

**Expresión de genes específicos.** Se investigó el efecto de dosis repetidas de Maitake PRO4X (5 mg/kg/día) en la expresión de genes específicos de tejido glandular mamario abdominal de ratones hembra BALB/c. Se escogieron los genes ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC, cuya expresión resultó modulada por Maitake en estudios previos de nuestro grupo [200].

Inicialmente se determinó por espectrofotometría y absorbancia a 260 nm la concentración, pureza e integridad del RNAr 28s y 18s aislado de tejido mamario abdominal. Los resultados se consignaron en la Tabla 25.4 y la Fig. 60.4.

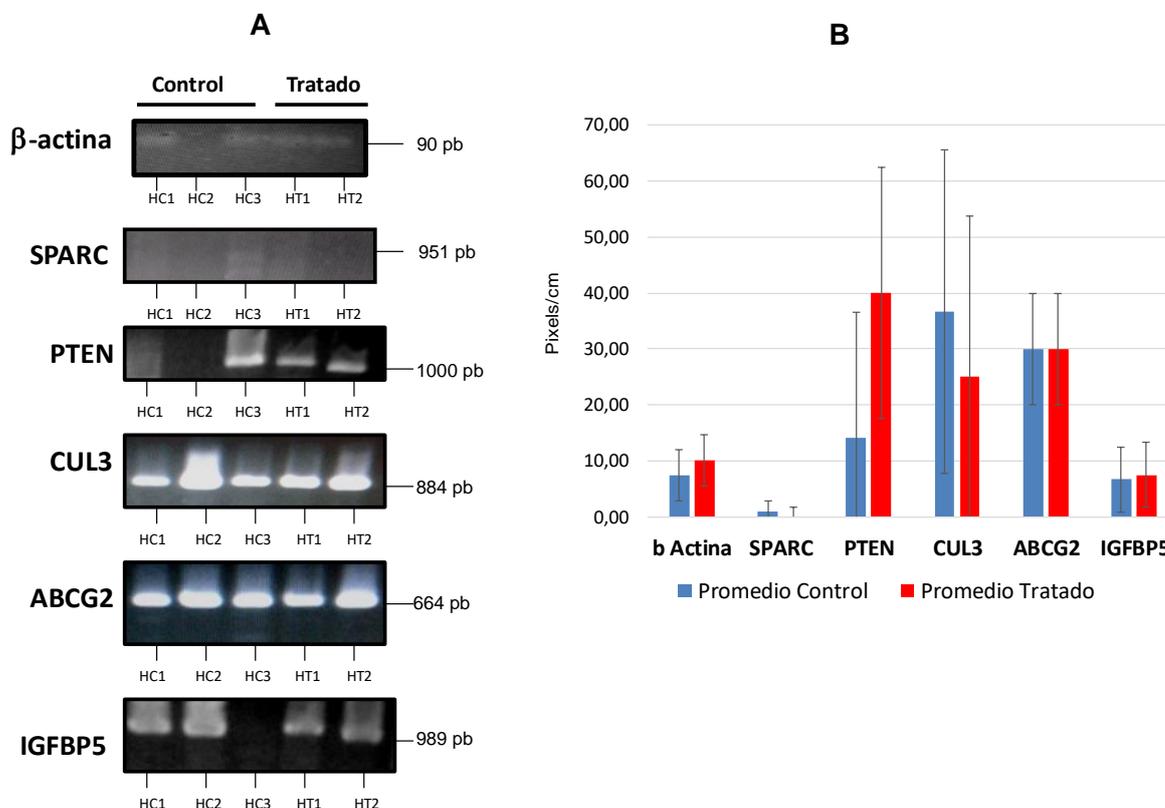
**Tabla 25.4.** *Concentración, pureza e integridad de RNAr.* El mismo fue aislado de tejido mamario abdominal de hembras BALB/c tratadas por cuatro semanas con Maitake PRO4X. Los valores indicados se obtuvieron por espectrofotometría con absorbancia a 260 nm.

CUANTIFICACION DE RNAr EN TEJIDO MAMARIO ABDOMINAL DE RATONES HEMBRAS BALBc								
GRUPO EXPERIMENTAL	HEMBRA	Dilucion	Abs260 nm	Ratio	% PUREZA	ng RNA/ $\mu$ l	ng RNA en 9 $\mu$ l	ng RNA puros en 9 $\mu$ l
CONTROL 3 $\mu$ l de agua	1	1/100	0,072	1,529	76	288	2592	1969,92
	2	1/100	0,159	1,573	78	636	5724	4464,72
	3	1/100	0,079	1,482	74	316	2844	2104,56
TRATADO MAITAKE 5 mg/kg/día	1	1/100	0,077	1,440	72	308	2772	1995,84
	2	1/100	0,215	1,280	63	806	7254	4570,02



**Figura 60.4.** *Bandas 28S y 18S de RNA.* Las mismas se visualizaron en gel de agarosa desnaturalizante al 3%. El RNA corresponde a tejido mamario abdominal de hembras BALB/c tratadas por cuatro semanas con Maitake PRO4X 5 mg/kg/día. Entre paréntesis se indican los ng de RNA puro sembrados en el gel.

Posteriormente, se utilizó 1  $\mu$ g del RNA total purificado y cuantificado para amplificar, mediante reacciones de RT-PCR, la expresión de los genes ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC. Como CONTROL se consideró la expresión génica de  $\beta$ -actina. Los resultados obtenidos se indican en la Fig. 61.4.



**Figura 61.4.** Efecto de dosis repetida de Maitake en la expresión génica. Se seleccionaron genes específicos de tejido mamario abdominal de hembras BALB/c. **A)** Bandas correspondientes a los genes SPARC, PTEN, CUL3, IGFBP5 y ABCG2 amplificados y visualizados en gel de agarosa al 3% para ambas condiciones experimentales. Como Control se consideró la expresión de la  $\beta$ -actina. **B)** Grafico de semicuantificación de intensidad de bandas amplificadas por RT-PCR de la Figura A.

Los resultados de la Fig. 61.4 respecto del tratamiento subagudo a dosis repetida de Maitake PRO4X no demostraron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes analizados en comparación con el grupo Control. Los genes CUL3, ABCG2 e IGFBP5 se expresaron por igual tanto en tejidos mamaros del grupo Control como de los Tratados con Maitake. Por su parte, PTEN tendió a aumentar su expresión en tejidos Tratados, aunque sin significancia estadística. Mientras que SPARC presentó una muy débil expresión en ambas condiciones experimentales. Cabe señalar que los tejidos mamaros analizados en esta sección fueron normales y libres de tumor ya que pertenecían a animales sanos sin inducción tumoral.

### IV.3.3 Ensayo en humanos

Se investigó el efecto de dosis repetidas de Maitake PRO4X sobre parámetros bioquímicos y hematológicos de sangre entera humana. Para ello, dos voluntarios sanos ingirieron por vía oral una dosis terapéutica de 300 mg/día del extracto glicoproteico durante 15 días (equivalente a la administración de 5 mg/kg/día en un individuo de 70 kg). Se tomaron muestras de sangre y orina antes de iniciar la administración del extracto glicoproteico, y al finalizar el tratamiento. Los resultados obtenidos se consignan en la Tabla 26.4.

**Tabla 26.4.** *Parámetros hematológicos y bioquímicos.* Los mismos corresponden a sangre entera de voluntarios humanos sanos antes y después del tratamiento por dos semanas con 300 mg/día de Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

	CONTROL	MAITAKE 300 mg/día	Valor p
Recuento hematíes (mm <sup>3</sup> )	$4,96 \times 10^6 \pm 4,31 \times 10^5$	$4,85 \times 10^6 \pm 5,23 \times 10^5$	ns
Hematocrito %	$44,15 \pm 2,33$	$43,25 \pm 4,45$	ns
Hemoglobina (g/dl)	$14,75 \pm 0,78$	$14,55 \pm 1,34$	ns
Volumen Corpuscular Medio (fl)	$88,20 \pm 1,56$	$88,35 \pm 1,77$	ns
Hemoglobina Corpuscular Media (pg)	$29,75 \pm 1,06$	$29,95 \pm 0,49$	ns
RDW % (ancho de distrib de GR)	$12,05 \pm 0,64$	$12,85 \pm 0,64$	ns
Recuento leucocitos (mm <sup>3</sup> )	$6,40 \times 10^3 \pm 4,24 \times 10^2$	$6,70 \times 10^3 \pm 2,82 \times 10^2$	ns
% Neutrofilos	$61,50 \pm 0,71$	$62,00 \pm 8,49$	ns
% Eosinofilos	$2,00 \pm 0,00$	$2,50 \pm 0,71$	ns
% Basofilos	$0,50 \pm 0,71$	$1,00 \pm 0,00$	ns
% Linfocitos	$30,50 \pm 0,71$	$29,00 \pm 5,66$	ns
% Monocitos	$5,50 \pm 0,71$	$5,50 \pm 2,12$	ns
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	$2,10 \times 10^5 \pm 1,10 \times 10^4$	$2,07 \times 10^5 \pm 3,39 \times 10^4$	ns
TGO (Aspartato aminotransferasa) U/l	$26,00 \pm 5,66$	$22,50 \pm 10,61$	ns
TGP (Alanina aminotransferasa) U/l	$33,50 \pm 19,09$	$28,00 \pm 25,46$	ns
FAL (Fosfatasa alcalina) U/l	$183,00 \pm 8,49$	$178,00 \pm 12,73$	ns
Billirrubina directa (mg/dl)	$0,10 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	ns
Billirrubina indirecta (mg/dl)	$0,59 \pm 0,00$	$0,59 \pm 0,00$	ns
Billirrubina total (mg/dl)	$0,69 \pm 0,00$	$0,70 \pm 0,00$	ns
Clearence de Creatinina (ml/min)	$88,60 \pm 46,10$	$89,45 \pm 53,81$	ns
Diuresis (ml/24 h)	$1,28 \times 10^3 \pm 1,06 \times 10^2$	$1,31 \times 10^3 \pm 1,20 \times 10^2$	ns

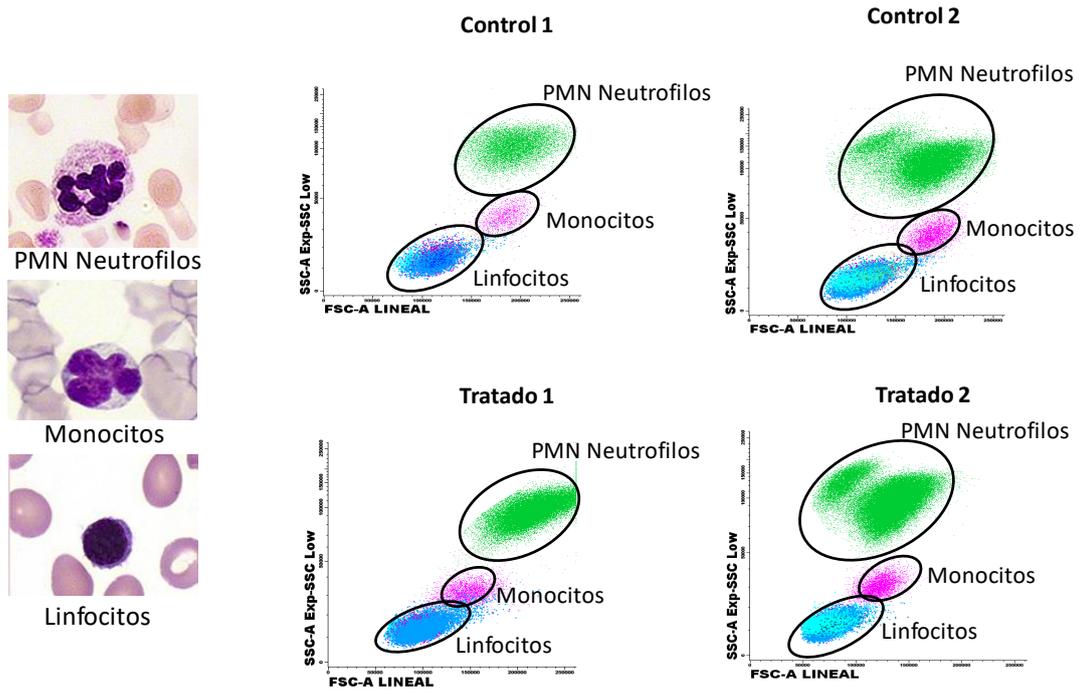
Los resultados hematológicos y bioquímicos consignados en la Tabla 26.4, demostraron que la ingesta diaria de Maitake PRO4X 300 mg/día no indujo cambios significativos en ninguno de los parámetros hematológicos y bioquímicos (con  $p > 0,05$ ).

Se observó tendencia a la reducción eritrocitaria ( $\text{mm}^3$ ), % hematocrito, hemoglobina (g/dl), % linfocitos, número de plaquetas ( $\text{mm}^3$ ), TGO (U/l), TGO (U/l) y FAL (U/l) sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ). Mientras que hubo tendencia al incremento del volumen corpuscular medio (fl), hemoglobina corpuscular media (pg), % RDW, número de leucocitos ( $\text{mm}^3$ ), % neutrófilos, % eosinófilos, % basófilos, bilirrubina directa y total (mg/dl), clearance de creatinina (ml/min) y diuresis (ml/24 h) sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

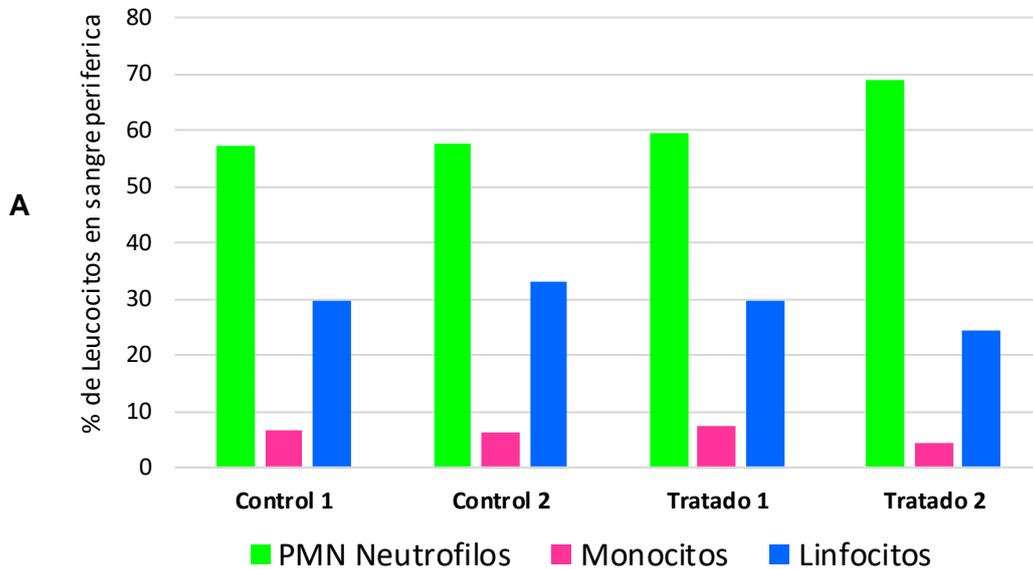
Los resultados de citometría de flujo en poblaciones linfocitarias (GPMN, MONOCITOS, LB, LT CD4+, LT CD8+ y NK) al finalizar el ensayo, se indican en la Tabla 27.4 y las Fig. 62.4 a 67.4.

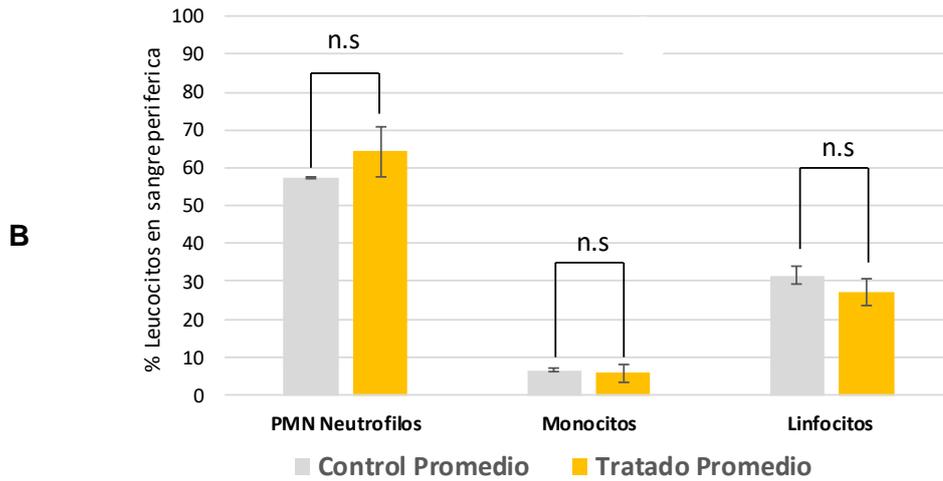
**Tabla 27.4. Poblaciones linfocitarias.** Se indican los % de las distintas poblaciones linfocitarias en sangre periférica humana al finalizar el ensayo con 300 mg/día de Maitake PRO4X. Los resultados obtenidos por citometría de flujo, correspondientes a la media  $\pm$  2 desvíos estándar, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

	CONTROL	MAITAKE 300 mg/día	Valor p
Granulocitos polimorfonucleares %	57,10 $\pm$ 0,35	64,25 $\pm$ 6,58	ns
Monocitos %	6,80 $\pm$ 0,49	5,85 $\pm$ 2,33	ns
Linfocitos T %	29,80 $\pm$ 2,33	27,10 $\pm$ 3,68	ns
Linfocitos T CD4 %	15,20 $\pm$ 3,25	15,70 $\pm$ 2,55	ns
Linfocitos T CD8 %	11,60 $\pm$ 0,57	8,95 $\pm$ 4,31	ns
Linfocitos B %	5,90 $\pm$ 2,40	2,65 $\pm$ 0,49	ns
Celulas Natural Killer %	0,10 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,07	ns

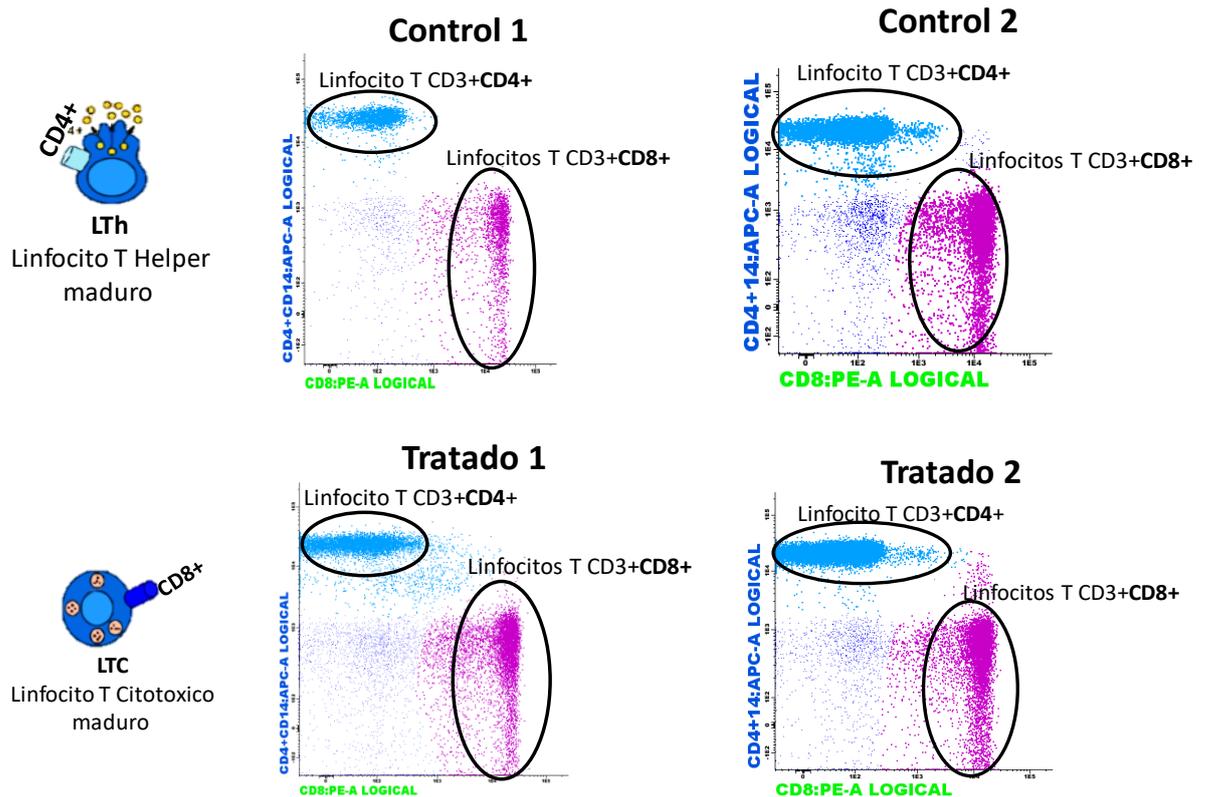


**Figura 62.4.** Citometría del flujo de poblaciones linfocitarias. Las muestras corresponden a voluntarios humanos sanos antes y después del tratamiento con Maitake PRO4X. Los resultados obtenidos por citometría de flujo se indicaron como media  $\pm$  2 desvíos estándar.

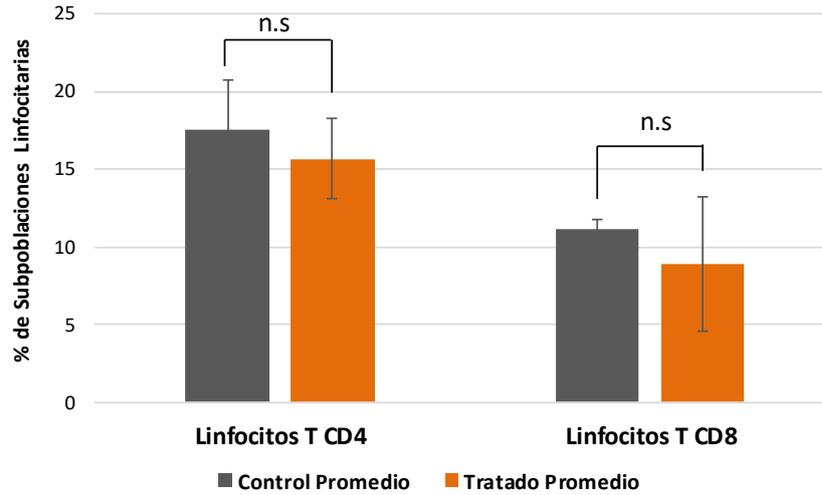




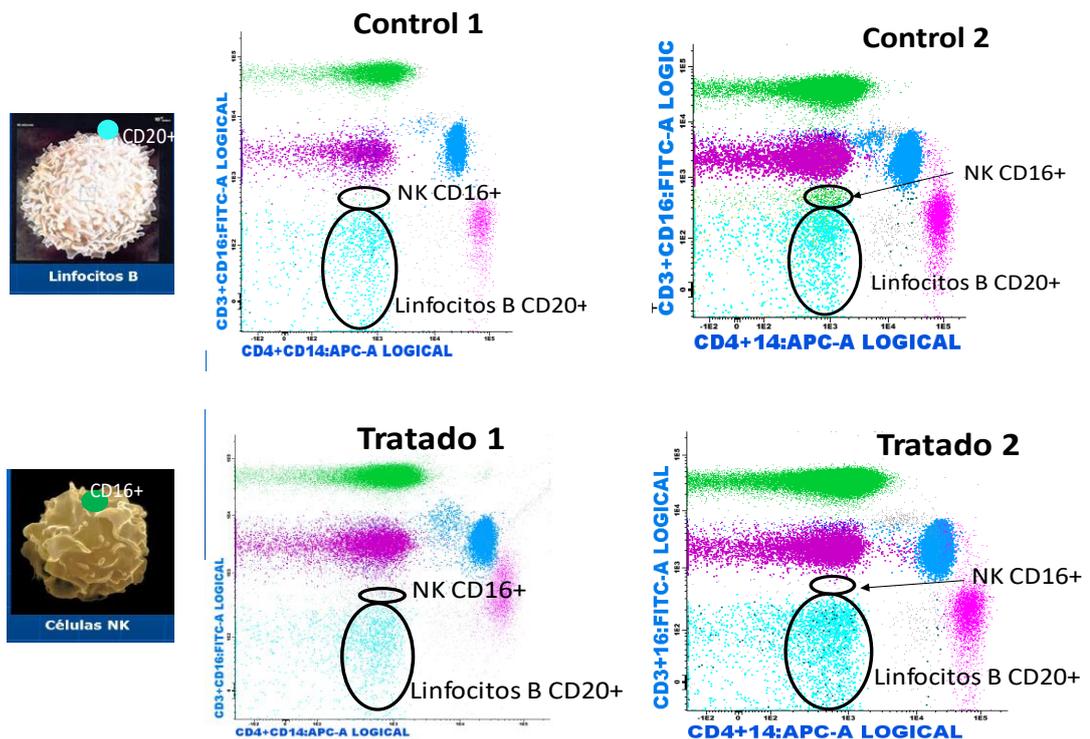
**Figura 63.4.** Efecto de Maitake en poblaciones linfocitarias. Las muestras corresponden a voluntarios humanos sanos, y los resultados fueron obtenidos por citometría de flujo. **A)** % de poblaciones leucocitarias cuantificadas por citometria de flujo en ambos grupos experimentales. **B)** % de poblaciones leucocitarias con valores medios  $\pm$  2 desvíos estándar cuantificados por Citometria de Flujo para ambos grupos experimentales.



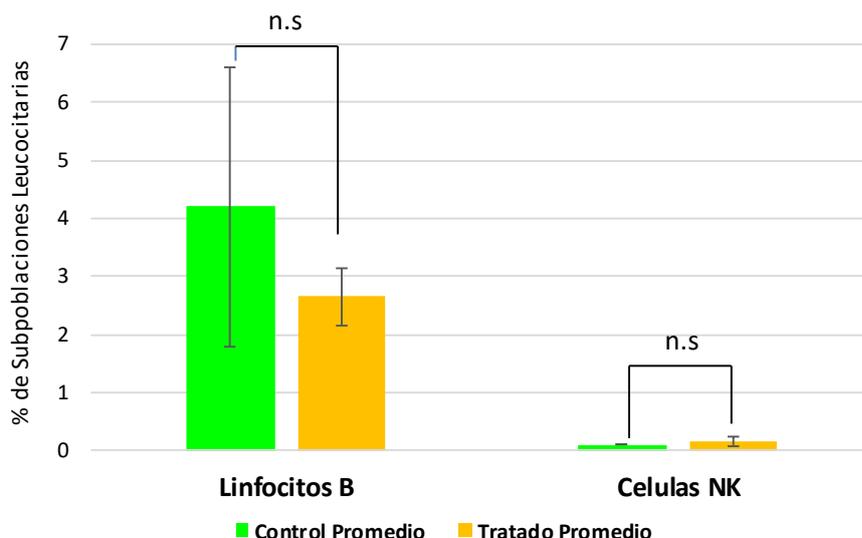
**Figura 64.4** Citometría del flujo de subpoblaciones linfocitarias T. Las muestras corresponden a voluntarios humanos sanos antes y después del tratamiento con Maitake PRO4X. Los resultados obtenidos por citometría de flujo, corresponden a la marcación de subpoblaciones Linfocitarias: T Helper (CD3+CD4+CD8-) y Linfocitos T Citotóxicos (CD3+CD4-CD8+) de ambos grupos experimentales.



**Figura 65.4.** Efecto de Maitake en subpoblaciones linfocitarias T. Las muestras sanguíneas corresponden a voluntarios humanos sanos, y los resultados obtenidos por citometría fueron marcados para las subpoblaciones de linfocitos T Helper (CD3+CD4+CD8-) y T Citotóxicos (CD3+CD4-CD8+). Se consignan los valores medios ± D.S en ambos grupos experimentales



**Figura 66.4.** Citometría del flujo de NK y LB. Las muestras corresponden a voluntarios humanos sanos antes y después del tratamiento con Maitake PRO4X. Los resultados obtenidos por citometría de flujo, corresponden a la marcación de subpoblaciones de Linfocitos B (CD3+CD4+CD20+) y células Natural Killer (CD3+CD4-CD16+) en ambos grupos experimentales.



**Figura 67.4.** Efecto de Maitake en subpoblaciones leucocitarias. Las muestras sanguíneas corresponden a voluntarios humanos sanos, y los resultados obtenidos por citometría fueron marcados para las subpoblaciones de Linfocitos B (CD3+CD4+CD20+) y Natural Killer (CD3+CD4-CD16+). Se indican los valores medios  $\pm$  D.S de los grupos Control y Tratado con Maitake PRO4X, no hallándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambos.

Los resultados de citometría de flujo correspondientes al análisis de las poblaciones linfocitarias consignados en la Tabla 27.4 y las Fig. 62.4 a 67.4 demostraron que el tratamiento diario con Maitake no indujo cambios significativos en el porcentaje de poblaciones linfocitarias de sangre periférica de voluntarios sanos, sin modificaciones en los niveles de PMN Neutrófilos, monocitos o linfocitos (Fig. 62.4 y 63.4). Por otro lado, estos resultados revelaron que Maitake PRO4X tampoco indujo cambios significativos en las subpoblaciones linfocitarias T helper (Th) y T Citotóxicos (Tc) de sangre periférica de individuos sanos (Fig. 64.4 y 65.4). El análisis citométrico reveló que Maitake PRO4X no fue capaz de modificar el nivel de Linfocitos B (LB) ni de células Natural Killer (NK) en muestras sanguíneas de individuos sanos ( $p > 0,05$ ), tal como ilustran los resultados gráficos de la Fig. 66.4 y 67.4. No obstante, se observó una tendencia a disminuir el porcentaje de monocitos, linfocitos, linfocitos Tc CD8+, linfocitos B, aunque sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, se registró tendencia al aumento de granulocitos polimorfonucleares, linfocitos Th CD4+ y células Natural Killer, aunque sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

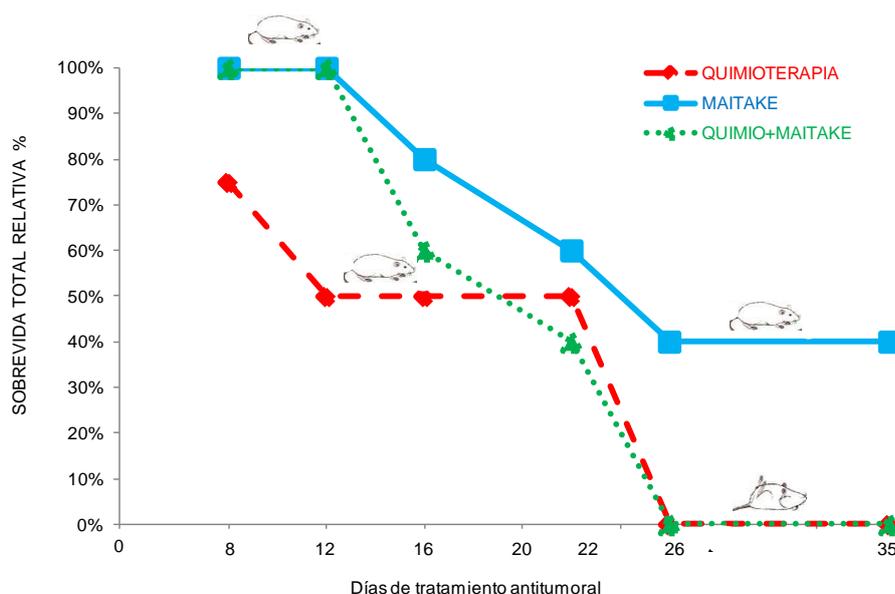
#### IV.3.4 Efectos antitumorales de Maitake y quimioterapia

Los efectos antitumorales de Maitake y quimioterapia convencional (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) se investigaron en ratones hembras BALB/c con tumores mamarios. Para ello, 14 ratones BALB/c con tumores mamarios en desarrollo, se dividieron en tres grupos experimentales: Tratado con Maitake PRO4X (5 mg/kg/día) (n=5), grupo Tratado con Quimioterapia (Ciclofosfamida 80 mg/kg/semana + Doxorrubicina 4 mg/kg/semana) (n=4) y grupo Tratado con Maitake PRO4X + Quimioterapia (n=5). El día 1 del ensayo, se les indujo tumorigénesis mamaria con células tumorales murinas LM3. El día 24 comenzó el tratamiento terapéutico de cada grupo mediante administración oral, el cual tuvo una duración de 5 semanas, al cabo de las cuales se determinó desarrollo tumoral, sobrevida y mortalidad hasta el fin del ensayo (día 58, sacrificio).

**Sobrevida de los animales.** Para establecer si los tratamientos podían mejorar sobrevida relativa de los animales con tumor, se analizó el número de animales sobrevivientes de cada una de las condiciones experimentales. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 28.4 y la Fig. 68.4. En ellos se observó que hasta el día 12 de tratamiento, la sobrevida fue del 100 % en los grupos Maitake PRO4X y Quimioterapia + Maitake, mientras que el grupo Quimioterapia presentó una sobrevida del 50%. Entre los días 16 y 22, la sobrevida cayó al 60% para el grupo Maitake PRO4X, y 40% para el grupo Quimioterapia + Maitake, mientras que el grupo Quimioterapia permaneció constante. Cabe destacar que el grupo Maitake PRO4X presentó una reducción más gradual de la sobrevida. Para el día 26 de tratamiento, la sobrevida fue de 40 % en el grupo Maitake PRO4X -porcentaje que se mantuvo invariable hasta el fin del ensayo-, y de 0% en los grupos restantes.

**Tabla 28.4.** *Sobrevida relativa.* Se indica el número de animales sobrevivientes de cada condición experimental en los distintos períodos de tratamiento. Las condiciones analizadas fueron Maitake PRO4X (5 mg/kg/día) (n=5), Quimioterapia (Ciclofosfamida 80 mg/kg/semana + Doxorrubicina 4 mg/kg/semana) (n=4) y Tratado con Maitake PRO4X + Quimioterapia (n=5).

SOBREVIDA RELATIVA	QUIMIOTERAPIA (Ciclof 80 mg/kg/sem + Doxo 4 mg/kg/sem)		MAITAKE PRO4X 5 mg/kg/día		MAITAKE + QUIMIO (Ciclofosfamida + Doxorrubicina)	
	Fracción	Porcentaje	Fracción	Porcentaje	Fracción	Porcentaje
Día 8	3/4	75%	5/5	100%	5/5	100%
Día 12	2/4	50%	5/5	100%	5/5	100%
Día 16	2/4	50%	4/5	80%	3/5	60%
Día 22	2/4	50%	3/5	60%	2/5	40%
Día 26	0/4	0%	2/5	40%	0/5	0%
Día 35	0/4	0%	2/5	40%	0/5	0%

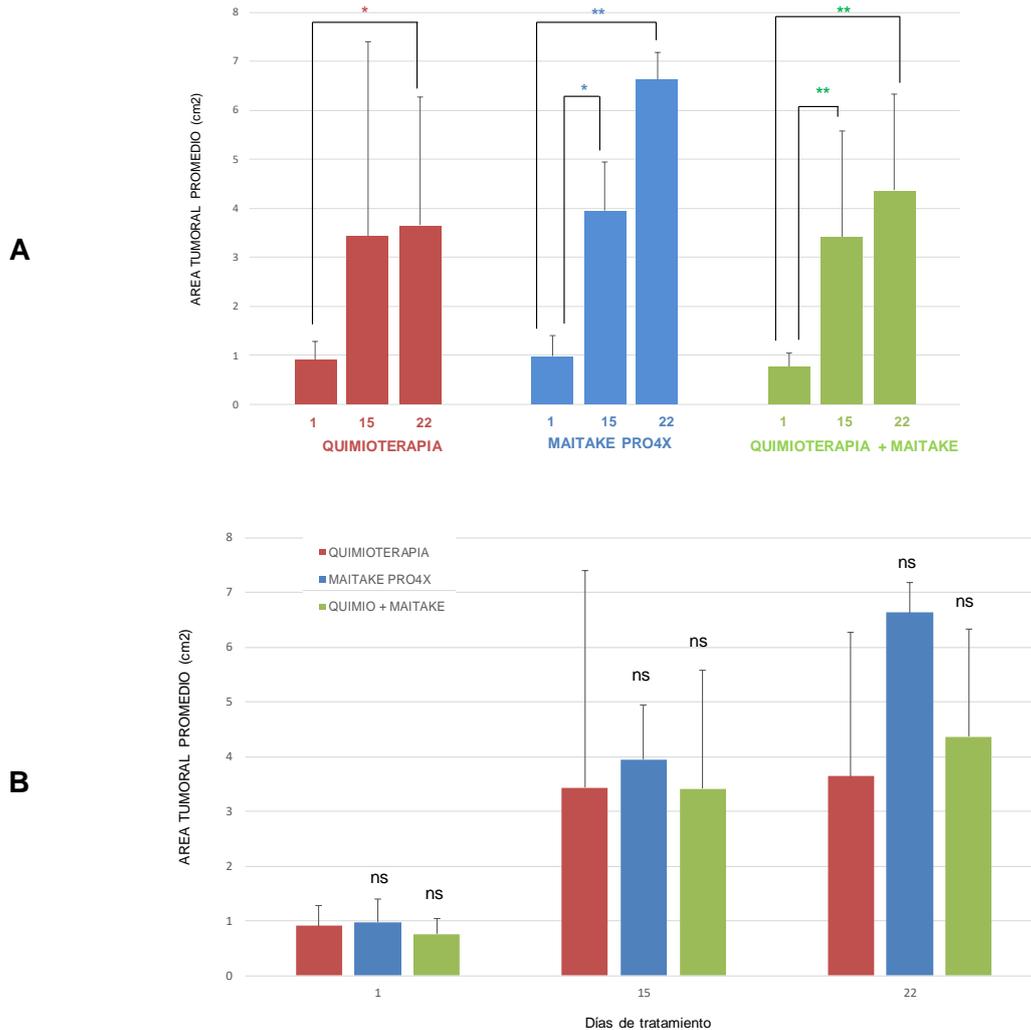


**Figura 68.4.** Efecto de Maitake y Quimioterapia en la supervivencia relativa. Los animales con inducción tumoral fueron tratados durante 5 semanas con Maitake PRO4X (5mg/kg/día) y Quimioterapia (Doxorubicina 80 mg/kg/semana + Ciclofosfamida 4 mg/kg/semana). El desarrollo tumoral se realizó por inyección intraperitoneal de células tumorales murinas de la línea LM3.

**Crecimiento tumoral.** El área tumoral de los animales a los días 1, 15 y 22 de tratamiento se indica en la Tabla 29.4 y Fig. 69.4. Los resultados allí consignados demostraron que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de crecimiento tumoral entre los distintos grupos experimentales a los días de tratamiento 1, 15 y 22. No obstante, se observó crecimiento tumoral significativo respecto del día 1 para cada uno de los grupos experimentales (Fig. 69.4-B).

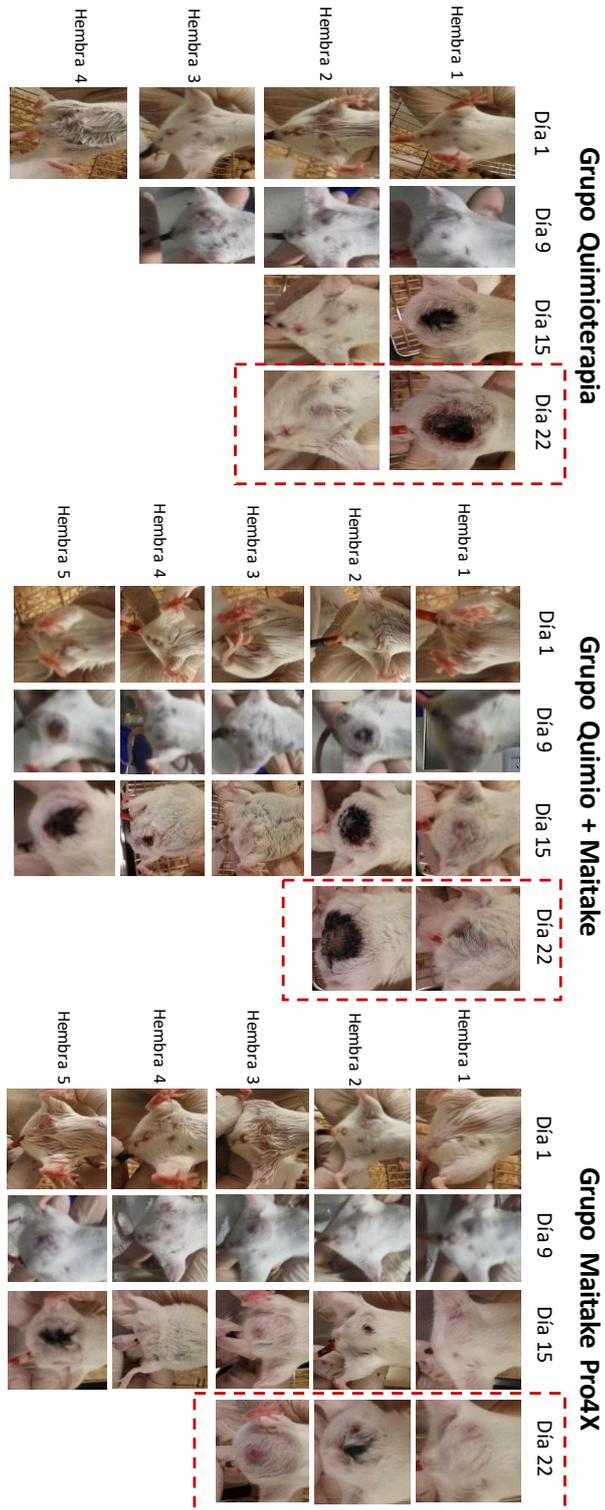
**Tabla 29.4.** Crecimiento tumoral. Se indica en  $\text{cm}^2$  el área tumoral de los animales de las distintas condiciones experimentales en diferentes períodos de tratamiento. Los animales fueron tratados durante 5 semanas con Maitake, Quimioterapia y Quimioterapia + Maitake. Se observaron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y muy significativas ( $**p < 0,01$ ) en el área tumoral de las distintas condiciones experimentales.

AREA TUMORAL ( $\text{cm}^2$ ) $\pm$ DS			
Tratamiento terapéutico	QUIMIOTERAPIA (Ciclof 80 mg/kg/sem + Doxo 4 mg/kg/sem)	MAITAKE PRO4X 5 mg/kg/día	MAITAKE + QUIMIO (Ciclofosfamida + Doxorubicina)
día 1	0,91 $\pm$ 0,37	0,77 $\pm$ 0,27	0,98 $\pm$ 0,43
día 15	3,44 $\pm$ 3,96	3,42 $\pm$ 2,15 (* vs día 1)	3,95 $\pm$ 1,00 (** vs día 1)
día 22	3,65 $\pm$ 2,62 (* vs día 1)	4,37 $\pm$ 1,96 (** vs día 1)	6,63 $\pm$ 0,55 (** vs día 1)



**Figura 69.4.** Efecto del tratamiento terapéutico en el crecimiento tumoral. El área del tumor mamario se expresó en cm<sup>2</sup>. Los animales fueron tratados con Maitake PRO4X y Quimioterapia durante 5 semanas a partir de la inducción tumoral de ratones BALB/c. **A)** No se observaron diferencias significativas de crecimiento tumoral entre las distintas condiciones experimentales (ns,  $p > 0,05$ ). **B)** Se observaron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y muy significativas ( $**p < 0,01$ ) de crecimiento tumoral respecto del día 1 de tratamiento para cada condición experimental.

**Análisis tumoral macroscópico.** El aspecto macroscópico *in situ* de tumores mamarios abdominales de hembras BALB/c a los días de tratamiento 1, 9, 15 y 22 con Maitake PRO4X y Quimioterapia convencional (Ciclofosfamida + Doxorrubicina), se indican en la Fig. 70.4 y la Fig. 71.4. Los resultados obtenidos sugieren que los tumores de los animales Tratados diariamente con Maitake PRO4X resultaron menos agresivos y ulcerantes que los de los ratones Tratados con Quimioterapia y con Quimioterapia + Maitake. Asimismo, la Fig. 70.4 demuestra que el grupo Maitake exhibió necrosis y ulceraciones más tardíamente (a partir del día 15 de tratamiento) que los de animales de los grupos Quimioterapia y Quimioterapia + Maitake (que aparecieron el día 9 de tratamiento).



**Figura 70.4.** Efecto de Maitake y Quimioterapia en el aspecto macroscópico tumoral. Se consignan fotografías del crecimiento tumoral mamario situ de ratones hembras BALB/c. Los animales fueron tratados durante 5 semanas a partir de la inducción tumoral. En recuadro punteado rojo se destaca el tumor mamario *in situ* al día 22 de tratamiento terapéutico.

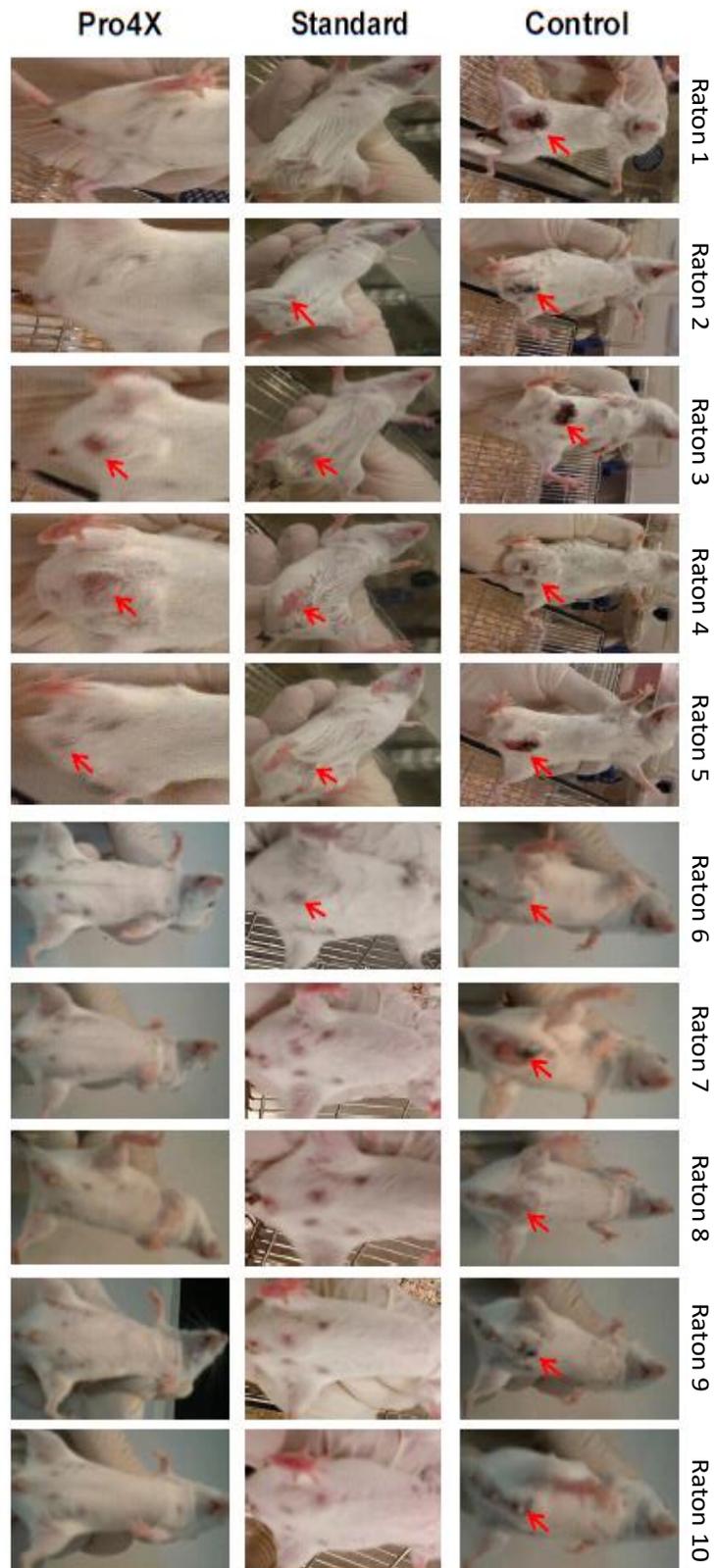


**Figura 71.4.** Efecto de Maitake y Quimioterapia en el aspecto tumoral al día 22 de tratamiento. Los animales fueron tratados durante 5 semanas a partir de la inducción tumoral con el extracto glicoproteico Maitake PRO4X, y quimioterapia convencional (Ciclofosfamida + Doxorrubicina).

#### IV.3.5 Prevención tumoral de Maitake

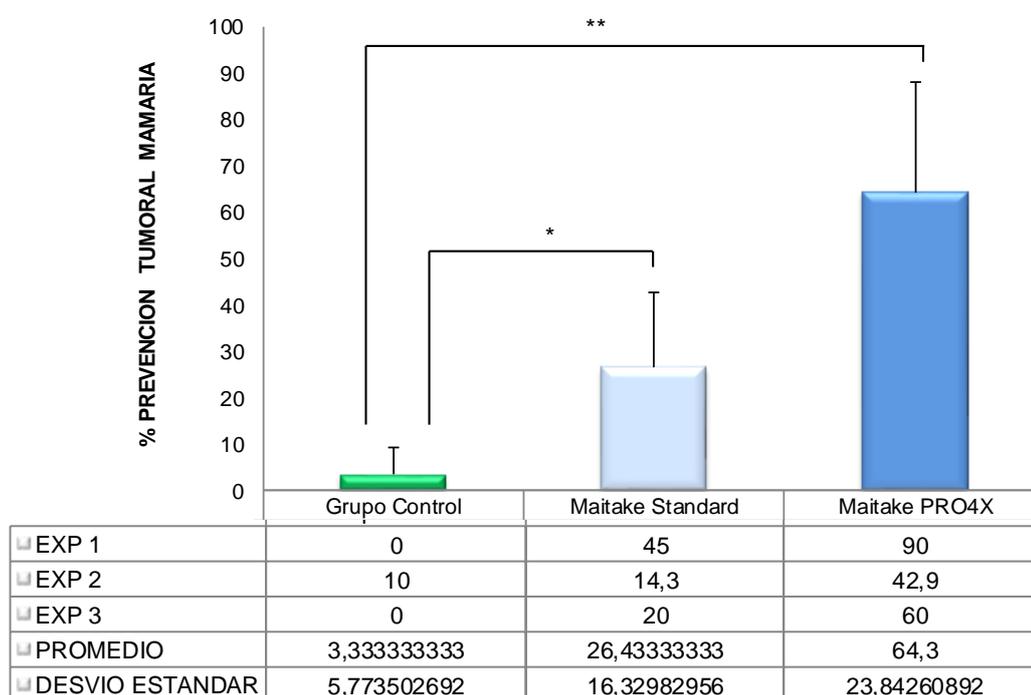
Los efectos preventivos tumorales del extracto glicoproteico de Maitake (versiones Standard y PRO4X), se estudiaron en ratones hembra BALB/c nulíparas, de 6 a 8 semanas de edad. Para ello, se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno de los cuales contó con 3 grupos de animales: Control (que recibió PBS, solución fisiológica), Tratado con Maitake Standard (5mg/kg/día) y Tratado con Maitake PRO4X (5mg/kg/día). La administración preventiva de Maitake se realizó intraperitonealmente durante 15 días. Posteriormente, se indujo tumorigenesis mamaria por inyección intraperitoneal de  $2 \times 10^5$  células tumorales mamarias murinas LM3. Los ratones fueron chequeados semanalmente por 30 días más para registrar desarrollo tumoral mamario (se consideró tumor al bulto con más de 10 mm de diámetro). Al finalizar el ensayo los animales fueron sacrificados.

**Desarrollo tumorigénico.** El desarrollo tumorigénico de cada grupo experimental, se indica en las fotografías de la region abdominal mamaria de hembras BALB/c de la Fig. 72.4.



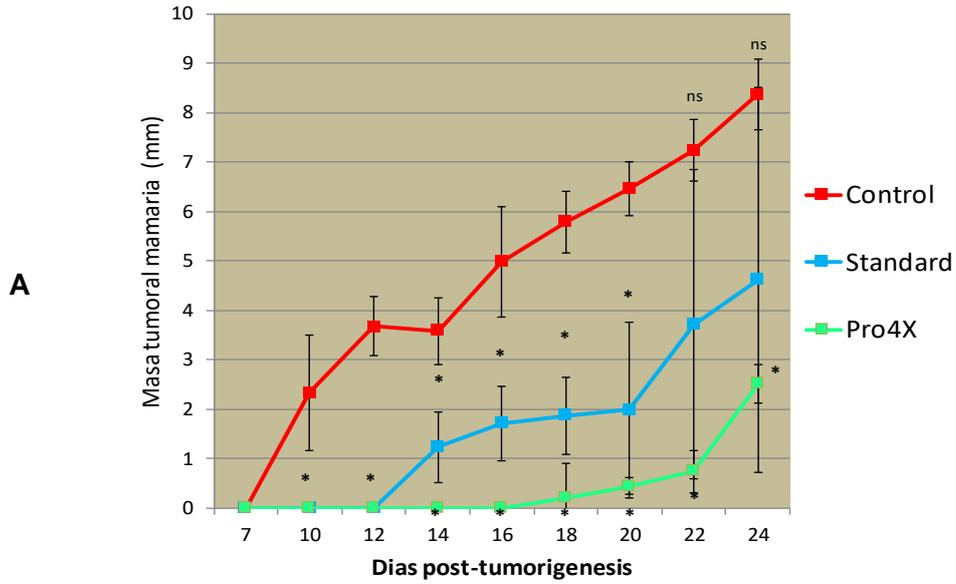
**Figura 72.4.** Crecimiento tumoral en hembras BALB/c. En flecha roja se indican animales con desarrollo tumoral. Se estudió el efecto preventivo antitumoral de Maitake Standard y Maitake PRO4X en hembras BALB/c. Los animales se trataron preventivamente durante 15 días con ambos extractos glicoproteicos para posteriormente inducirles tumorigénesis mamaria. Las fotografías detallan a la región abdominal mamaria de las hembras BALB/c.

El promedio de los 3 experimentos independientes demostró que ambos extractos glicoproteicos ejercen efectos de prevención tumoral mamaria en un  $64,286 \pm 23,862$  % (\*\* $p < 0,01$ ) para Maitake PRO4X, y  $26,429 \pm 16,335$  % (\* $p < 0,05$ ) para Maitake Standard (Fig. 73.4).

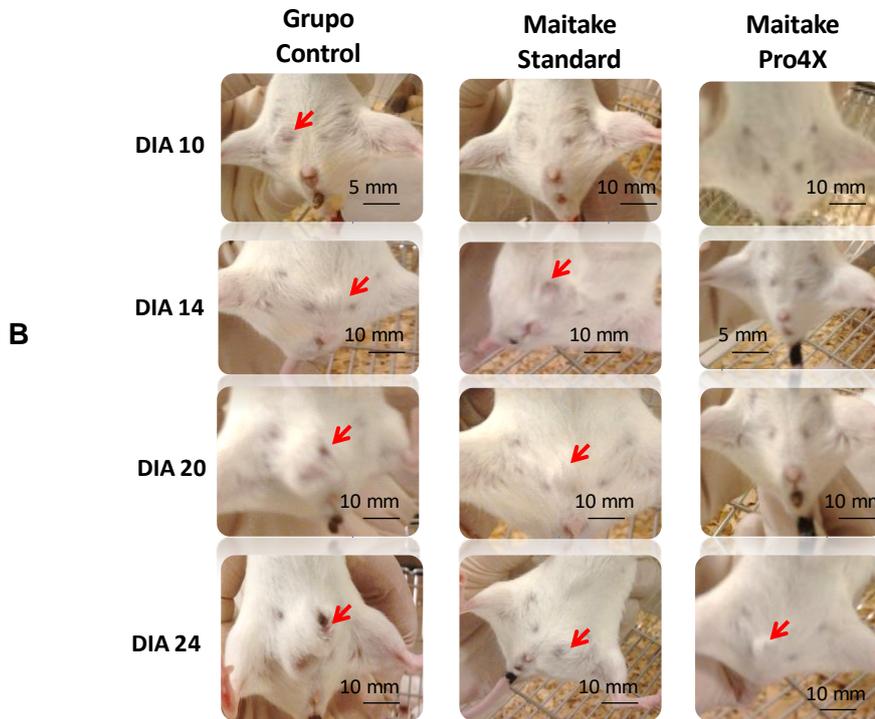


**Figura 73.4.** Prevención tumoral mamaria de Maitake. Se indican los porcentajes de prevención, los promedios y los desvíos estandar para ambas versiones comerciales (Standard y PRO4X) del extracto glicoproteico. Las mismas corresponden a tres experimentos independientes. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$ ) en la prevención de los grupos experimentales.

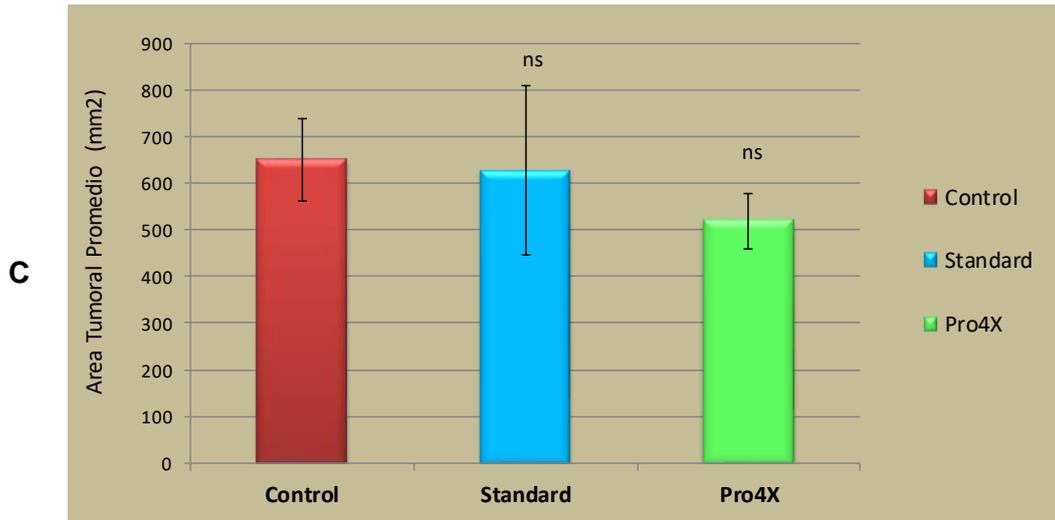
**Tamaño del tumor mamario.** Se analizó el tamaño y tipo de tumor mamario de aquellos animales que escaparon al tratamiento preventivo con Maitake (Fig 74.4 A, B, C y D).



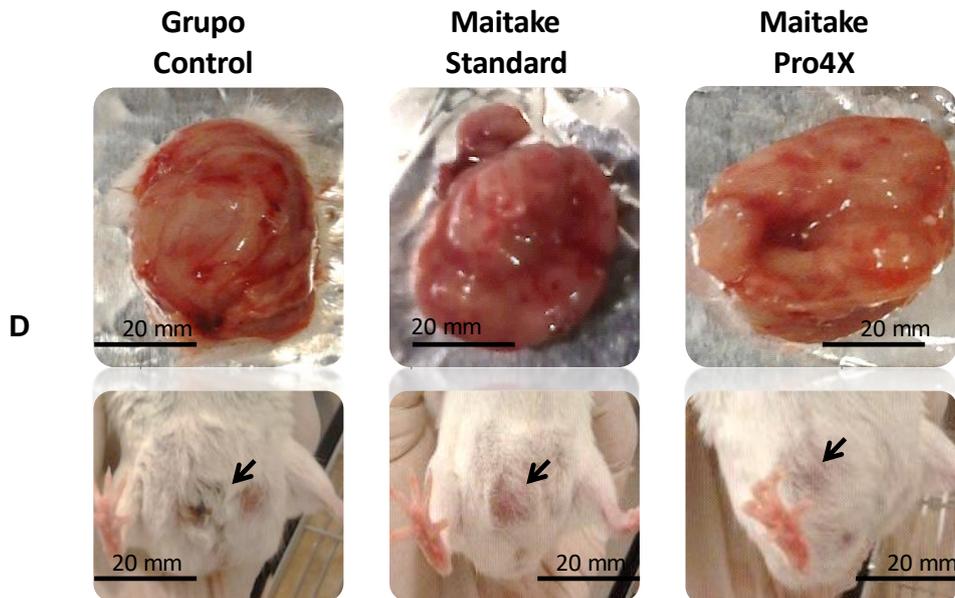
**Figura 74.4-A. Crecimiento tumoral mamario.** Se estudió el efecto de los extractos glicoproteicos Standard y PRO4X de Maitake en el crecimiento longitudinal tumoral (mm) de hembras BALB/c en función de los días transcurridos desde la inducción tumoral. Los tumores fueron removidos durante la autopsia de los animales (día 46 post tumorigénesis). Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) de crecimiento tumoral entre los tratamientos.



**Figura 74.4-B. Crecimiento tumoral mamario.** Las fotografías ilustran la evolución y el desarrollo tumoral *in vivo* y *in situ* a los días 10, 14, 20 y 24 post tumorigénesis en aquellas hembras BALB/c que escaparon al control preventivo con los extractos glicoproteicos Standard y PRO4X de Maitake.



**Figura 74.4-C. Tamaño tumoral mamario.** La figura ilustra el área promedio (mm<sup>2</sup>) de la masa tumoral *ex vivo* de hembras BALB/c tratadas con Maitake Standard y PRO4X al finalizar el ensayo. Los tumores fueron removidos durante la autopsia de los animales (día 46 post tumorigénesis). No se observaron diferencias significativas de área entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ).

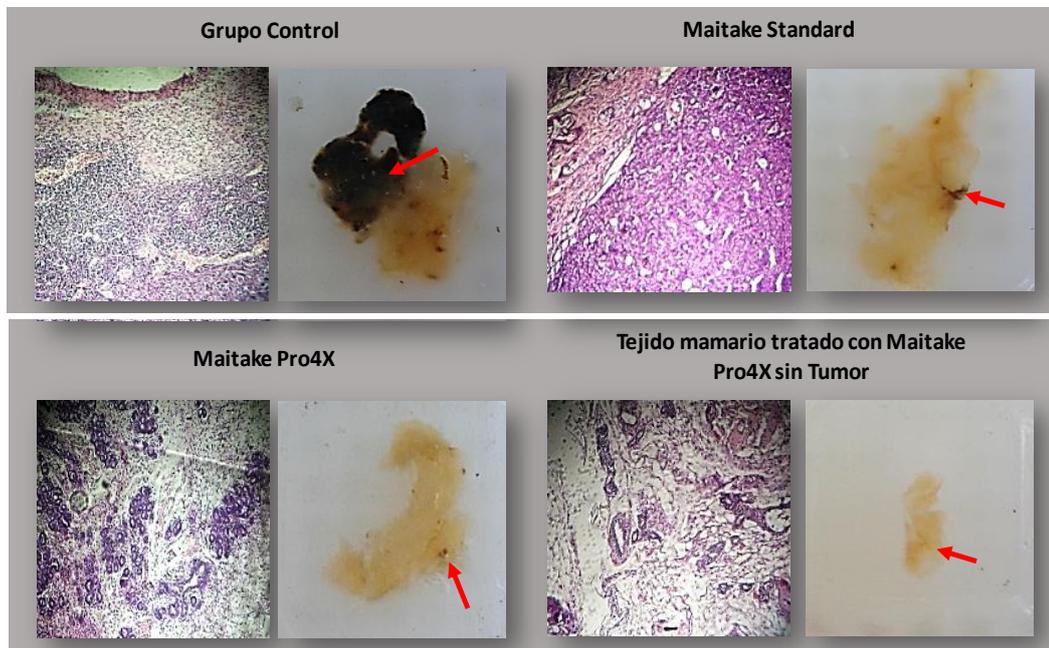


**Figura 74.4-D. Aspecto macroscópico tumoral.** Las fotografías ilustran el aspecto macroscópico tumoral *ex vivo* (parte superior) e *in vivo in situ* (parte inferior) de aquellas hembras BALB/c que escaparon al control preventivo con los extractos glicoproteicos Standard y PRO4X de Maitake. Las flechas negras indican la posición *in situ* del tumor mamario abdominal.

Los resultados de la fig. 74.4-A de crecimiento tumoral longitudinal (mm) en función del tiempo transcurrido post tumorigénesis (días 7 a 24), sugirieron crecimiento lineal para los tumores del grupo Control (días 10 a 24). Mientras que el grupo Tratado con Maitake PRO4X presentó el crecimiento tumoral más gradual de todos a igual período de tiempo (días 10 a 24), alcanzando el día 24 el mismo tamaño tumoral que los grupos Control y Standard. Por su parte, el grupo Maitake Standard, presentó hasta el día 20 un desarrollo tumoral diferente respecto del grupo Control, pero al día 22 alcanzó el mismo tamaño tumoral que el Control.

Los resultados de la Fig. 74.4-C, demostraron que al finalizar el ensayo (día 46 post-tumorigénesis), el área tumoral ( $\text{mm}^2$ ) no mostro diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, macroscópicamente observamos diferencias (Fig. 74.4-D): los tumores del grupo Control eran sólidos y de bordes irregulares, mientras que los de Maitake PRO4X estaban llenos de líquido en su interior, no eran sólidos y poseían bordes netos, bien definidos, aunque de tamaño similar al Control (Fig. 74.4-D). Por su parte, los tumores del grupo Maitake Standard presentaban aspecto similar al del Control.

**Histología tumoral.** El análisis histológico de los tumores mamarios de ratones que escaparon al control preventivo implicó la inclusión de tejido mamario en parafina. En la Fig. 75.4 se indican los tumores mamarios representativos de cada grupo experimental. La imagen inferior derecha corresponde a tejido mamario normal (libre de tumor).



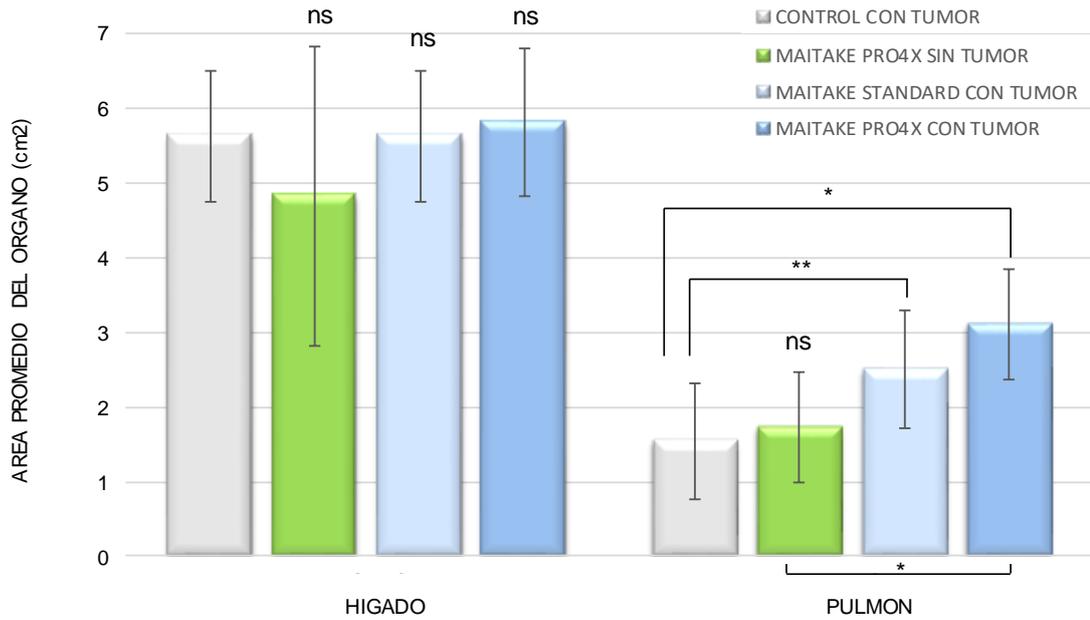
**Figura 75.4.** Observación macroscópica e histológica del tumor. Se consignan fotografías de tumores mamarios representativos de cada grupo experimental de ratones que escaparon al control preventivo (derecha) y microfotografías (X25) del mismo tejido (izquierda). Se incluye una imagen representativa del tejido mamario normal (libre de tumor) de ratones preventivamente Tratados con Maitake PRO4X (imagen inferior izquierda).

Los resultados obtenidos, indicaron que a nivel histológico los tumores mamarios del grupo Control se correspondieron con tejidos hiperplásicos y poco diferenciados, de bordes irregulares, compatibles con carcinomas ductales invasivos. A su vez, los tumores del grupo Maitake Standard presentaron características similares al Control. Mientras que los tumores del grupo Maitake PRO4X fueron histológicamente diferentes: bien diferenciados, no invasivos, de bordes netos y contornos definidos, con menor número de células (grado mitótico) respecto al Control, de apariencia encapsulada, semejantes a tumores benignos. Tales hallazgos sugieren que la existencia de metástasis hepática o pulmonar podría resultar diferente en los tres grupos experimentales.

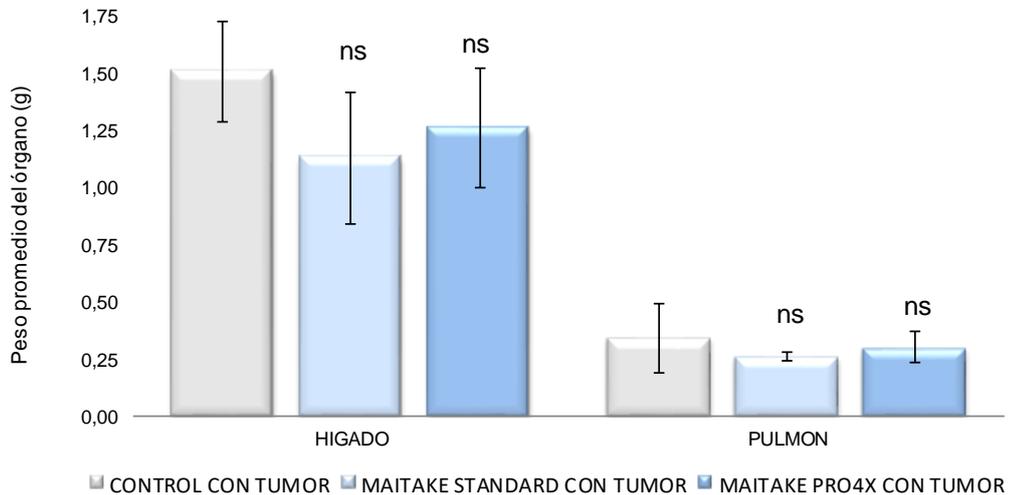
**Metástasis hepática y pulmonar.** La existencia de metástasis hepática y pulmonar se verificó a través de las dimensiones y pesos de hígado y pulmón respectivamente. Los resultados expresados en cm<sup>2</sup> y gramos se indican en la Tabla 30.4 y Fig. 76.4 a 77.4.

**Tabla 30.4.** *Tamaño hepático y pulmonar.* El área de dichos órganos (en cm<sup>2</sup>) corresponde a ratones que escaparon al control preventivo con Maitake. Las dimensiones tuvieron en cuenta valores longitudinales y transversales (cm). Los animales fueron sacrificados al día 46 de la inducción tumorigénica, y removidos dichos órganos.

	AREA HEPATICA MEDIA (cm <sup>2</sup> ) ± DS	AREA PULMONAR MEDIA (cm <sup>2</sup> ) ± DS
CONTROL CON TUMOR	5,63 ± 0,88	1,55 ± 0,88
MAITAKE PRO4X SIN TUMOR	4,83 ± 2,02	1,73 ± 0,74
MAITAKE STANDARD CON TUMOR	5,63 ± 0,88	2,51 ± 0,79 (**p≤0,01 vs CONTROL)
MAITAKE PRO4X CON TUMOR	5,81 ± 0,99	3,10 ± 0,74 (*p≤0,05 vs CONTROL) (*p<0,05 vs MAITAKE PRO4X SIN TUMOR)



**Figura 76.4. Dimensiones hepáticas y pulmonares.** El gráfico indica el efecto de Maitake en el tamaño de hígado (izquierda) y pulmón (derecha). Las dimensiones se expresaron en términos areales (cm<sup>2</sup>) tomando en cuenta valores longitudinales y transversales (cm) de ambos órganos. Los animales fueron sacrificados al día 46 de la inducción tumorigénica y los órganos removidos durante la autopsia de los ratones. Se observaron diferencias significativas (\* $p \leq 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p \leq 0,01$ ) solo en el área pulmonar.

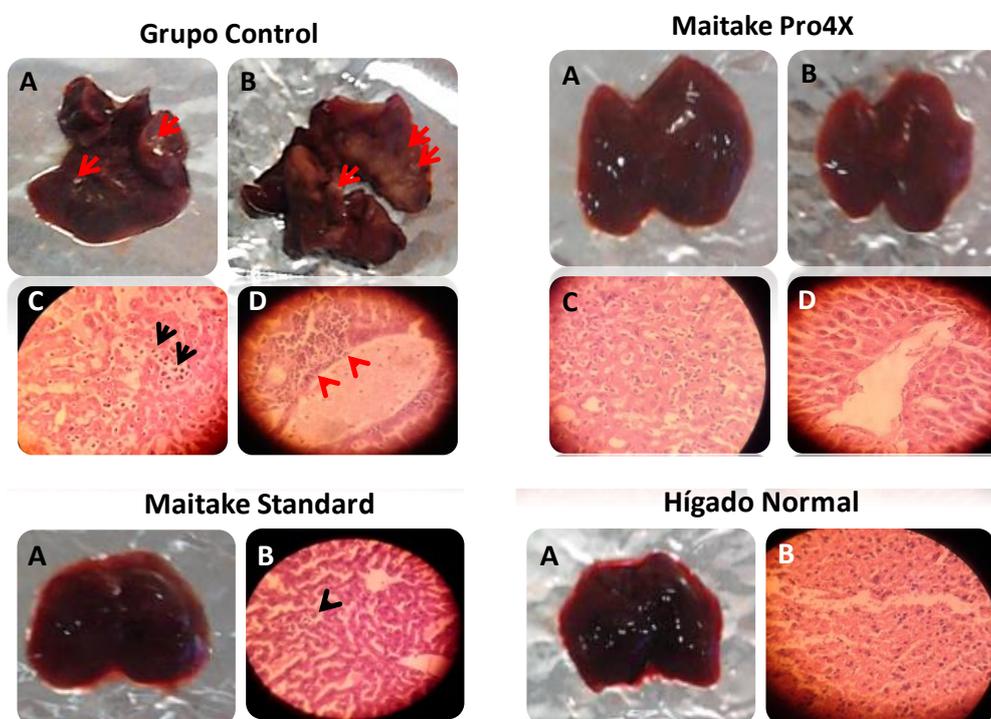


**Figura 77.4. Peso hepático y pulmonar.** El gráfico indica el efecto de Maitake en el peso de hígado (izquierda) y pulmón (derecha). El peso de los órganos (en gramos) se expresó como media  $\pm$  2 desvíos estandar. Los animales fueron sacrificados al día 46 de la inducción tumorigénica y los órganos removidos durante la autopsia de los ratones. No se observaron diferencias significativas de peso para ninguno de los órganos ( $p > 0,05$ ).

Los resultados consignados en la Tabla 30.4 y las Fig. 76.4 a 77.4 respecto del efecto de Maitake en el tamaño y peso de hígado y pulmón, demostró diferencias significativas solo para el tamaño pulmonar de los grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en dimensiones y pesos hepáticos, ni en pesos pulmonares ( $p > 0,05$ ).

El área pulmonar de Maitake Standard y Maitake PRO4X fue significativamente mayor al Control ( $*p \leq 0,05$ ). Por su parte, Maitake PRO4X con tumor presentó un tamaño pulmonar significativamente mayor a Maitake PRO4X sin tumor ( $*p \leq 0,05$ ).

**Análisis macroscópico e histológico de hígado.** Las fotografías correspondientes al examen macroscópico *ex vivo* del órgano, y sus respectivas microfotografías histológicas, se detallan en la Fig. 77.4.



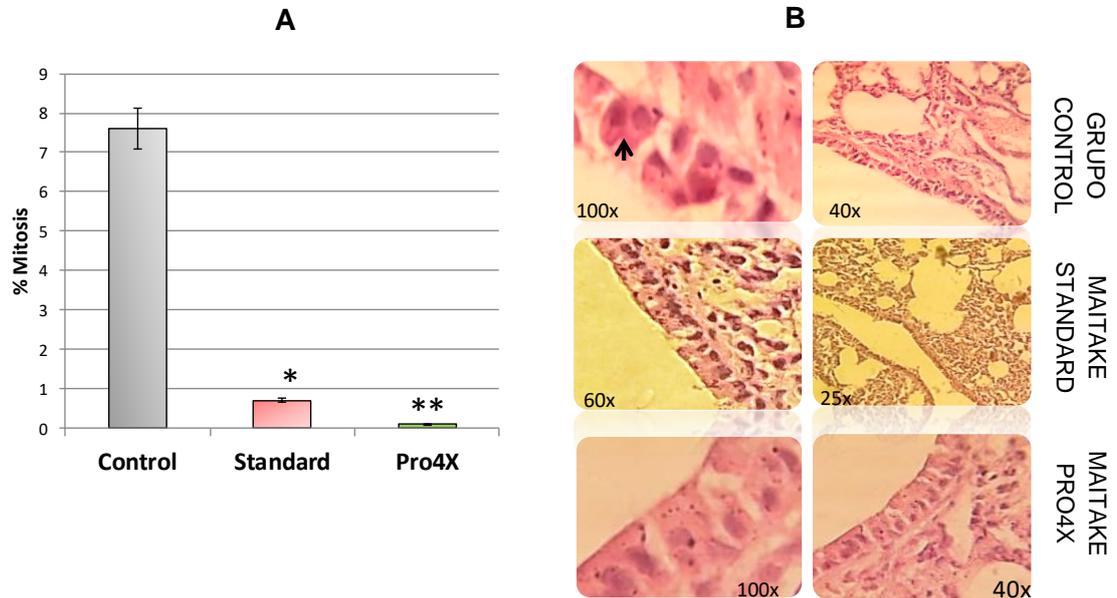
**Figura 77.4.** Observación macroscópica e histológica del hígado. Las imágenes ilustran el aspecto macro y microscópico del tejido hepático, representativo de cada una de las condiciones ensayadas. Se incluye tejido normal libre de tumor (abajo derecha), de animales que no desarrollaron tumor por efecto de Maitake. Las flechas negras indican áreas de proliferación celular, y las rojas zonas metastásicas, especialmente observadas en el grupo Control.

Las imágenes macroscópicas consignadas en la Fig. 77.4, sugieren que el hígado del grupo Control presenta un aspecto muy diferente al de los animales Tratados con Maitake, resultando los primeros más blanquecinos, pálidos y rígidos (Fig. 77.4 - grupo Control A y B). Mientras que los hígados de los grupos Maitake Standard y PRO4X

resultaron más oscuros, de textura y aspecto normales (Fig. 77.4 – grupos Maitake Standard A y PRO4X A y B), similar al hígado del grupo sin tumor tratado con Maitake PRO4X (Fig. 77.4 – hígado normal A).

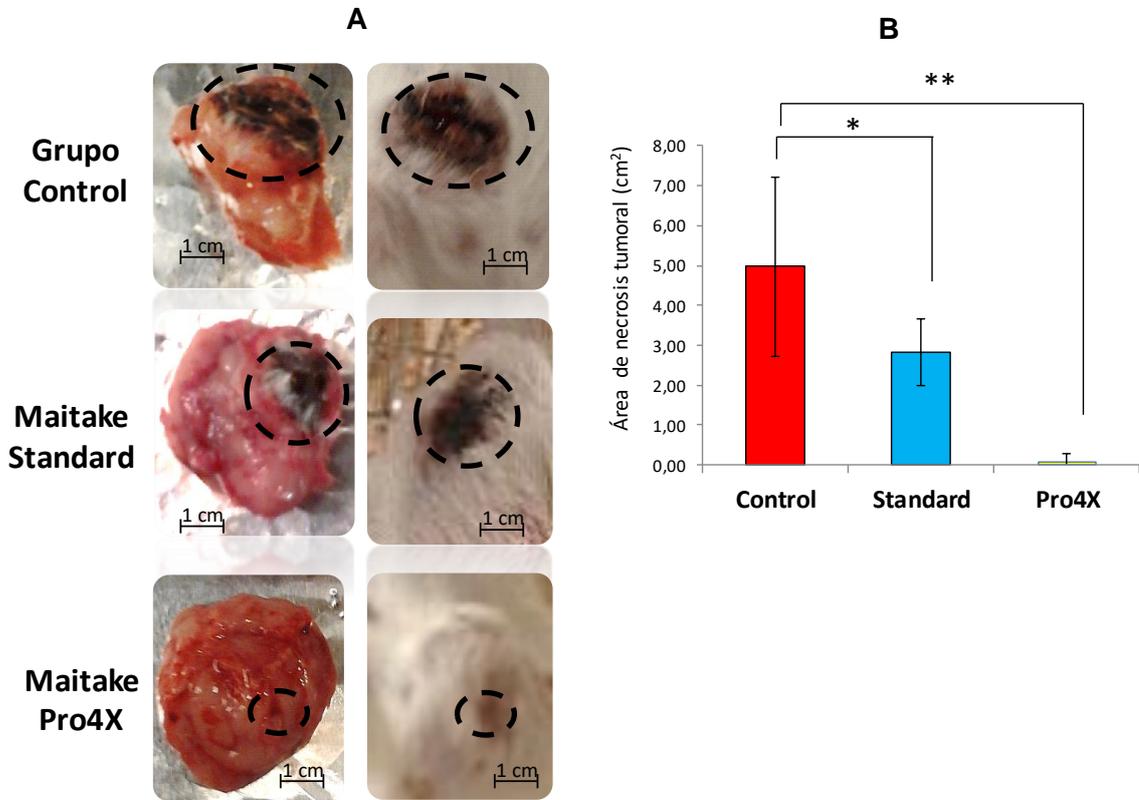
Histológicamente, se observó que los animales con tumor del grupo Control poseían vasos sanguíneos hepáticos muy dilatados, de estructuras hepáticas diferentes a las normales, con algunos cambios mitóticos (Fig. 77.4 – grupo Control C y D). Por el contrario, ninguno de los grupos Maitake (Standard y PRO4X) exhibieron diferencias morfológicas evidentes, resultando comparables a tejidos hepáticos normales (Fig. 77.4 - hígado normal B). No fue posible establecer con certeza si las anomalías histológicas del grupo Control correspondían a metástasis.

**Análisis macroscópico e histológico de pulmón.** A nivel macroscópico, no se observaron diferencias morfológicas en los pulmones de ratones con tumor y sin tumor. Pero el examen histológico reveló un porcentaje de mitosis significativamente más alto en secciones pulmonares del Control ( $7,50 \pm 0,70$ ) respecto de los grupos Maitake Standard ( $0,80 \pm 0,10$ , con  $*p \leq 0,05$ ) y PRO4X ( $0,10 \pm 0,02$ , con  $**p \leq 0,001$ ) (Fig. 78.4-A). Las microfotografías (X100), consignadas en la Fig. 78.4-B, ilustran el estado mitótico del bronquiolo, señalado mediante una flecha negra.



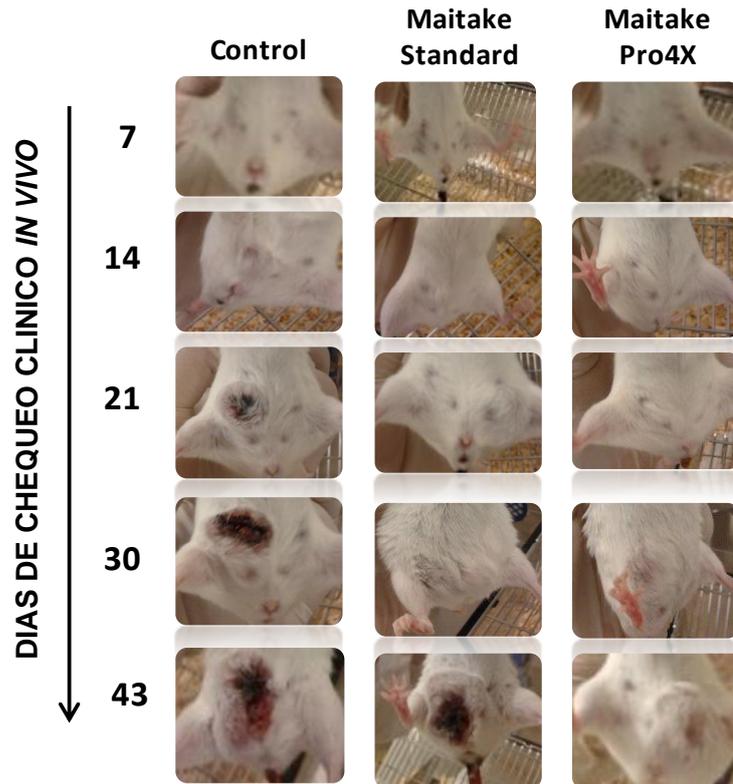
**Figura 78.4.** Análisis histológico pulmonar. **A)** Gráfico del % de mitosis pulmonar de cada una de las condiciones ensayadas, consignando las diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ). **B)** Las microfotografías ilustran el aspecto microscópico del tejido pulmonar, representativo de cada una de las condiciones ensayadas. Con flecha negra se resalta el estado mitótico.

**Necrosis de tejido tumoral.** Otro importante aspecto de este trabajo fue el estudio del área necrosada correspondiente al tumor mamario, lo cual se ilustra en la Fig. 79.4.



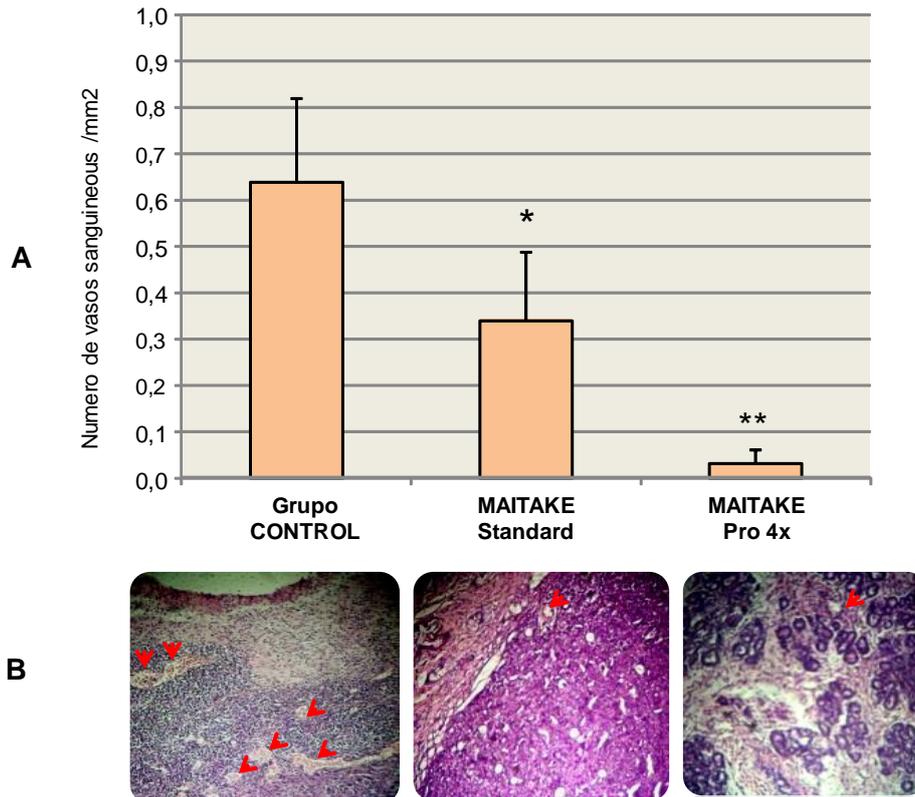
**Figura 79.4.** *Necrosis tumoral mamaria.* Se estudió el efecto de los extractos glicoproteicos de Maitake sobre la necrosis tumoral. **A)** Imágenes representativas del tumor mamario *ex vivo* (izquierda) e *in situ* (derecha) para cada una de las condiciones ensayadas. En círculos punteados se destacan las regiones necrosadas del tumor. **B)** Gráfico del área tumoral necrosada (cm<sup>2</sup>) para cada uno de los grupos experimentales. Se indican las diferencias significativas (\* $p \leq 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p \leq 0,01$ ) de las condiciones ensayadas.

Los resultados de la Fig. 79.4 sobre el área tumoral necrosada, demostraron que los animales del Control presentaron un área necrosada significativamente mayor a la desarrollada por grupos Maitake Standard (\* $p \leq 0,05$ ) y PRO4X (\*\* $p \leq 0,01$ ) (Fig. 79.4-B). Este último, prácticamente no presentó área tumoral necrosada. Esta observación se ilustra en la Fig. 80.4, que consigna el desarrollo de necrosis tras la inducción tumoral.



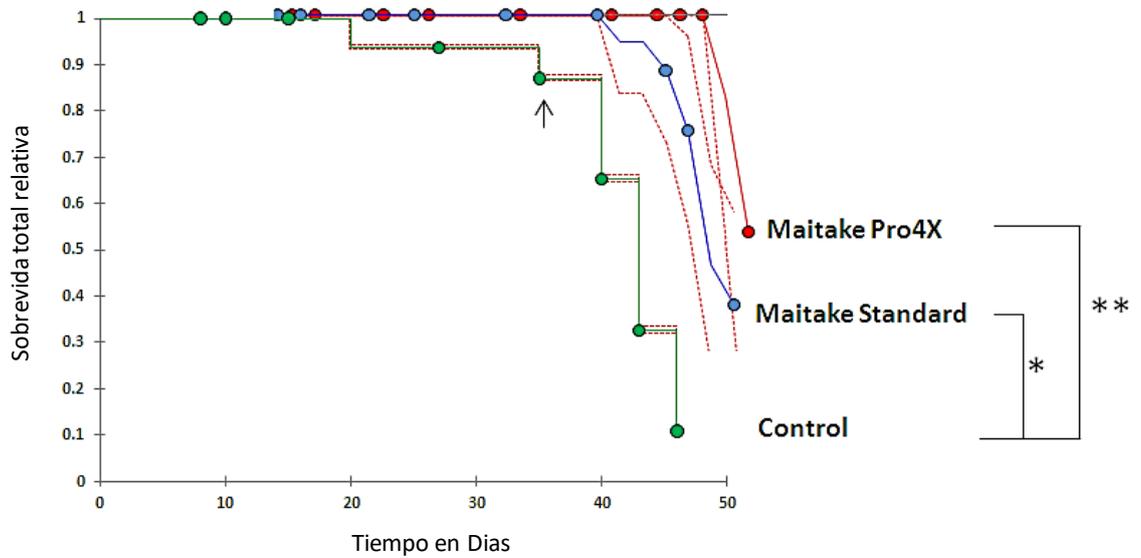
**Figura 80.4.** *Necrosis tumoral mamaria.* Las fotografías ilustran la evolución del área necrosada a partir de la inducción tumorigénica (día 15 del experimento). Se observa el área abdominal mamaria representativa de cada uno de los grupos experimentales, y los días de chequeo clínico *in vivo* hasta el día 46 (finalización del ensayo y sacrificio de los animales).

**Angiogénesis del tumor mamario.** Con el fin de investigar si Maitake generaba un efecto antiangiogénico o de reducción de la irrigación sanguínea tumoral, se estimó el índice angiogénico tumoral. Efectuamos el recuento de vasos sanguíneos/mm<sup>2</sup> en cada una de las condiciones ensayadas. Los resultados obtenidos (Fig. 81.4) sugieren que la densidad de vasos sanguíneos tumorales fue significativamente mayor en el grupo Control ( $0,637 \pm 0,175$ ) respecto de los grupos Maitake PRO4X ( $0,028 \pm 0,024$  vasos/mm<sup>2</sup>, con  $**p \leq 0,01$ ) y Maitake Standard ( $0,339 \pm 0,149$  vasos/mm<sup>2</sup>, con  $*p \leq 0,05$ ). En ese sentido, el desarrollo angiogénico tumoral en el grupo Maitake PRO4X, fue 1/23 el del Control.



**Figura 81.4.** *Angiogénesis tumoral mamaria.* Se estudió el efecto de Maitake Standard y PRO4X sobre el índice angiogénico tumoral o de irrigación sanguínea del tumor. **A)** El gráfico representa la cantidad de vasos sanguíneos de tejido tumoral/mm<sup>2</sup>, observándose diferencias significativas en cada uno de los grupos experimentales (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). **B)** Microfotografías representativas de los tumores mamarios. Las flechas rojas indican la localización exacta de los vasos sanguíneos.

**Sobrevida de los animales.** Los efectos de Maitake en la sobrevida total relativa de hembras BALB/c con inducción tumoral, se estudiaron mediante las curvas de Kaplan-Meier desde el inicio del ensayo hasta el día del sacrificio (Fig. 82.4). Los resultados obtenidos de estas curvas sugieren que a partir del día 35 post tumorigénesis y hasta el final del ensayo, la sobrevida fue significativamente diferente en los grupos Tratados con ambos extractos de Maitake ( $1,00 \pm 0,00$ ) respecto del Control ( $0,87 \pm 0,086$ ). A partir del día 35, la sobrevida del Control decreció muy rápidamente (Fig. 82.4, línea verde) reduciéndose prácticamente a 0 para el día 46 ( $0,108 \pm 0,099$ ). Mientras que el grupo Maitake Standard presentó una sobrevida significativamente alta respecto del Control al día 46 ( $0,82 \pm 0,12$ , Fig. 82.4 - línea azul, con (\* $p < 0,05$ ); siendo de 100% ( $1,00 \pm 0,00$ ) para el grupo Maitake PRO4X (Fig. 82.4, línea roja), significativamente más alta que el Control (\*\* $p \leq 0,01$ ). Sin embargo, al día 50 post tumorigénesis el grupo Maitake PRO4X redujo su sobrevida a la mitad, similar a lo ocurrido en el grupo Maitake Standard. Cabe destacar que al día 50 ningún ratón del Control se hallaba vivo.



**Figura 82.4.** *Sobrevida total relativa de hembras BALB/c.* El gráfico corresponde a las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia total relativa de hembras BALB/c tratadas con Maitake Standard y PRO4X. Se indica la supervivencia relativa desde los días 7 post-tumorigénesis hasta el 50 (fin del ensayo). La línea verde corresponde al Control, azul a Maitake Standard y roja a Maitake PRO4X. Se observaron diferencias significativas ( $*p \leq 0,05$ ) y muy significativas ( $**p \leq 0,01$ ) entre los grupos experimentales.

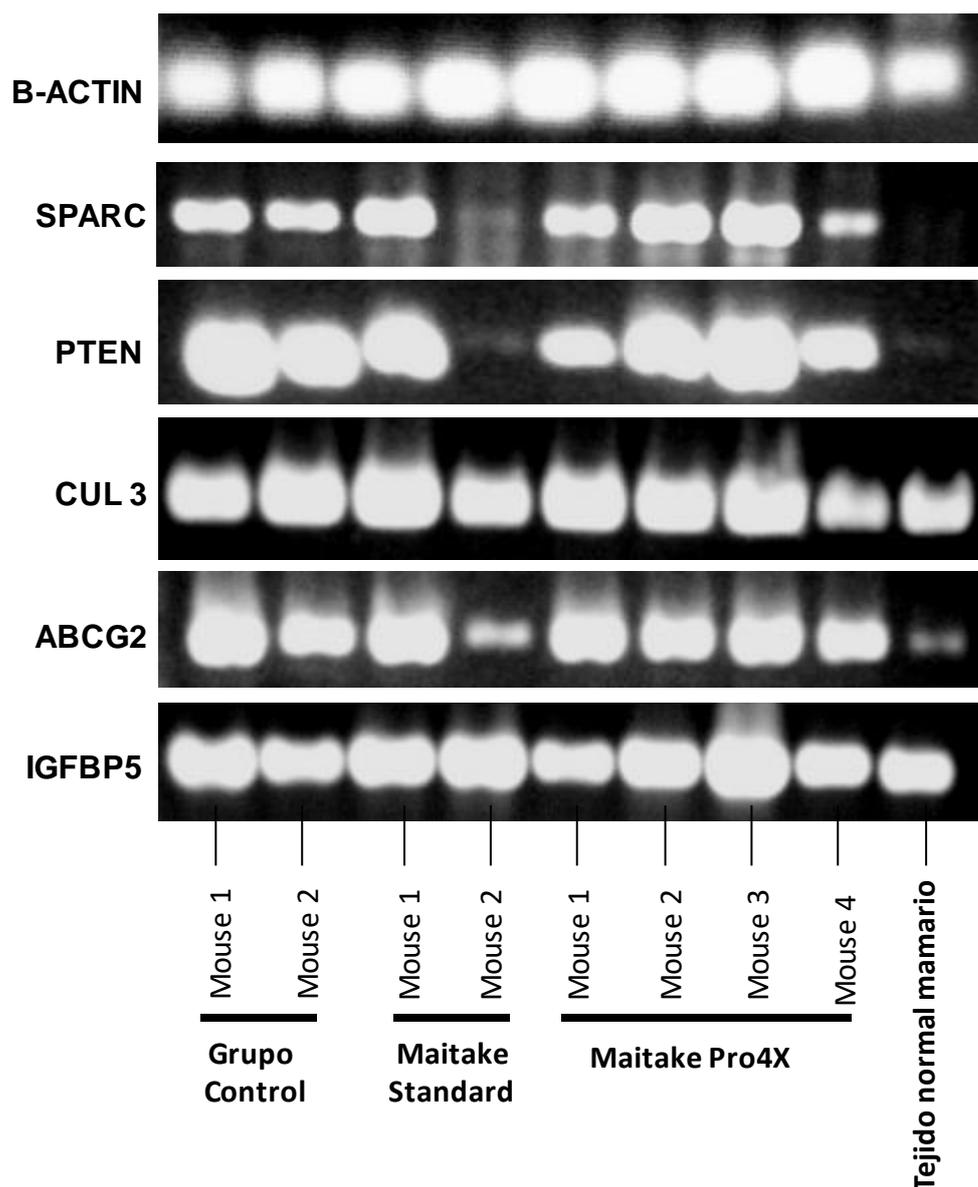
**Expresión de genes específicos.** El efecto preventivo de Maitake en la expresión génica de tejido tumoral mamario de hembras BALB/c se indica en la Fig. 83.4. Los genes estudiados fueron ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC, cuya expresión resultó modulada por Maitake en estudios previos de nuestro grupo [200].

Inicialmente, se determinó -por espectrofotometría con absorbancia a 260 nm- la concentración, pureza e integridad de RNA total aislado de tejido mamario. Para determinar pureza se midió también absorbancia a 280 nm y 230 nm. Los resultados obtenidos se consignan en la Tabla 31.4.

**Tabla 31.4.** *Concentración, pureza e integridad de RNA total.* El ácido ribonucleico corresponde al tejido mamario abdominal de hembras BALB/c, removida a los 46 días de la inducción tumorigénica. La concentración, pureza e integridad del RNA total se determinó por espectrofotometría y absorbancia a 260 nm, 280 nm y 230 nm.

GRUPO EXPERIMENTAL	HEMBRA	Abs260 nm	Abs280 nm	Abs230 nm	Abs260/ Abs280	Abs260/ Abs230	% PUREZA	µg RNA/µl
CONTROL PBS CON TUMOR	1	0,771	0,423	0,304	1,823	2,536	90	3095,20
	2	0,582	0,320	0,274	1,819	2,124	90	2343,10
TRATADO MAITAKE PRO4X CON TUMOR	1	0,697	0,383	0,354	1,820	1,969	90	2897,00
	2	0,257	0,139	0,108	1,849	2,380	89	1062,30
	3	1,418	0,775	0,817	1,830	1,736	91	5678,00
	4	0,674	0,368	0,364	1,832	1,852	91	2708,80

Posteriormente, con el RNA purificado y cuantificado, se realizaron reacciones de RT-PCR para determinar expresión génica específica de ABCG2, CUL3, IGFBP5, PTEN y SPARC. Como control se consideró la expresión génica de la  $\beta$ -actina. Los resultados obtenidos se indican en la Fig. 83.4.



**Figura 83.4.** *Expresión de genes específicos.* Los resultados indicados corresponden al tejido mamario abdominal de hembras BALB/c tras el tratamiento preventivo con los extractos glicoproteicos de Maitake (Standard y PRO4X). Como Control se consideró la expresión génica de la  $\beta$ -actina. Se investigó la expresión de SPARC, PTEN, IGFBP5, ABCG2 y CUL3.

Los resultados de expresión génica indicados en la Fig. 83.4 sugieren que la  $\beta$ -actina se expresó en todas las condiciones ensayadas. Mientras que SPARC, se expresó en forma diferencial, mayormente en los tejidos 2 y 3 del grupo Maitake PRO4X. No se observó banda de SPARC en el tejido normal Tratado con Maitake PRO4X, como así tampoco en el tejido tumoral 2 del grupo Maitake Standard.

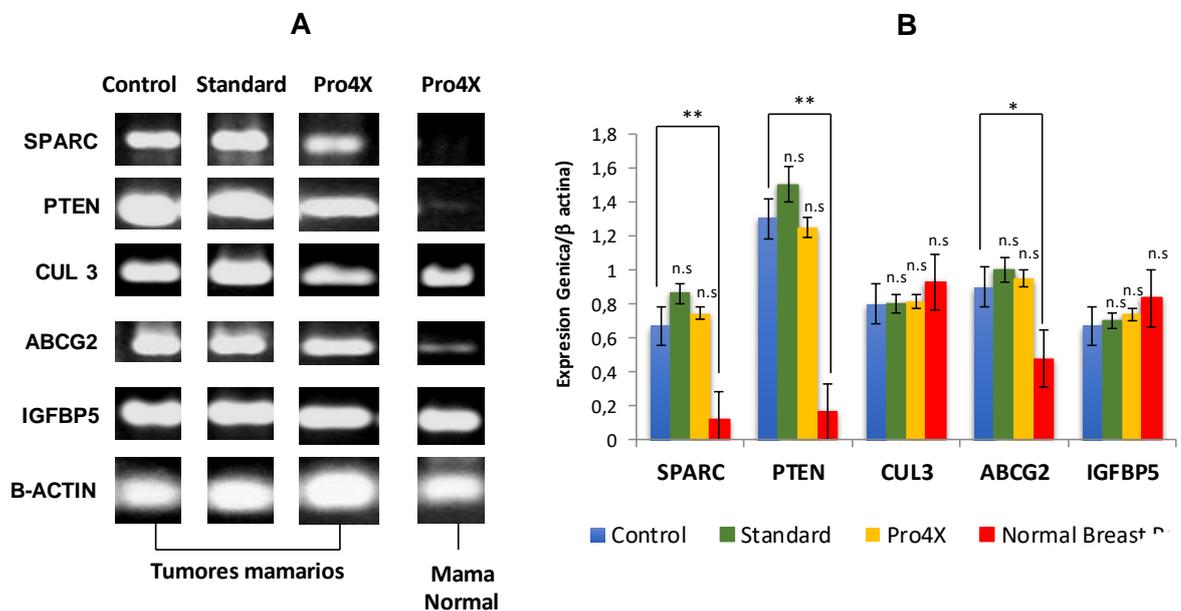
Con respecto a PTEN, se observó menor expresión en los tejidos 1 y 4 de Maitake PRO4X, y banda muy tenue en los tejidos tumoral 2 de Maitake Standard, y normal.

El gen ABCG2, en general, se expresó en todos los tumores mamarios tratados con ambos extractos de Maitake, a excepción de la leve expresión en el tejido 2 de Maitake Standard. También se observó tenue expresión en el tejido normal.

En cuanto a los genes CUL3 e IGFBP5, ambos se expresaron en todas las condiciones ensayadas. Para determinar si hubo diferencia entre sus niveles de expresión, realizamos una semi-cuantificación mediante curvas de concentración por ciclos (Fig. 84.4). La Fig. 84.4-A, sugiere que el gen SPARC resultó up-modulado en los tumores mamarios Control y Tratado con ambos extractos de Maitake, pero no hubo expresión o fue muy tenue en el tejido normal. Dicha diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 84.4-B).

El gen PTEN resultó up-modulado en todos los tumores mamarios de los grupos Control y Tratado (Fig. 84.4-A), pero se expresó muy tenuemente en el tejido normal (Fig. 84.4-B). Mientras que CUL3 e IGFBP5 se expresaron en todas las condiciones ensayadas (Control, Tratado y tejido normal) (Fig. 84.4-A), sin observarse diferencias significativas de expresión en el tejido tumoral de Control y Tratado (Fig. 84.4-B).

Por último, ABCG2 se expresó diferencialmente, resultando up modulado en los tumores mamarios del Control y Tratado, pero con débil expresión en tejido normal (Fig. 84.4-A y 84.4-B).



**Figura 84.4. Expresión génica específica. A)** Bandas de expresión RT-PCR a nivel mRNA en los genes seleccionados correspondiente a los tejidos mamarios tumorales y normales que resistieron el desarrollo tumoral. **B)** Gráfico de expresión de los genes estudiados relativo a la expresión de  $\beta$ -actina para todas las condiciones ensayadas de la Fig. A. Se consignan las diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ), y muy significativas ( $**p < 0,01$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ).

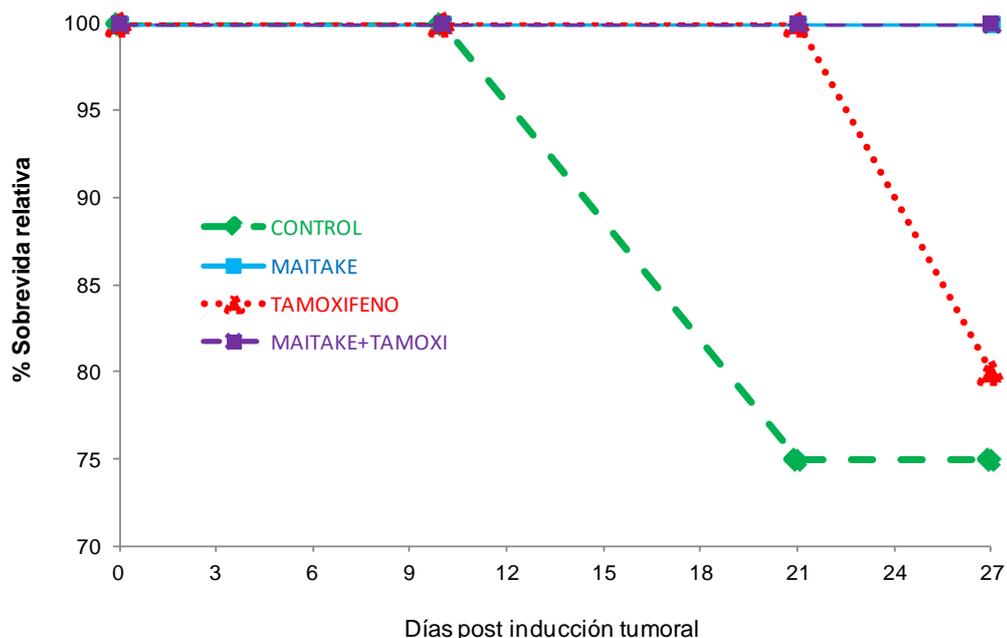
#### IV.3.6 Prevención tumoral Maitake + Tamoxifeno

La prevención tumoral de Maitake PRO4X + Tamoxifeno se estudió en el modelo murino. Para ello, 19 ratones hembra BALB/c sanos, de 6-8 semanas de edad con un peso comprendido entre 15 g y 21 g, fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales: Control Sano, Tratado con Maitake PRO4X (5 mg  $\beta$ -glucanos/kg/día), Tratado con Tamoxifeno (6,67  $\mu$ g/ratón/día, equivalente a 20 mg/paciente/día) y Tratado con Maitake + Tamoxifeno a las dosis indicadas. La administración se realizó oralmente durante 50 días (período equivalente a 5 años humanos aproximadamente). El último día de prevención (día 50), se indujo tumorigénesis mamaria por inyección intraperitoneal de  $2 \times 10^5$  células mamarias tumorales murinas LM3, y en las semanas siguientes se procedió a determinar desarrollo tumoral, sobrevida y mortalidad hasta el día 27 post-tumorigénesis (sacrificio).

**Sobrevida murina.** El efecto de Maitake y Tamoxifeno en la sobrevida total relativa de los animales se estimó mediante el número de ratones vivos que sobrevivieron al desarrollo tumoral (Tabla 32.4 y Fig. 85.4). Los resultados obtenidos sugieren que hasta el día 10 de inducción tumoral, la sobrevida fue del 100% para todas las condiciones ensayadas. Pero a partir del día 21, la sobrevida se redujo a 75% en el grupo Control. Mientras que al día 27, fue 80 % para los ratones Tratados con Tamoxifeno, y 100% para los animales Tratados con Maitake y con Maitake + Tamoxifeno.

**Tabla 32.4. Sobrevida total relativa.** La misma corresponde a hembras BALB/c con desarrollo tumoral mamario que fueron tratadas preventivamente con Maitake y Tamoxifeno. Se indica la sobrevida % de los distintos tratamientos a los días 10, 21 y 27 post inducción tumorigénica.

Grupos experimentales	SOBREVIDA TOTAL RELATIVA					
	día 10 post tumorigénesis		día 21 post tumorigénesis		día 27 post tumorigénesis	
CONTROL	4/4	100%	3/4	75%	3/4	75%
MAITAKE	5/5	100%	5/5	100%	5/5	100%
TAMOXIFENO	5/5	100%	5/5	100%	4/5	80%
MAITAKE+TAMOXI	5/5	100%	5/5	100%	5/5	100%



**Figura 85.4.** % *Sobrevivida total relativa*. La misma corresponde a hembras BALB/c con desarrollo tumoral que fueron tratadas preventivamente con Maitake y Tamoxifeno. El gráfico ilustra el % sobrevivida de los distintos tratamientos desde la inducción tumorigénica con células murinas LM3 hasta el final del ensayo (día 27 post tumorigénesis). Se observan diferencias en los % sobrevivida relativa de cada una de las condiciones ensayadas.

**Peso corporal.** Los valores medios de peso corporal relativo al día 0 de hembras BALB/c a los días 9, 15, 22, 29, 37, 44, 50, 60 y 77 del ensayo, se indican en la Tabla 33.4 y Fig. 86.4. Estos resultados sugieren que los animales del Control tuvieron un incremento significativo ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ) de peso desde el día 29 de tratamiento y hasta el final del ensayo, respecto del inicio del protocolo (Fig. 86.4, línea punteada verde).

El grupo Tratado con Maitake tendió a mantener el peso corporal, con aumentos y descensos significativos respecto del día 9. Sin embargo, osciló en valores inferiores a los del Control. Durante la etapa de inducción tumoral (días 50 a 77), hemos observado que el peso corporal del grupo Maitake tendió a incrementarse respecto de la etapa de administración (días 0 a 50) acercándose a los valores del Control (Fig. 86.4, línea celeste).

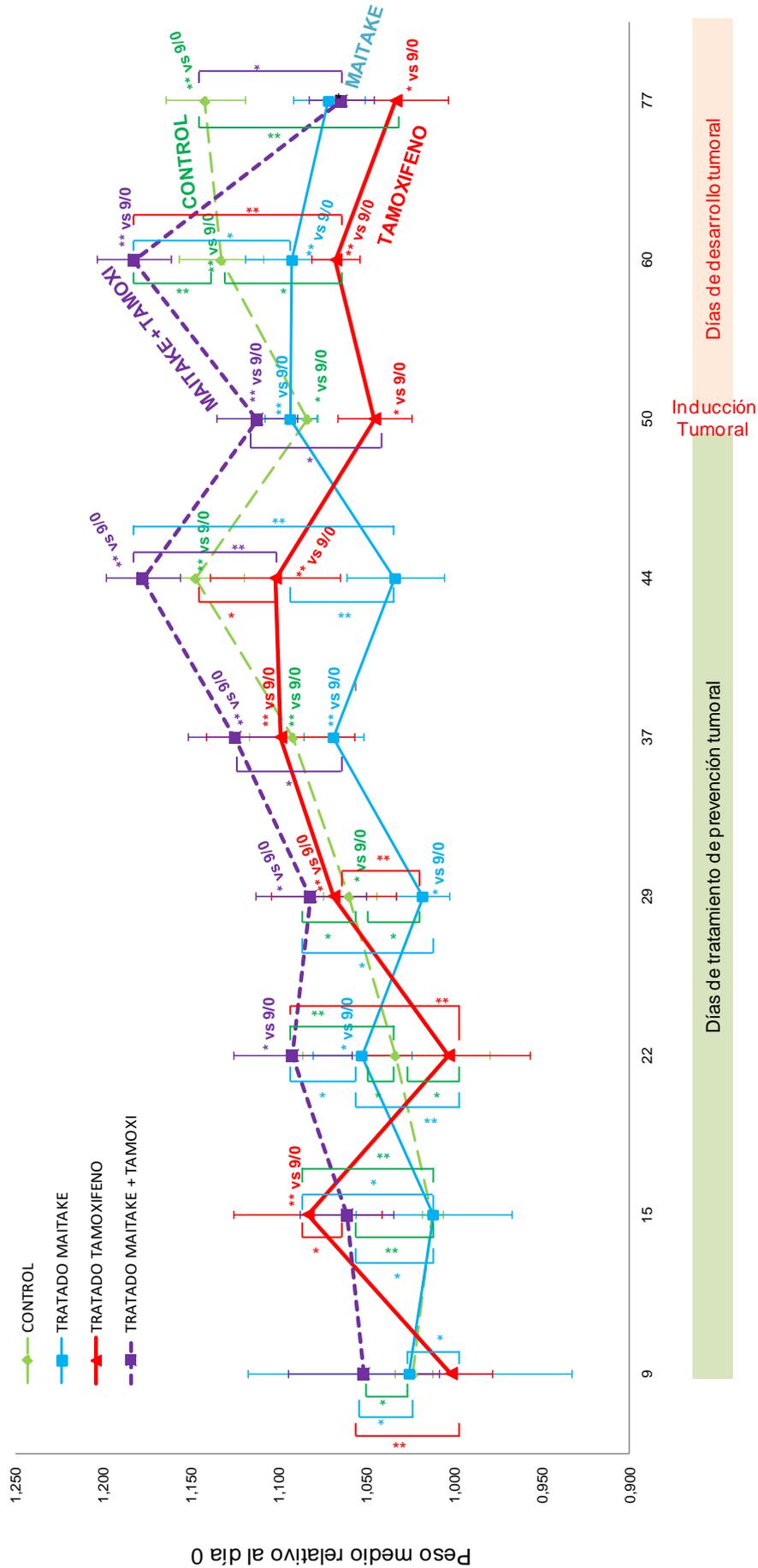
Por su parte, el grupo Tamoxifeno exhibió aumentos de peso significativo ( $*p < 0,05$  vs 9/0,  $**p < 0,01$  vs 9/0) durante la etapa de administración (días 0 a 50), mientras que en la etapa tumorigénica, el peso tendió a descender respecto del período de administración. En esta última etapa se registraron valores de peso inferiores a los de los grupos Control y Maitake (Fig. 86.4 línea roja).

El grupo Tamoxifeno + Maitake mostró tendencia al aumento de peso durante todo el ensayo, frecuentemente con incrementos significativos (\* $p < 0,05$  vs 9/0, \*\* $p < 0,01$  vs 9/0). Los valores registrados fueron más altos que en las restantes condiciones experimentales. Al finalizar el ensayo (día 77) se observó un importante descenso de peso, inferior al del Control, pero superior al del grupo Tratado con Tamoxifeno (Fig. 86.4, línea punteada violeta).

Hemos observado que al día 50 del ensayo (inducción tumorigénica), el grupo Control y los grupos Tratados con Tamoxifeno y con Tamoxifeno + Maitake presentaron descensos significativos de peso respecto del día 9, mientras que el grupo Tratado con Maitake tuvo aumento significativo de peso respecto del día 9.

**Tabla 33.4.** *Peso corporal medio relativo al día 0.* El mismo corresponde a hembras BALB/c de las distintas condiciones ensayadas a los días 9, 15, 22, 29, 37, 44, 50, 60 y 77 del ensayo experimental. Los resultados se indicaron como media  $\pm$  2 desvíos estándar, relativos al día 0. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0,01$ ) de peso durante los chequeos semanales. Las diferencias sin significancia estadística (ns,  $p > 0,05$ ) no se consignaron en el gráfico.

DIAS DE TRATAMIENTO	PESO MEDIO RELATIVO AL DIA 0 $\pm$ DS			
	GRUPO CONTROL	GRUPO MAITAKE	GRUPO TAMOXIFENO	GRUPO MAITAKE + TAMOXI
DIA 9/0	1,023 $\pm$ 0,023	1,026 $\pm$ 0,021	1,002 $\pm$ 0,030 (* vs MAITAKE)	1,052 $\pm$ 0,018 (* vs CONTROL) (* vs MAITAKE) (** vs TAMOXI)
DIA 15/0	1,013 $\pm$ 0,024	1,012 $\pm$ 0,027	1,084 $\pm$ 0,014 (** vs D 9/0) (** vs CONTROL) (* vs MAITAKE)	1,061 $\pm$ 0,021 (** vs CONTROL) (* vs MAITAKE) (* vs TAMOXI)
DIA 22/0	1,033 $\pm$ 0,006	1,053 $\pm$ 0,015 (** vs D 9/0) (* vs CONTROL)	1,004 $\pm$ 0,021 (* vs CONTROL) (** vs MAITAKE)	1,092 $\pm$ 0,023 (* vs D 9/0) (** vs CONTROL) (* vs MAITAKE) (** vs TAMOXI)
DIA 29/0	1,060 $\pm$ 0,027 (* vs D 9/0)	1,018 $\pm$ 0,028 (* vs CONTROL)	1,069 $\pm$ 0,037 (** vs D 9/0) (* vs MAITAKE)	1,082 $\pm$ 0,021 (* vs D 9/0) (* vs CONTROL) (* vs MAITAKE)
DIA 37/0	1,092 $\pm$ 0,025 (** vs D 9/0)	1,069 $\pm$ 0,017 (** vs D 9/0)	1,099 $\pm$ 0,042 (** vs D 9/0)	1,125 $\pm$ 0,027 (** vs D 9/0) (* vs MAITAKE)
DIA 44/0	1,148 $\pm$ 0,015 (** vs D 9/0)	1,034 $\pm$ 0,015 (** vs CONTROL)	1,102 $\pm$ 0,036 (** vs D 9/0) (* vs CONTROL) (** vs MAITAKE)	1,178 $\pm$ 0,032 (** vs D 9/0) (** vs MAITAKE) (** vs TAMOXI)
DIA 50/0	1,084 $\pm$ 0,054 (* vs D 9/0)	1,093 $\pm$ 0,028 (** vs D 9/0)	1,046 $\pm$ 0,047 (* vs D 9/0)	1,113 $\pm$ 0,034 (** vs D 9/0) (* vs TAMOXI)
DIA 60/0	1,133 $\pm$ 0,006 (** vs D 9/0)	1,092 $\pm$ 0,044 (** vs D 9/0)	1,068 $\pm$ 0,042 (** vs D 9/0) (* vs CONTROL)	1,183 $\pm$ 0,027 (** vs D 9/0) (** vs CONTROL) (* vs MAITAKE) (** vs TAMOXI)
DIA 77/0	1,142 $\pm$ 0,011 (** vs D 9/0)	1,072 $\pm$ 0,093	1,033 $\pm$ 0,023 (* vs D 9/0) (** vs CONTROL)	1,065 $\pm$ 0,043 (* vs CONTROL)



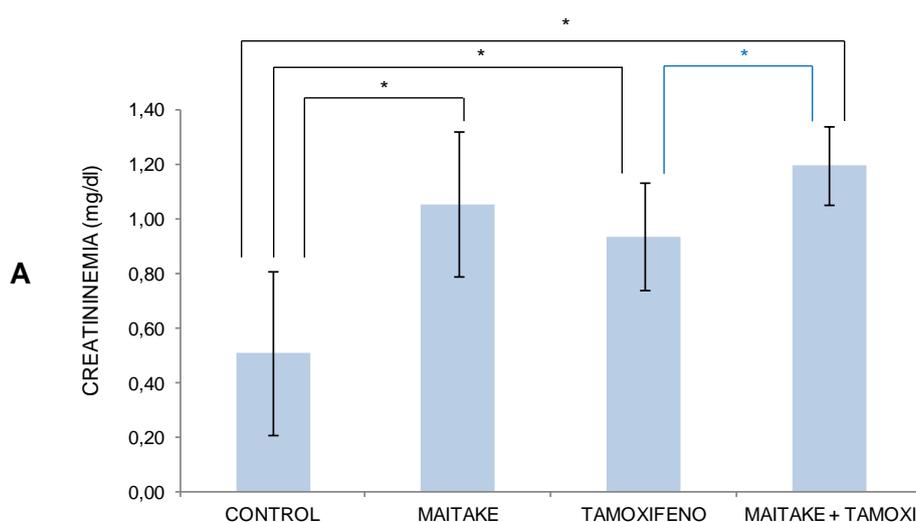
**Figura 86.4.** Efecto del tratamiento preventivo diario con Maitake PRO4X y Tamoxifeno sobre el peso corporal relativo de hembras BALBc antes y después de la inducción tumoral mamaria. El peso corporal se determinó en balanza analítica y fue registrado a los días 0, 9, 15, 22, 29, 37, 44, 50, 60 y 77 del ensayo. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como peso medio relativo al día 0. Los animales de los grupos Tratados presentaron diferencias significativas (\* $p < 0.05$ ) y muy significativas (\*\* $p < 0.01$ ) de peso corporal relativo durante los chequeos semanales. Las diferencias sin significancia estadística (ns,  $p > 0.05$ ) no fueron consignadas en el gráfico.

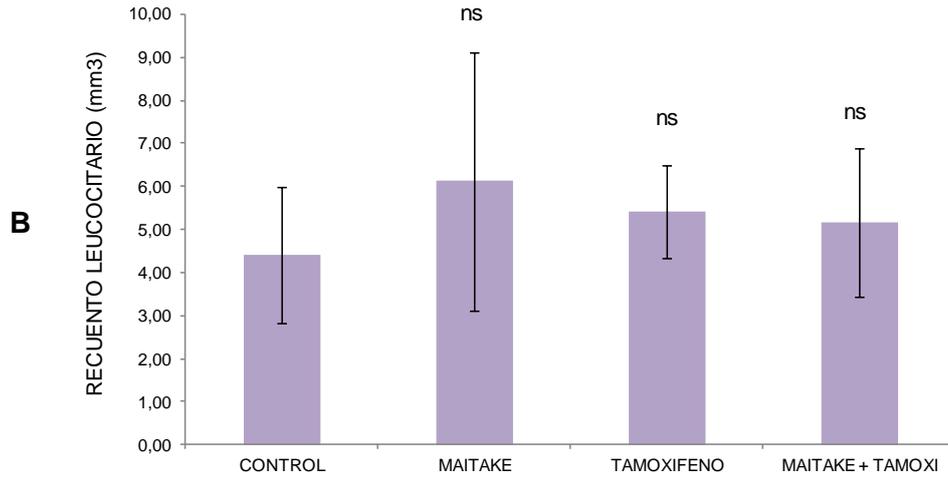
**Parámetros hematológicos y bioquímicos.** Los resultados hematológicos y bioquímicos en sangre periférica se consignan en la Tabla 34.4 y Fig. 87.4. Los mismos sugieren que los animales de los grupos Tratados presentaron aumentos significativos ( $*p \leq 0,05$ ) de creatinina en sangre (mg/dl) respecto del Control. También hemos hallado que el grupo Tamoxifeno + Maitake presentó aumento significativo de creatininemia respecto del grupo Tamoxifeno ( $*p \leq 0,05$ ) (Fig. 87.4-A).

En cuanto al recuento leucocitario, no hemos observado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), entre Control vs Tratado como así tampoco entre los distintos grupos de tratamiento (Fig. 87.4-B).

**Tabla 34.4.** *Parámetros hematológicos y bioquímicos.* Los mismos se realizaron en sangre periférica de hembras BALB/c colectada durante la autopsia. Se determinó creatininemia y recuento leucocitario, cuyos valores corresponden a la media  $\pm$  2 desvíos estándar. Observamos diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ), muy significativa ( $**p < 0,01$ ) y no significativas (ns,  $p > 0,0,5$ ) entre los valores obtenidos.

	CREATININEMIA (mg/dl) MEDIA + DS	RECuento LEUCOCITARIO (GB/mm <sup>3</sup> ) MEDIA + DS
CONTROL	0,510 $\pm$ 0,300	4440 $\pm$ 1587,45
TRATADO MAITAKE	1,060 $\pm$ 0,266 (* vs CONTROL)	6120 $\pm$ 2988,65
TRATADO TAMOXIFENO	0,940 $\pm$ 0,197 (* vs CONTROL)	5425 $\pm$ 1071,99
TRATADO MAITAKE + TAMOXI	1,200 $\pm$ 0,145 (*vs CONTROL) (*vs TAMOXIFENO)	5160 $\pm$ 1722,79

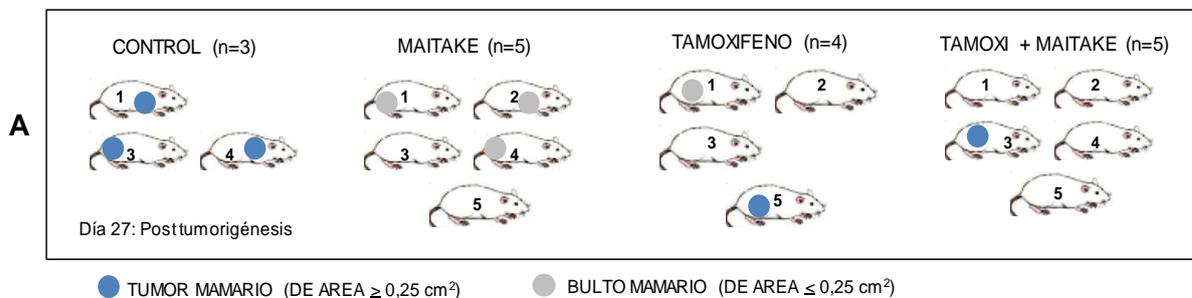




**Figura 87.4.** Efecto de Maitake y tamoxifeno en parámetros hematológicos y bioquímicos murinos. Los mismos se determinaron en sangre periférica de hembras BALB/c. Se indican los valores medios expresados como media  $\pm$  2 desvíos estándar para **A)** Creatininemia, y **B)** Recuento leucocitario. Se indican las diferencias significativas ( $*p \leq 0,05$ ), muy significativas ( $**p \leq 0,01$ ) y no significativa ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.

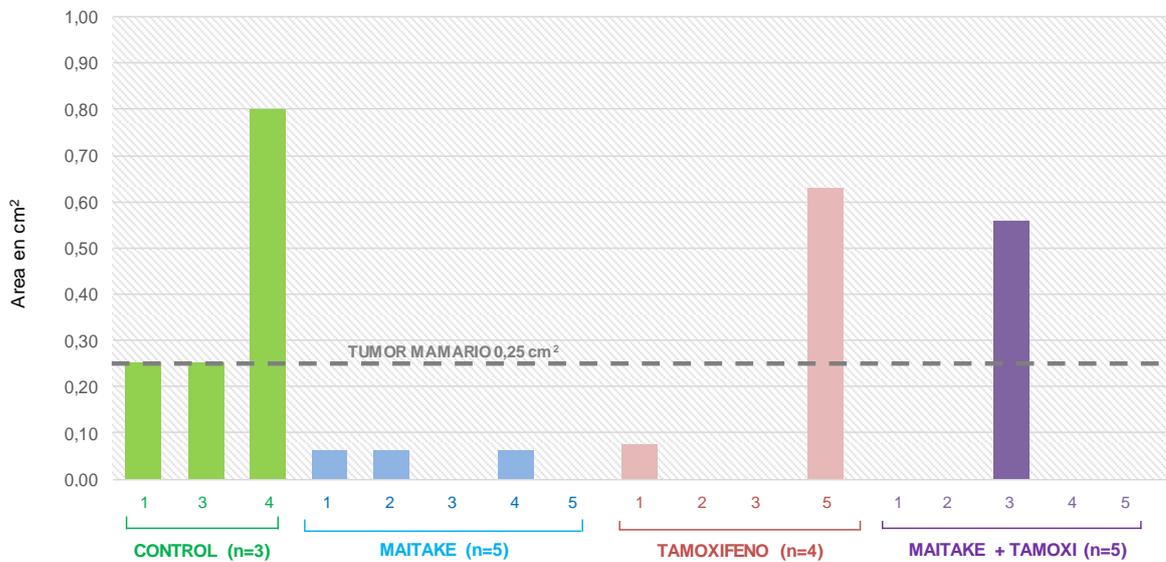
**Desarrollo tumoral mamario.** El tamaño de los tumores mamarios de las hembras BALB/c al último día del ensayo experimental (día 77), se consigna en la Tabla 35.4 y Fig. 91.4. Se consideró tumor mamario al bulto con área  $\geq 0,25 \text{ cm}^2$ . Los resultados obtenidos sugieren presencia de tumores mamarios en el 100% de los animales Control, en el 25% del grupo Tamoxifeno, y en el 20% del grupo Maitake + Tamoxifeno. Sorprendentemente, hubo 0% de tumor mamario en el grupo Maitake PRO4X, aunque algunos ratones presentaron bultos mamarios ( $\leq 0,25 \text{ cm}^2$ ).

**Tabla 35.4.** Tamaño de tumores mamarios. Los mismos corresponden a hembras BALB/c tratadas preventivamente con Maitake y Tamoxifeno. Los tumores fueron removidos durante la autopsia de los ratones. **A)** Clasificación en bulto o tumor mamario. **B)** Dimensiones tumorales longitudinales y transversales en cm, y área en  $\text{cm}^2$ .



B

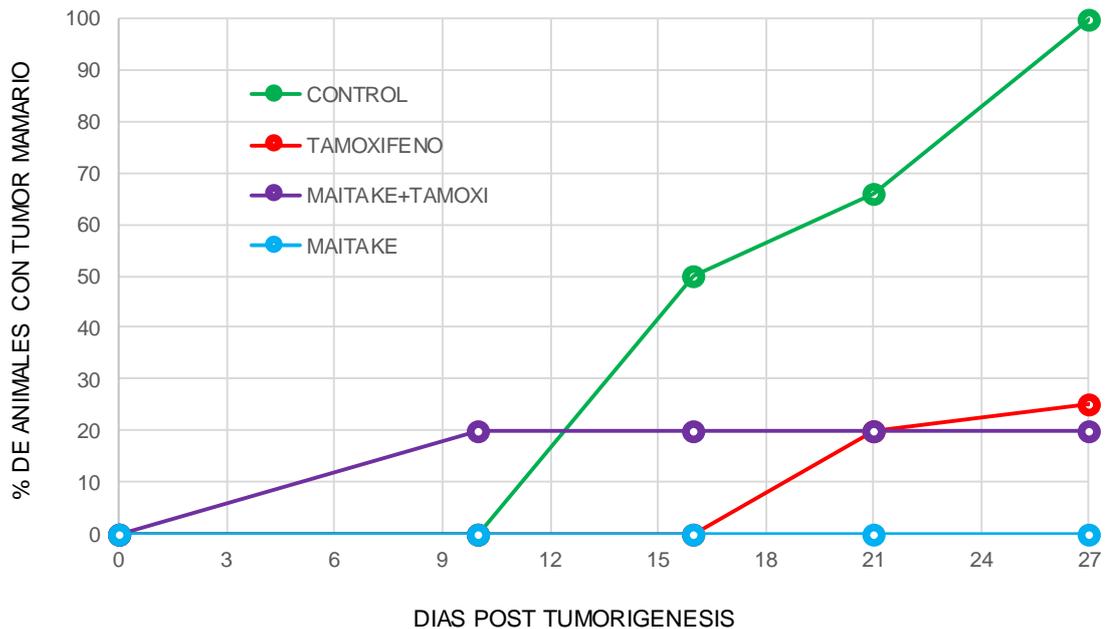
	RATON	Longitudinal (cm)	Transversal (cm)	Area (cm <sup>2</sup> )	CLASIFICACION	PRESENCIA DE TUMOR
GRUPO CONTROL	1	0,50	0,50	0,25	TUMOR MAMARIO	100%
	3	0,50	0,50	0,25	TUMOR MAMARIO	
	4	0,80	1,00	0,80	TUMOR MAMARIO	
GRUPO MAITAKE	1	0,30	0,20	0,06	PEQUEÑO BULTO	0%
	2	0,30	0,20	0,06	PEQUEÑO BULTO	
	3	-	-	-	NO HAY BULTO	
	4	0,30	0,20	0,06	PEQUEÑO BULTO	
	5	-	-	-	NO HAY BULTO	
GRUPO TAMOXIFENO	1	0,25	0,30	0,08	PEQUEÑO BULTO	25%
	2	-	-	-	NO HAY BULTO	
	3	-	-	-	NO HAY BULTO	
	5	0,90	0,70	0,63	TUMOR MAMARIO	
GRUPO MAITAKE + TAMOXI	1	-	-	-	NO HAY BULTO	20%
	2	-	-	-	NO HAY BULTO	
	3	0,70	0,80	0,56	TUMOR MAMARIO	
	4	-	-	-	NO HAY BULTO	
	5	-	-	-	NO HAY BULTO	



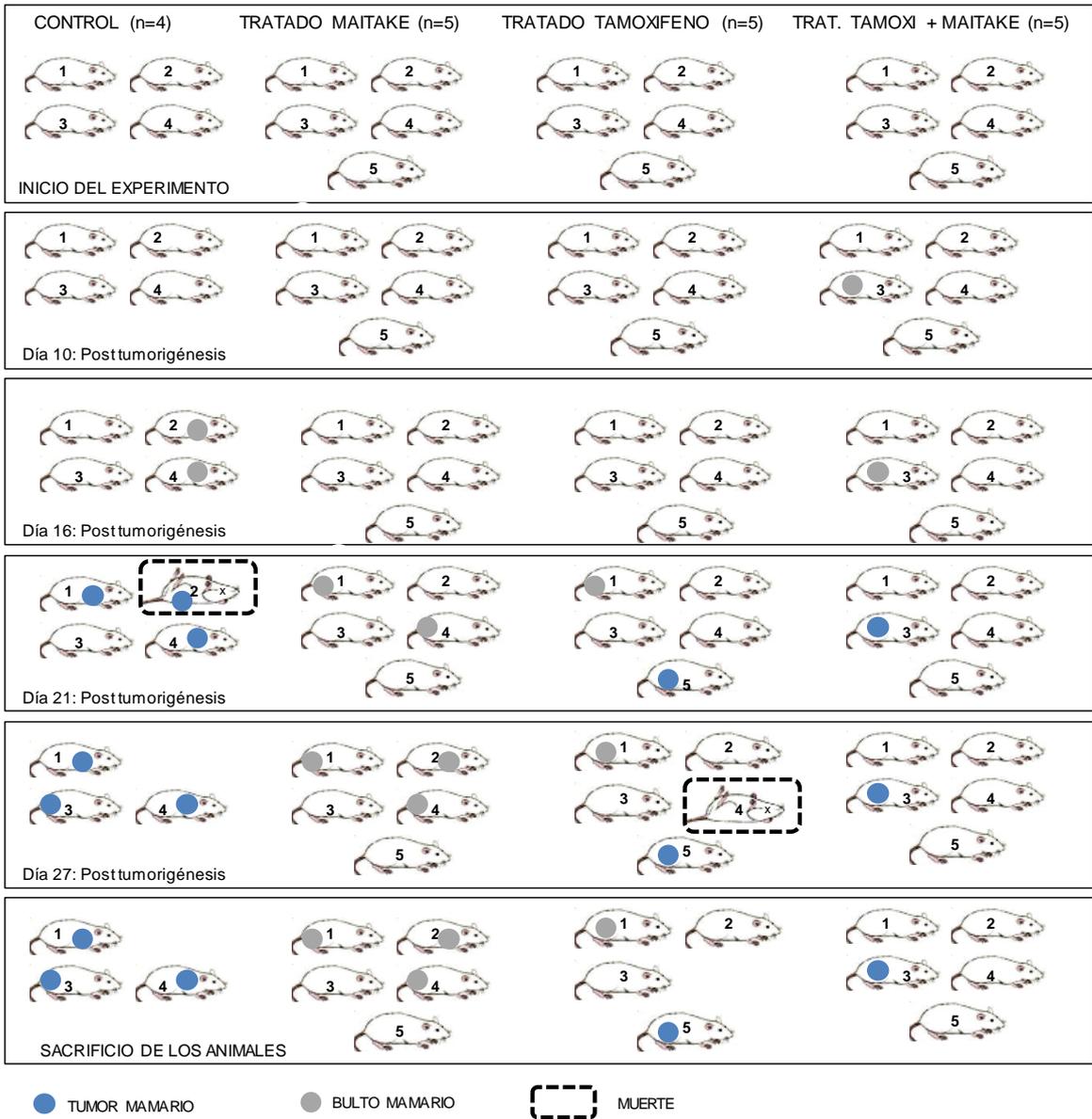
**Figura 91.4.** Efecto de Maitake y Tamoxifeno en el desarrollo tumoral. Áreas  $\leq 0,25 \text{ cm}^2$  se consideraron bultos mamarios, y áreas  $\geq 0,25 \text{ cm}^2$  tumores mamarios. Estos corresponden a hembras BALB/c. Los tumores fueron removidos durante la autopsia de los ratones.

El crecimiento tumoral se esquematiza en las Fig. 92.4 a 93.4. Los resultados obtenidos sugieren que los primeros animales en desarrollar tumor mamario fueron los del grupo Maitake + Tamoxifeno (día 10 post tumorigénesis), aunque ese porcentaje se mantuvo constante hasta el final del ensayo (sacrificio) (Fig. 93.4, línea violeta). Por el contrario,

los ratones que más tardaron en desarrollar tumor mamario fueron los tratados con Tamoxifeno (día 21 post tumorigénesis), aunque el porcentaje inicial de 20% creció a 25% al finalizar el ensayo (Fig. 93.4, línea roja). Cabe destacar que todos los animales del Control desarrollaron tumor mamario (Fig. 93.4, línea verde), pero ningún ratón Tratado con Maitake PRO4X presentó tumor mamario, sino bultos (Fig. 93.4, línea celeste).



**Figura 92.4.** *Tiempo de aparición tumoral.* Los animales fueron tratados preventivamente por 50 días con Maitake PRO4X y Tamoxifeno para posteriormente inducirles tumorigénesis mamaria. El gráfico indica que al finalizar el ensayo, el 100% de los animales Control habían desarrollado tumor mamario, mientras que el porcentaje fue 0% en el grupo Maitake PRO4X



**Figura 93.4. Crecimiento tumoral mamario.** El esquema ilustra el número de ratones con bultos y tumores mamarios, el tiempo de aparición de los mismos, y el número de muertes tras la inducción tumorigénica. Los animales fueron tratados preventivamente durante 50 días con Maitake y Tamoxifeno.

El aspecto macroscópico *in vivo* de bultos y tumores mamarios *in situ* en el último día del ensayo (día 77, sacrificio) se consigna en la Fig. 94.4.

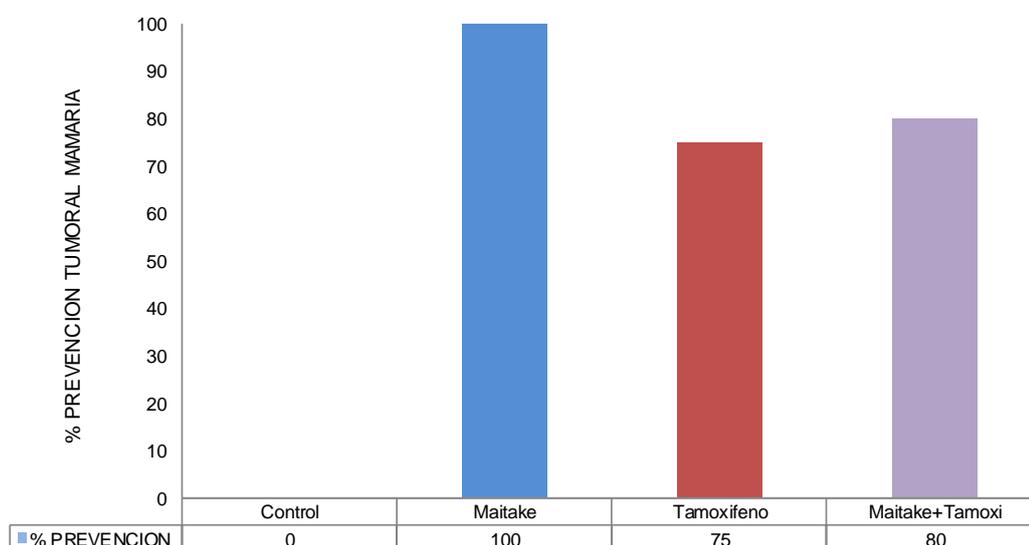


**Figura 94.4.** *Bultos y tumores mamarios in vivo e in situ.* Los mismos corresponden al último día del ensayo (día 27 post tumorigénesis). La flecha roja señala tumores mamarios abdominales ( $\geq 0,25 \text{ cm}^2$ ), mientras que la amarilla indica bultos mamarios ( $\leq 0,25 \text{ cm}^2$ ). Cabe destacar que el 100% de los animales del Control desarrolló tumor mamario, mientras que ese porcentaje fue 0% para el grupo Maitake PRO4X.

Los resultados de las Fig. 92.4 a 94.4, permiten establecer los valores de prevención tumoral para cada una de las condiciones ensayadas, resumidos en la Tabla 36.4 y Fig. 95.4. Tales resultados sugieren que el tratamiento con Maitake bloqueó la aparición tumoral en todos los animales de dicha condición. Mientras que la inhibición de tumorigénesis fue 0% en el grupo Control, 75% para Tamoxifeno, y 80% para Tamoxifeno + Maitake.

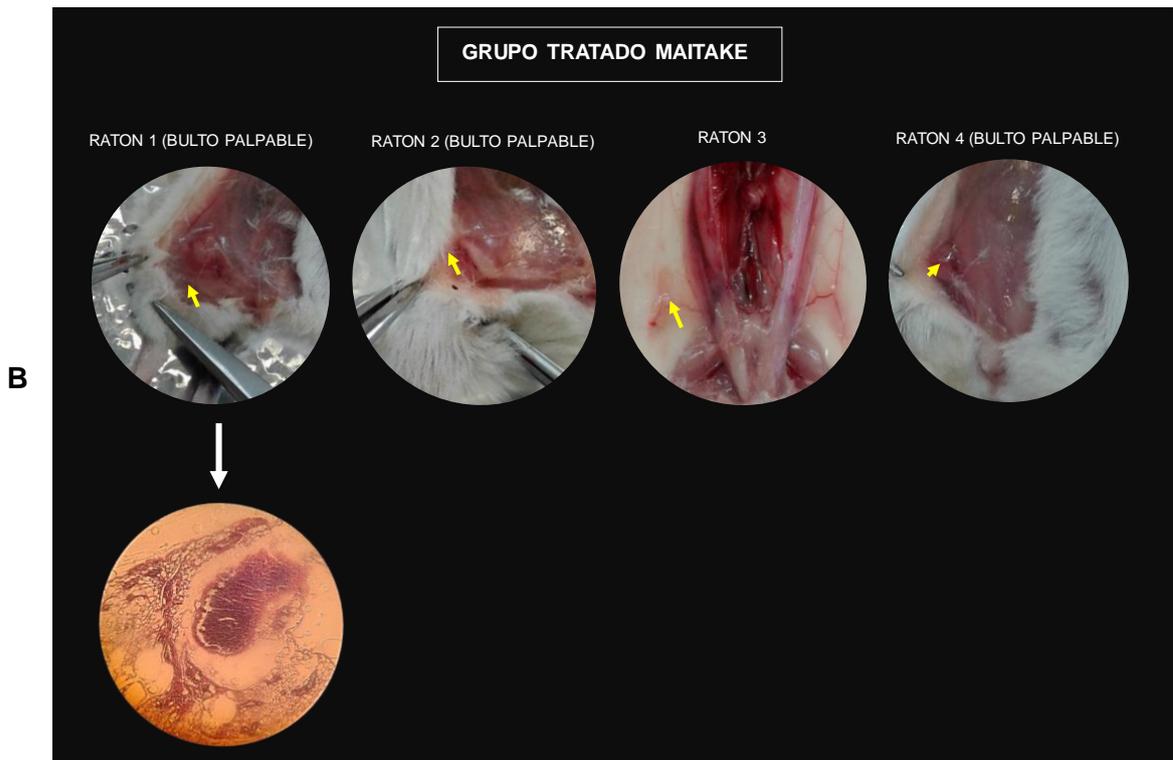
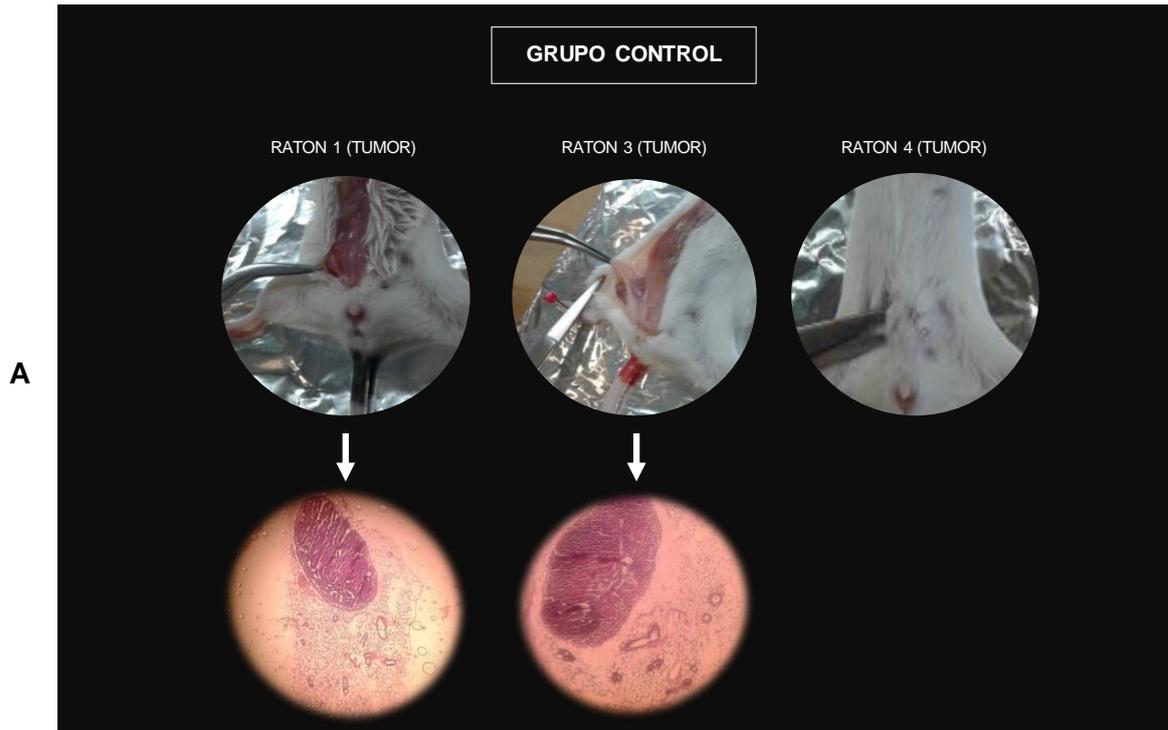
**Tabla 36.4.** *Prevención tumoral mamaria.* La misma corresponde a hembras BALB/c tratadas durante 50 días con Maitake y Tamoxifeno. Los resultados indicados corresponden al último día del ensayo (día 27 post tumorigénesis, sacrificio). Se observa que no hubo ninguna prevención tumoral para el grupo Control (0%), y que la misma fue 100% para el grupo Maitake PRO4X.

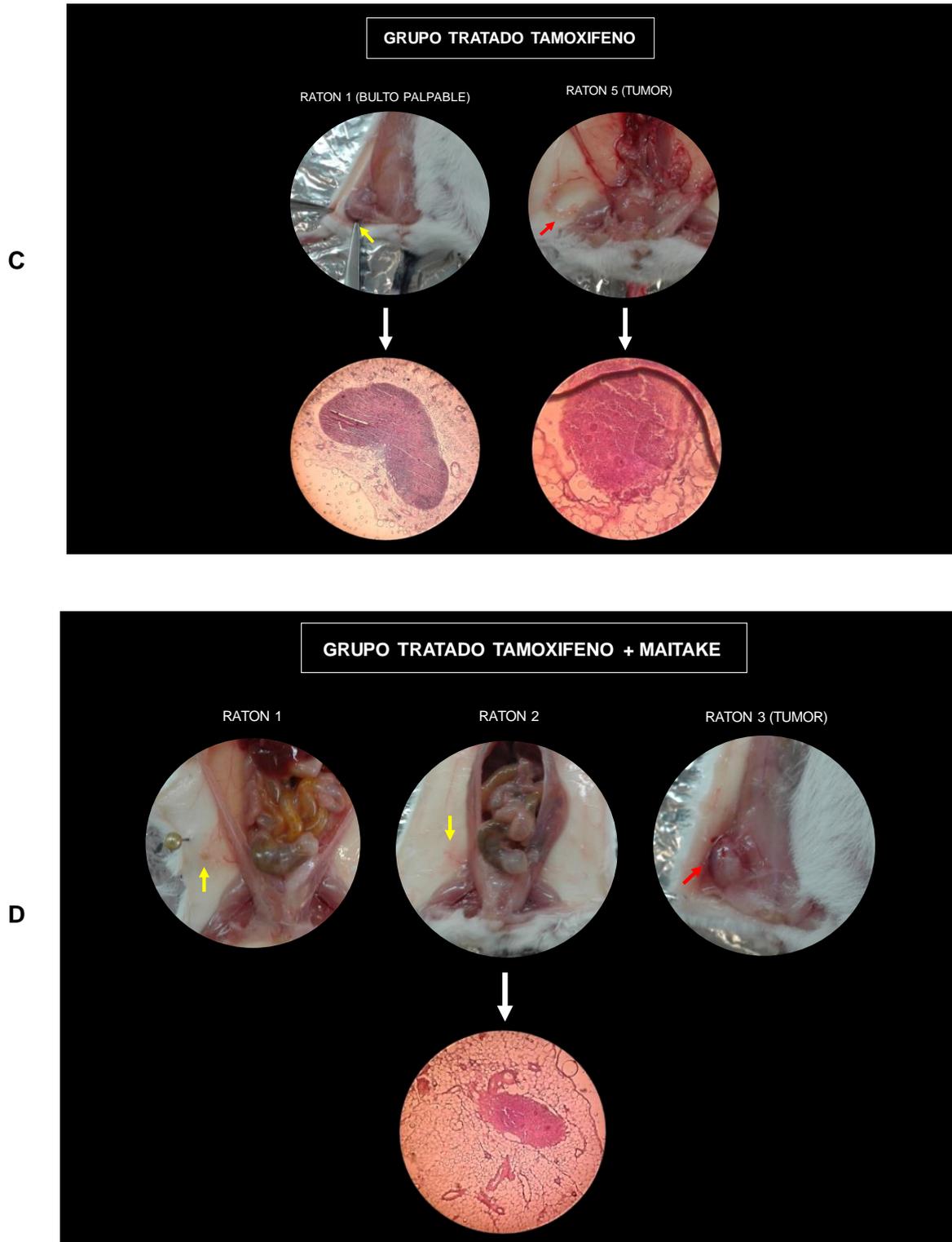
	% PREVENCIÓN TUMORAL	N° DE RATONES CON TUMOR MAMARIO
<b>GRUPO CONTROL</b>	0%	3/3
<b>TRATADO MAITAKE</b>	100%	0/5
<b>TRATADO TAMOXIFENO</b>	75%	1/4
<b>TRATADO MAITAKE + TAMOXIFENO</b>	80%	1/5



**Figura 95.4.** *Efecto de Maitake y Tamoxifeno en la prevención tumoral mamaria.* Los resultados corresponden al último día del ensayo (día 77, sacrificio). Se observa que la prevención fue del 100% para los animales del grupo Tratado con Maitake PRO4X y de 0% para los animales del grupo Control.

**Examen macroscópico del tumor mamario.** El registro de los tumores mamarios *in situ*, efectuado durante la autopsia de los ratones se indica en la Fig. 92.4. Los resultados microscópicos obtenidos sugieren similitud histológica entre los tumores de los grupos Control y Tamoxifeno visualizados como una masa sólida y uniforme de células tumorales. Mientras que el grupo Maitake, exhibió bultos mamarios de aspecto encapsulado, representando un aislamiento de las células tumorales.



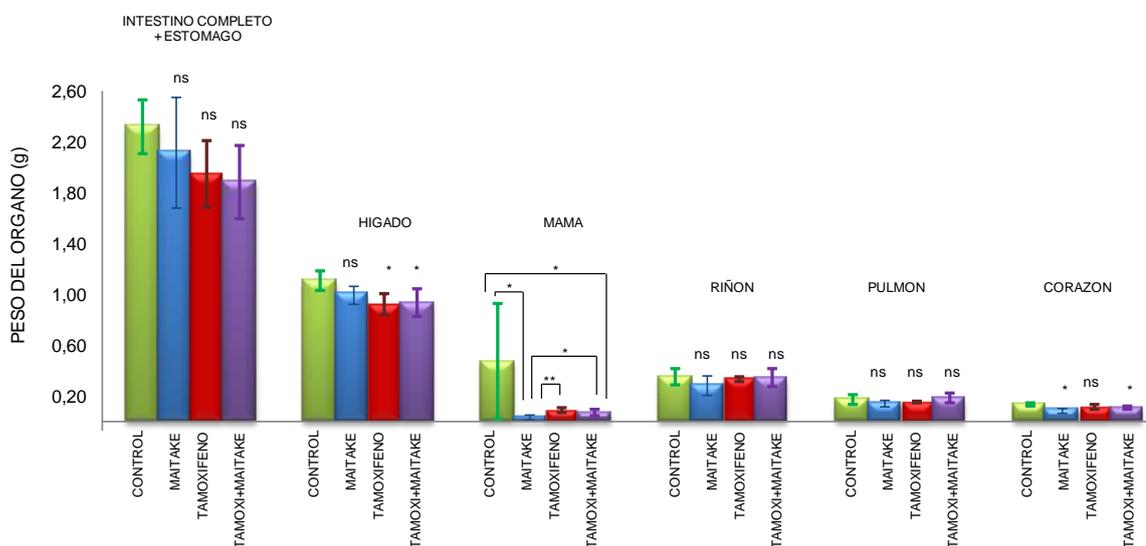


**Figura 92.4.** *Aspecto macroscópico e histológico tumoral.* El mismo corresponde a hembras BALB/c de las condiciones experimentales ensayadas: **A)** Control, **B)** Maitake, **C)** Tamoxifeno y **D)** Tamoxifeno + Maitake. Las fotografías superiores ilustran la región mamaria abdominal durante la auptosia de los animales. Las flechas rojas detallan la ubicación de tumores mamarios, mientras que los bultos se indican con flechas amarillas. Las microfotografías de la parte inferior (indicadas con flechas blancas) corresponden al tejido mamario teñido con H-E (X10).

**Estudio de los órganos internos.** El efecto de Maitake y Tamoxifeno en el peso de los órganos internos (mama, hígado, pulmón, corazón, riñón, intestino completo y estómago) se indica en la Tabla 37.4 y Fig. 93.4. Los resultados obtenidos sugieren diferencias significativas de peso en glándula mamaria, hígado y corazón ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 37.4.** *Peso de órganos internos.* El mismo corresponde a hembras BALB/c. El peso se registró durante la autopsia de los animales. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos.

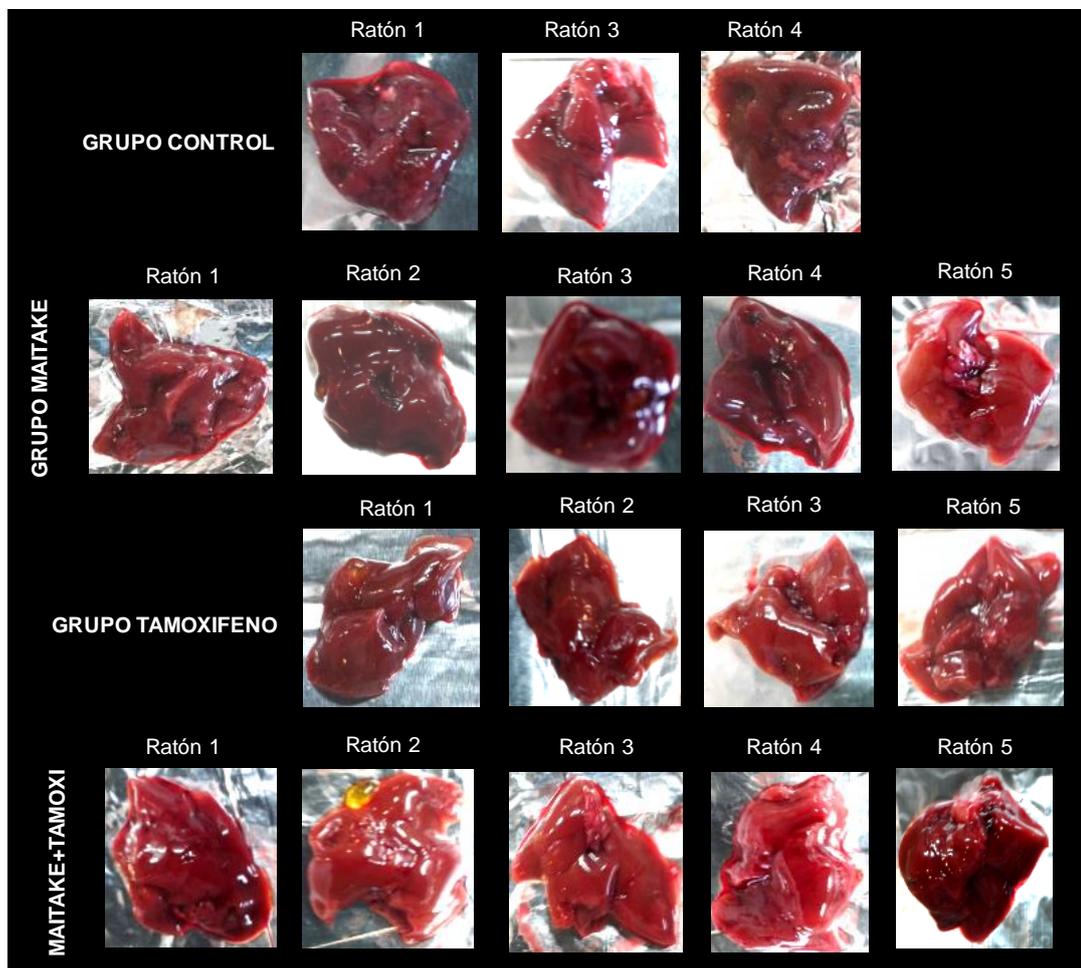
ORGANO	PESO MEDIO $\pm$ DS (g)			
	CONTROL	MAITAKE	TAMOXIFENO	MAITAKE + TAMOXIFENO
GLANDULA MAMARIA	0,47 $\pm$ 0,46	0,04 $\pm$ 0,02 (* vs CONTROL)	0,09 $\pm$ 0,02 (** vs MAITAKE)	0,07 $\pm$ 0,02 (* vs CONTROL) (* vs MAITAKE)
HIGADO	1,11 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,08 (* vs CONTROL)	0,94 $\pm$ 0,11 (* vs CONTROL)
PULMON	0,18 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,03
CORAZON	0,13 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02 (* vs CONTROL)	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01 (* vs CONTROL)
RIÑONES	0,35 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,07
INTESTINO COMPLETO + ESTOMAGO	2,32 $\pm$ 0,21	2,12 $\pm$ 0,44	1,95 $\pm$ 0,26	1,89 $\pm$ 0,29



**Figura 93.4.** *Peso de órganos internos.* Los mismos corresponden a hembras BALB/c tratadas preventivamente con Maitake y Tamoxifeno. El peso se registró durante la autopsia de los animales. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos. Se observaron diferencias significativas ( $*p \leq 0,05$ ), muy significativas ( $**p \leq 0,01$ ), y no significativas (ns,  $p > 0,05$ ) entre los distintos grupos experimentales.

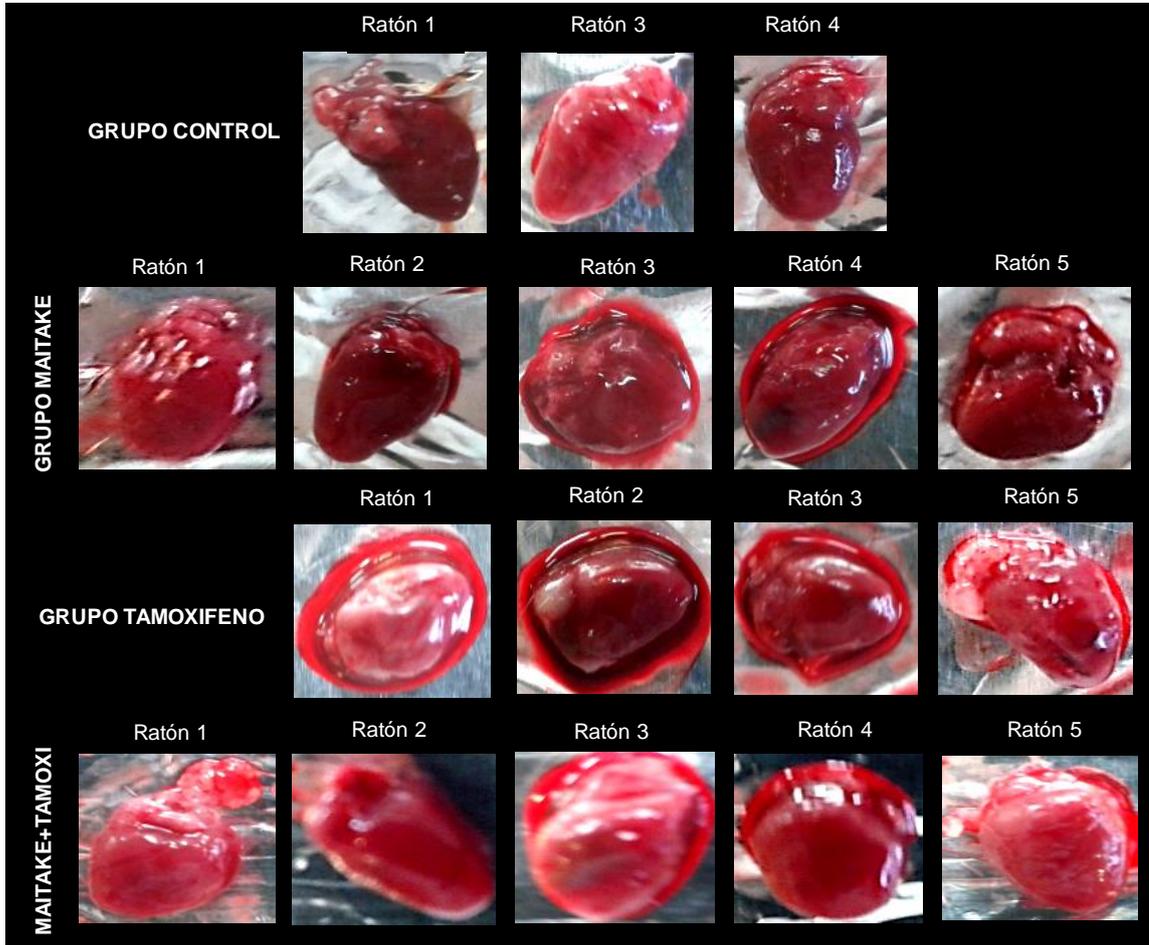
I) Glándula mamaria. En los animales Tratados tuvo un peso significativamente menor ( $*p \leq 0,05$ ) al Control. Por otra parte, la glándula del grupo Tamoxifeno tuvo un peso significativamente mayor ( $0,09 \pm 0,02$ , con  $**p \leq 0,01$ ) al de Maitake ( $0,04 \pm 0,02$ ). Comparando los grupos Maitake y Maitake + Tamoxifeno, hemos observado la glándula mamaria de este último presentó un peso significativamente mayor ( $0,07 \pm 0,02$ , con  $*p \leq 0,05$ ) al de Maitake ( $0,04 \pm 0,02$ ) (Fig. 93.4).

II) Hígado. No se observaron diferencias significativas entre los grupos Maitake y Control (ns,  $p > 0,05$ ). Sin embargo, los grupos Tamoxifeno (Tamoxifeno y Maitake + Tamoxifeno) presentaron un peso significativamente menor ( $*p \leq 0,05$ ) al Control (Fig. 93.4). Por otra parte, se observó mayor palidez hepática en el grupo Tratado con Tamoxifeno respecto de los demás grupos experimentales (Fig. 94.4).



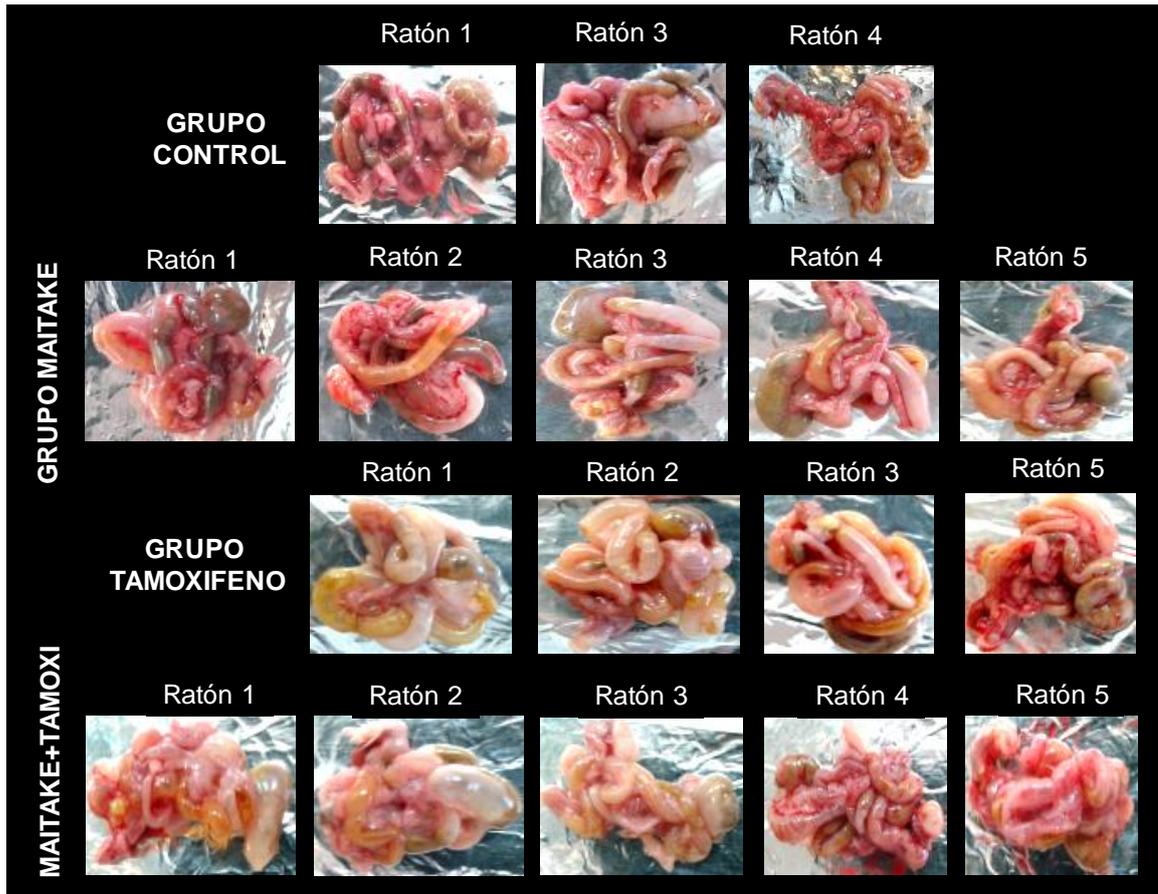
**Figura 94.4.** *Aspecto macroscópico hepático.* El mismo corresponde a hembras BALB/c tratadas preventivamente con Maitake y Tamoxifeno. El peso del órgano se registró durante la autopsia de los animales. El examen macroscópico ex vivo reveló diferencias en la coloración hepática en el grupo Tamoxifeno respecto de los demás grupos experimentales.

III) Corazón. Hemos observado que los grupos Maitake (Maitake y Maitake + Tamoxifeno), presentaron un peso significativamente menor al Control ( $*p \leq 0,05$ ). Mientras que el grupo Tamoxifeno no presentó diferencias significativas con el Control (ns,  $p > 0,05$ ) (Fig. 93.4). El examen macroscópico no indicó diferencias evidentes de estructura y coloración del órganos entre los distintos grupos experimentales (Fig. 95.4).



**Figura 95.4.** *Aspecto macroscópico cardíaco.* El mismo corresponde a hembras BALB/c. El peso del órgano se registró durante la autopsia de los animales. El examen macroscópico ex vivo no reveló diferencias en la coloración del órgano entre los grupos experimentales.

IV) Organos gastrointestinales. No hallamos diferencias significativas de peso en los distintos grupos experimentales. No obstante, los intestinos de los animales tratados con Tamoxifeno (grupos Tamoxifeno y Maitake + Tamoxifeno) presentaban aspecto voluminoso, se observaban dilatados y llenos de gas, con marcada ictericia, la cual fue menos exacerbada en el grupo Maitake + Tamoxifeno (Fig. 96.4).



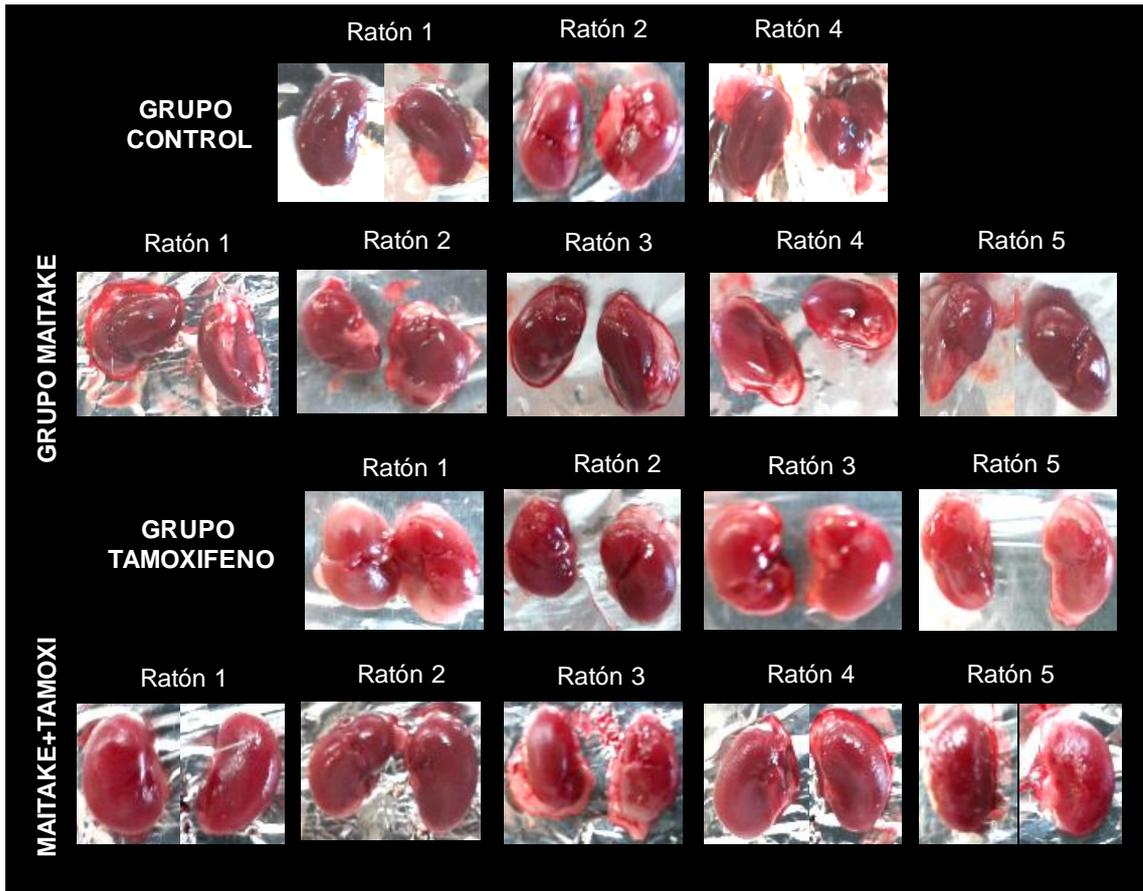
**Figura 96.4.** *Aspecto macroscópico intestinal.* El mismo corresponde a hembras BALB/c. El peso se registró durante la autopsia de los animales. El examen macroscópico *ex vivo* reveló diferencias de aspecto y coloración entre las distintas condiciones experimentales.

V) Pulmón. No hallamos diferencias significativas de peso y aspecto macroscópico *ex vivo* en pulmón de los distintos grupos experimentales. El registro fotográfico se consigna en la Fig. 97.4.



**Figura 97.4.** *Aspecto macroscópico pulmonar.* El mismo corresponde a hembras BALB/c. El peso se registró durante la autopsia de los animales. El examen macroscópico *ex vivo* no reveló diferencias de aspecto y coloración entre las distintas condiciones experimentales.

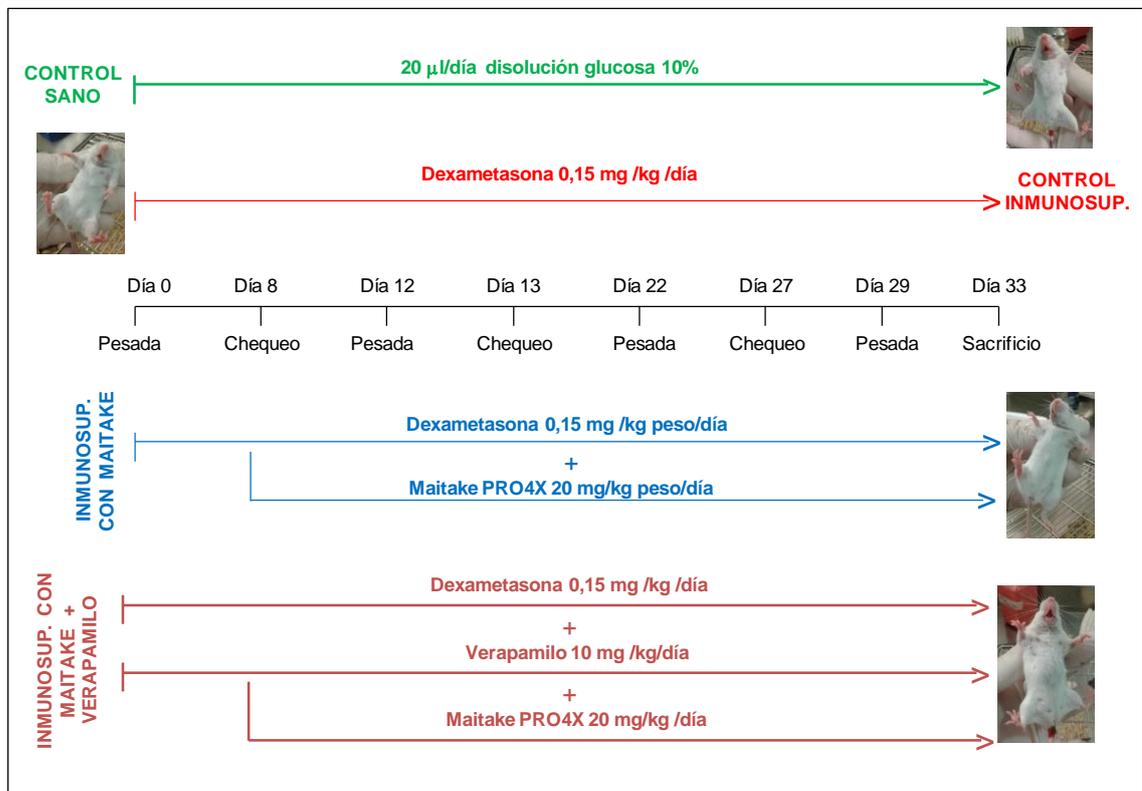
VI) Riñones. No hallamos diferencias significativas de peso y aspecto macroscópico *ex vivo* entre los riñones de los distintos grupos experimentales. El registro fotográfico se consigna en la Fig. 98.4.



**Figura 98.4.** *Aspecto macroscópico renal.* El mismo corresponde a hembras BALB/c. El peso se registró durante la autopsia de los animales. El examen macroscópico *ex vivo* no reveló diferencias de aspecto y coloración entre las distintas condiciones experimentales.

### IV.3.7 Inmunorestauración inducida por Maitake

Se investigó la capacidad de Maitake de recuperar poblaciones celulares inmunes en un modelo murino de inmunosupresión. Para ello 29 ratones hembra BALB/c sanos, de 6-8 semanas de edad con un peso comprendido entre 15 y 21 g, fueron divididos aleatoriamente en cinco grupos: Control Sano (n=5), Control Inmunosuprimido (n=8), grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake PRO4X (n=8), grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake PRO4X + Inhibidor farmacológico de Calcio (n=5). Se indujo inmunosupresión farmacológica por administración diaria de Dexametasona 0,15 mg/kg peso, y bloqueo farmacológico de calcio por administración de Verapamilo 10 mg/kg peso/día. Al octavo día de inmunosupresión, se inició la administración diaria de Maitake en dosis 20 mg/kg (6 mg/kg/día de  $\beta$ -glucano). Al finalizar el experimento, se procedió al sacrificio de los animales por asfixia con CO<sub>2</sub> en cámara de eutanasia (Fig. 95.4).



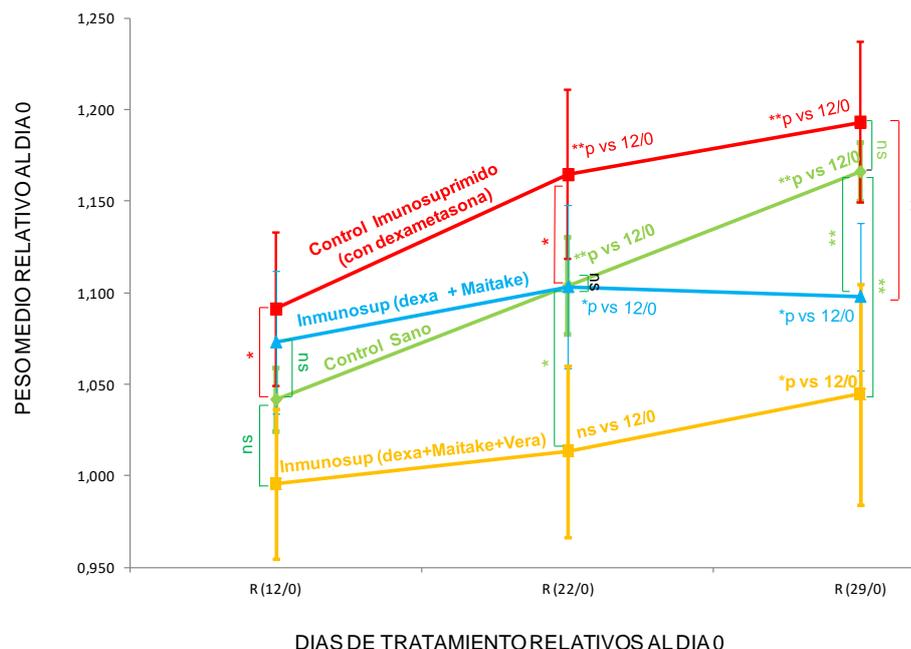
**Figura 95.4.** Diseño experimental de inmunorestauración. El mismo permitió estudiar los efectos *in vivo* de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X en el recupero de poblaciones linfocitarias específicas. Las condiciones experimentales incluyeron hembras BALB/c inmunosuprimidas y tratadas con un bloqueante farmacológico de calcio. El ensayo duró 4 semanas. El sacrificio se realizó por asfixia con CO<sub>2</sub> en cámara de eutanasia.

**Mortalidad y toxicidad.** Tras cuatro semanas de tratamiento experimental, observamos ausencia de mortalidad, ya que ningún animal pereció. Tampoco registramos signos clínicos de enfermedad o toxicidad evidente resultantes del tratamiento inmunosupresor y/o bloqueo cálcico.

**Peso corporal.** Los resultados de peso corporal medio relativo al día 0 de hembras BALB/c a los días 12, 22 y 29 del ensayo se indican en la Tabla 38.4 y Fig. 96.4. Tales resultados sugieren que los grupos Control Sano e Inmunosuprimido con Dexametasona presentaron incrementos muy significativo de peso (\*\*p<0,01 vs 12/0) con el transcurso del tratamiento respecto del inicio del ensayo (Fig. 96.4, líneas verde y roja). No obstante, el grupo Control Inmunosuprimido tuvo un peso significativamente mayor al del Control Sano (\*p<0,05). Por su parte, el grupo Maitake Inmunosuprimido mostró un efecto regulador de peso, con descensos significativos respecto del inicio del ensayo (\*p<0,05), y con peso significativamente menor al de ambos Controles al finalizar el ensayo. Mientras que el grupo Inmunosuprimido Maitake + Verapamilo mostro descensos significativos de peso respecto del Control Sano (Fig. 96.4, línea amarilla).

**Tabla 38.4. Peso corporal.** Se indica el peso medio relativo al día 0 de hembras BALB/c a los días 12, 22 y 29 del tratamiento oral con de Maitake PRO4X durante un estado de depleción inmunológica y bloqueo cálcico. Se consignaron las diferencias con significancia estadísticas (\*p<0,05 y \*\*p<0,01) entre las condiciones experimentales.

DÍAS DE TRATAMIENTO	CONTROL SANO (CS)	CONTROL INMUNOSUPRIMIDO (CI)	INMUNOSUP TRAT SOLO MAITAKE (TM)	INMUNOSUP TRAT MAITAKE + VERAP (TM+V)
DIA 12/0	1,042 ± 0,017	1,091 ± 0,042 (* vs CS)	1,073 ± 0,039	0,996 ± 0,041 (** vs CI) (** vs TM)
DIA 22/0	1,104 ± 0,027 (** vs D 12/0)	1,164 ± 0,046 (** vs D 12/0) (* vs CS)	1,103 ± 0,045 (* vs D 12/0) (* vs CI)	1,013 ± 0,047 (* vs CS) (** vs CI) (* vs TM)
DIA 29/0	1,166 ± 0,016 (** vs D 12/0)	1,193 ± 0,044 (** vs D 12/0)	1,098 ± 0,040 (* vs D 12/0) (** vs CS) (** vs CI)	1,045 ± 0,060 (* vs D 12/0) (** vs CS) (** vs CI) (* vs TM)

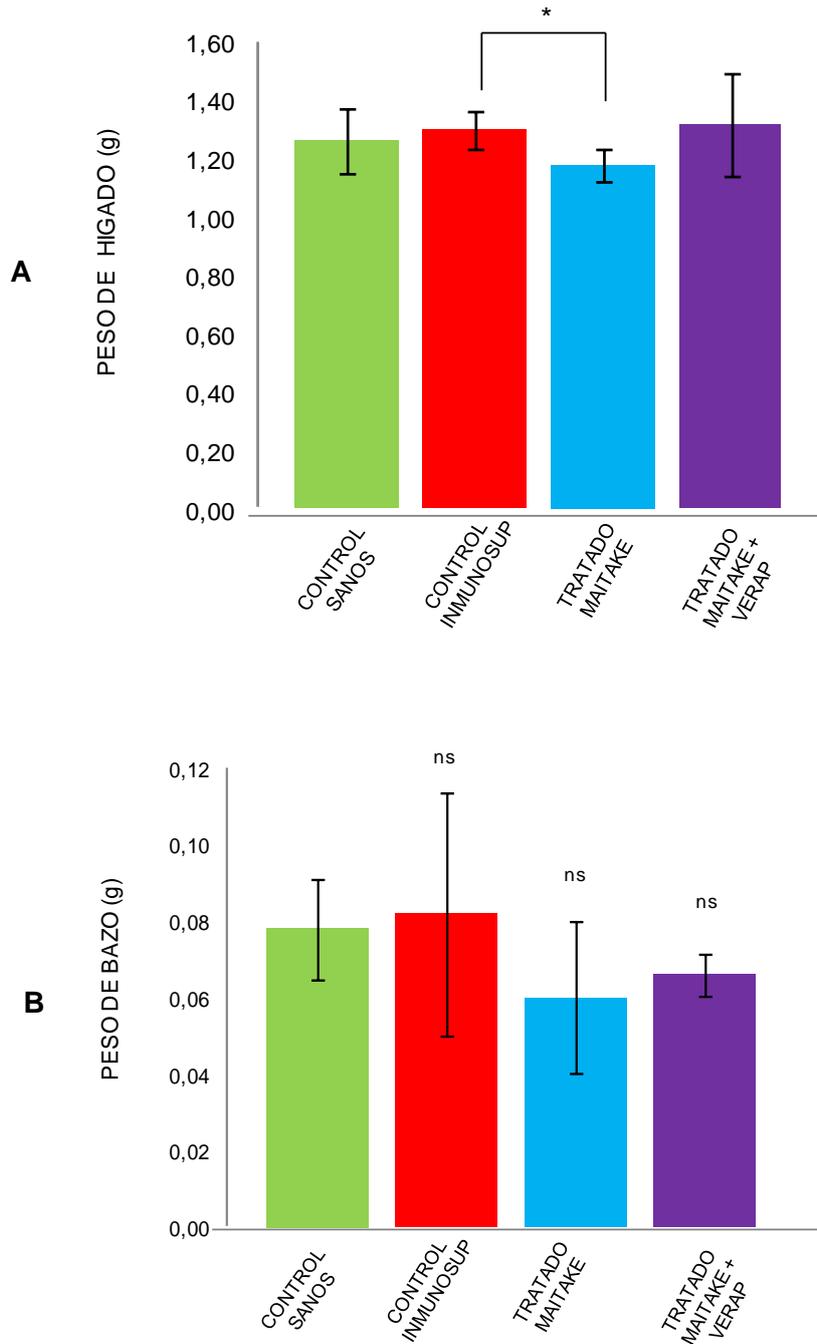


**Figura 96.4.** Efecto de Maitake PRO4X sobre el peso corporal. Se estudio el efecto en hembras BALB/c en un estado de depleción inmunológica y bloqueo cálcico. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron como peso medio relativo al del día 0. Se observaron diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) y muy significativas ( $**p < 0,01$ ) de peso.

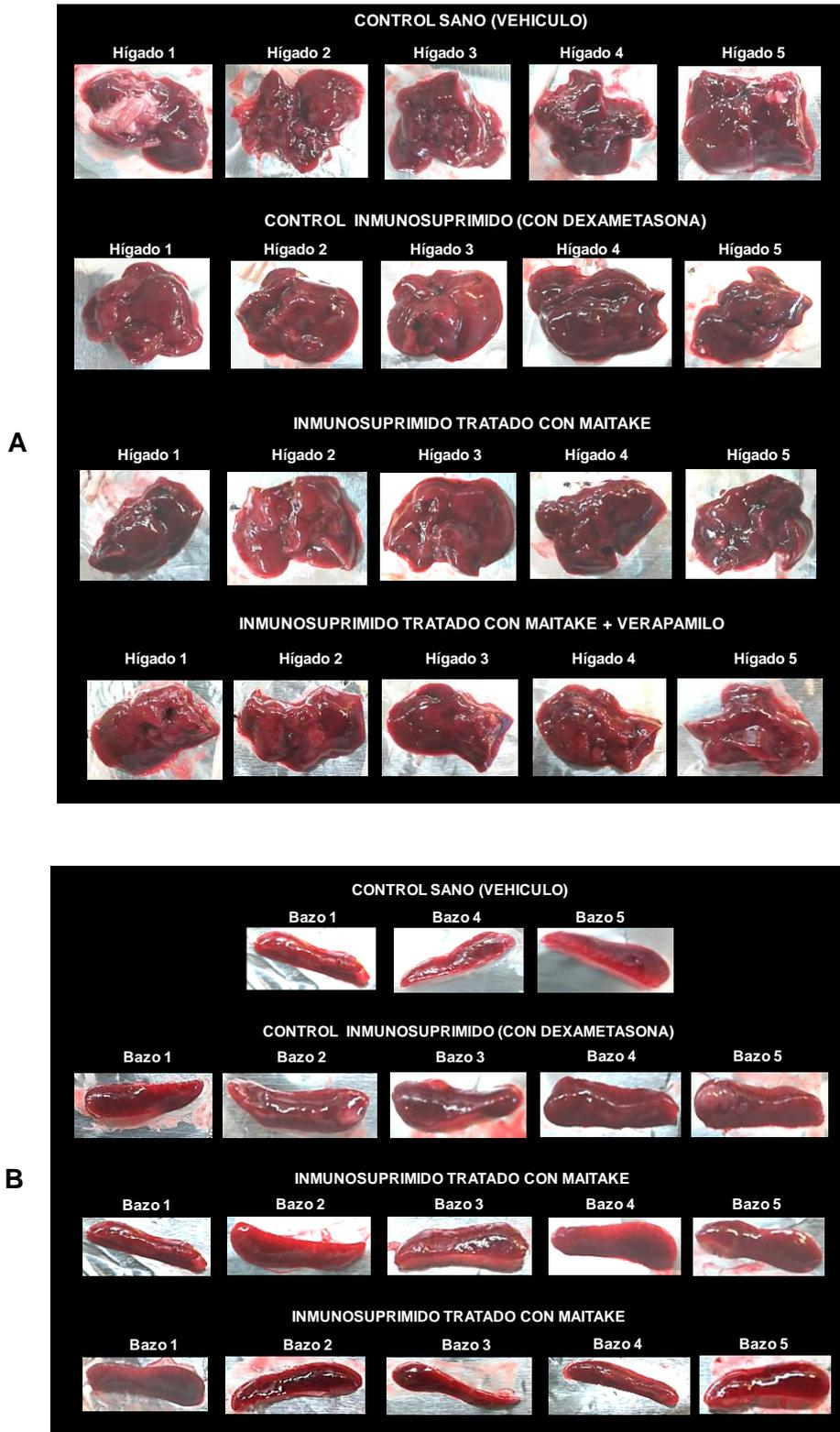
**Examen macroscópico hepático y esplénico.** Los resultados del tratamiento inmunorestaurador con Maitake PRO4X sobre el peso y el aspecto macroscópico hepático y esplénico, se indican en la Tabla 39.4 y las Fig. 97.4 a 98.4. Los resultados obtenidos sugieren que Maitake redujo significativamente ( $*p < 0,05$ ) el peso hepático de animales inmunosuprimidos ( $1,18 \pm 0,05$ ) respecto del Control Inmunosuprimido ( $1,30 \pm 0,07$ ) (Fig. 97.4-A). Mientras que el peso esplénico no presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 97.4-B). Macroscópicamente, no observamos diferencias evidentes de estructura y coloración entre ambos órganos.

**Tabla 39.4.** Peso medio hepático y esplénico. El mismo pertenece a hembras BALB/c al finalizar el tratamiento inmunorestaurador con Maitake PRO4X. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos. Se observaron diferencias significativas ( $*p \leq 0,05$ ) y muy significativas ( $**p \leq 0,01$ ) entre los grupos experimentales.

ORGANO	PESO MEDIO $\pm$ DS			
	CONT SANO	CONTROL IMMUNOSUP	TRATADO MAITAKE	TRAT MAIT + VERAPAMILO
HIGADO	1,26 $\pm$ 0,11	1,30 $\pm$ 0,07	1,18 $\pm$ 0,05 (* $p < 0,05$ vs C. Inmunosup)	1,32 $\pm$ 0,18
BAZO	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01



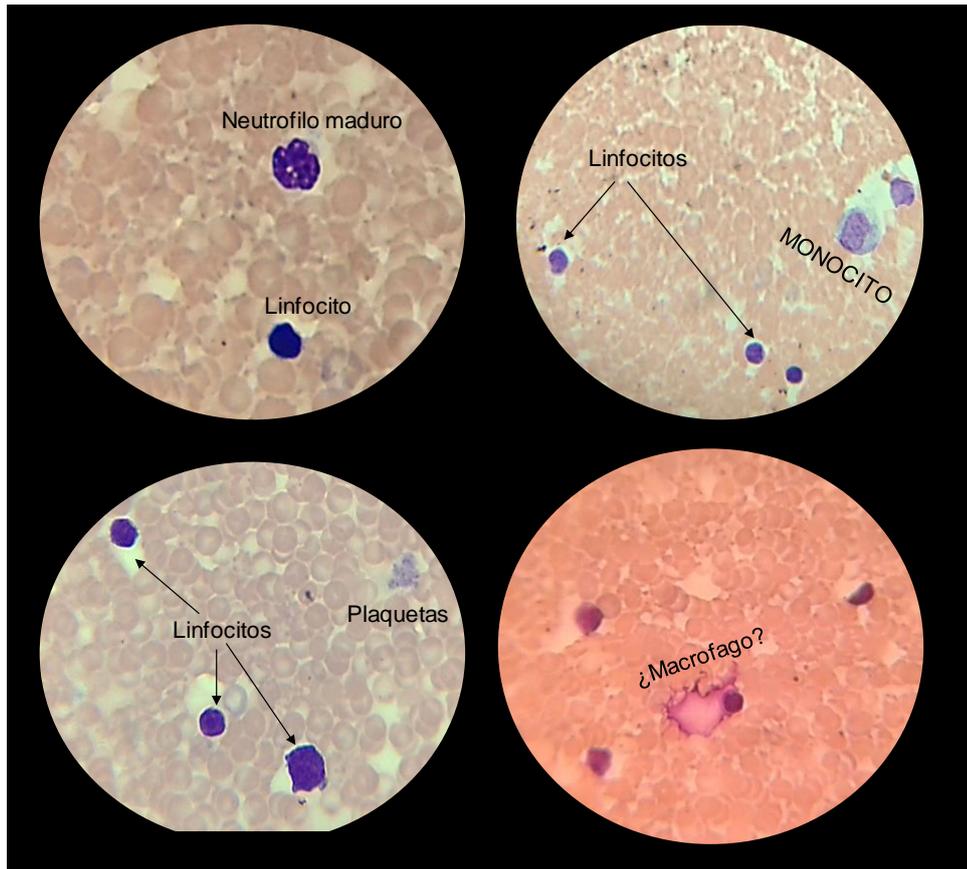
**Figura 97.4.** Efecto de Maitake PRO4X sobre el peso hepático y esplénico. El mismo corresponde a hembras BALB/c en un estado de depleción inmunológica y bloqueo cálcico. Los resultados, correspondientes a media  $\pm$  2 desvíos estándar, se expresaron en gramos. **A)** Peso hepático, el cual presentó disminución significativa ( $*p < 0,05$ ) en los grupos experimentales. **B)** Peso esplénico, el cual no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos experimentales.



**Figura 98.4.** Aspecto macroscópico ex vivo hepático y esplénico. El mismo corresponde a hembras BALB/c luego del tratamiento con Maitake PRO4X en un estado de inmunosupresión y bloqueo cálcico. Los órganos fueron removidos durante la autopsia de los animales, tras cuatro semanas de tratamiento inmunorestaurador.

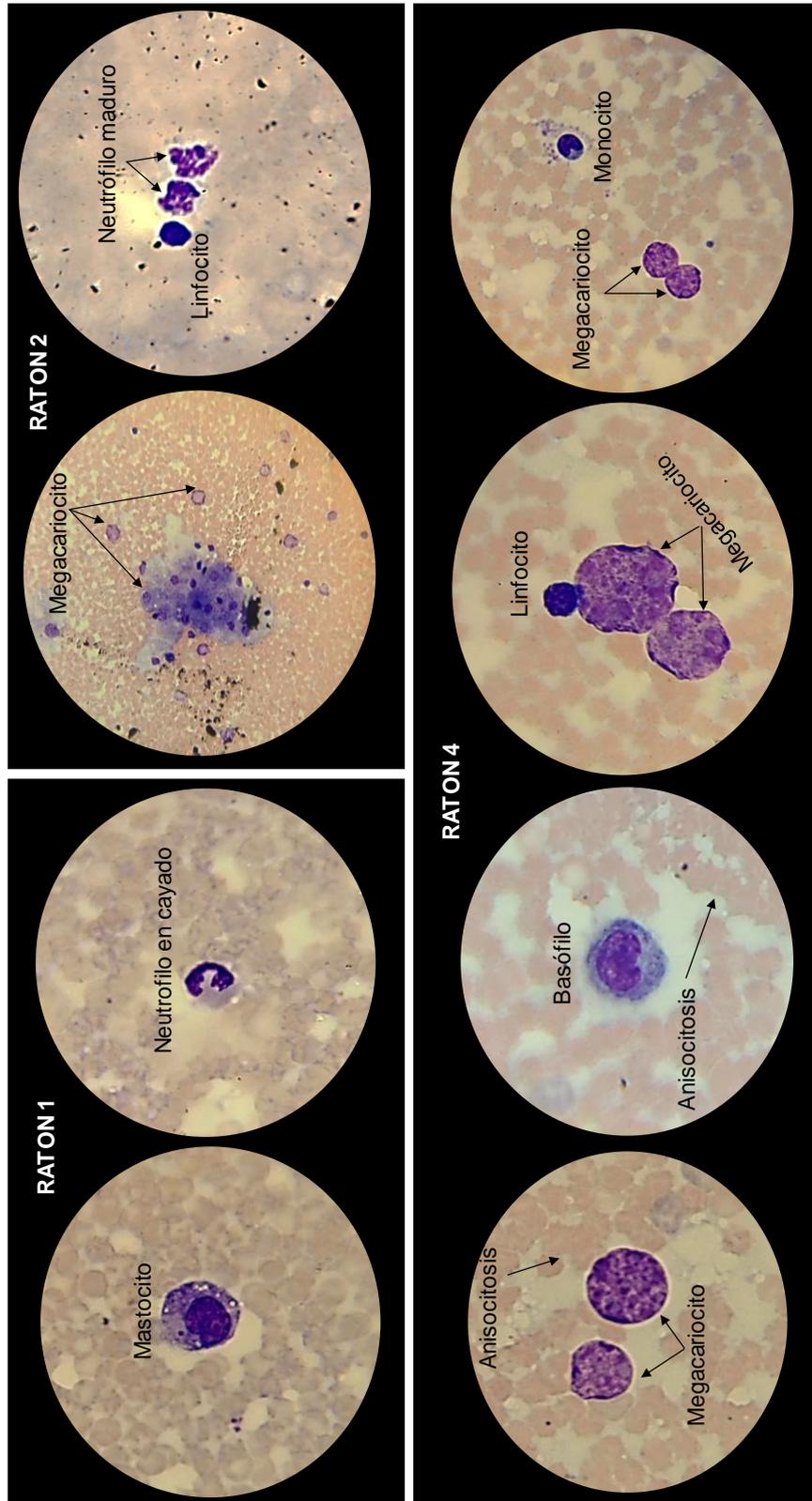
**Análisis microscópico sanguíneo.** Se realizaron observaciones microscópicas de extendidos de sangre periférica correspondientes a cada una de las condiciones experimentales. La sangre fue colectada durante la autopsia de los animales y coloreada con May Grünwald-Giemsa.

Grupo Control Sano. Se observaron células normales, plaquetas agrupadas, linfocitos, neutrófilos y monocitos. No se registraron células inmaduras (Fig. 99.4).



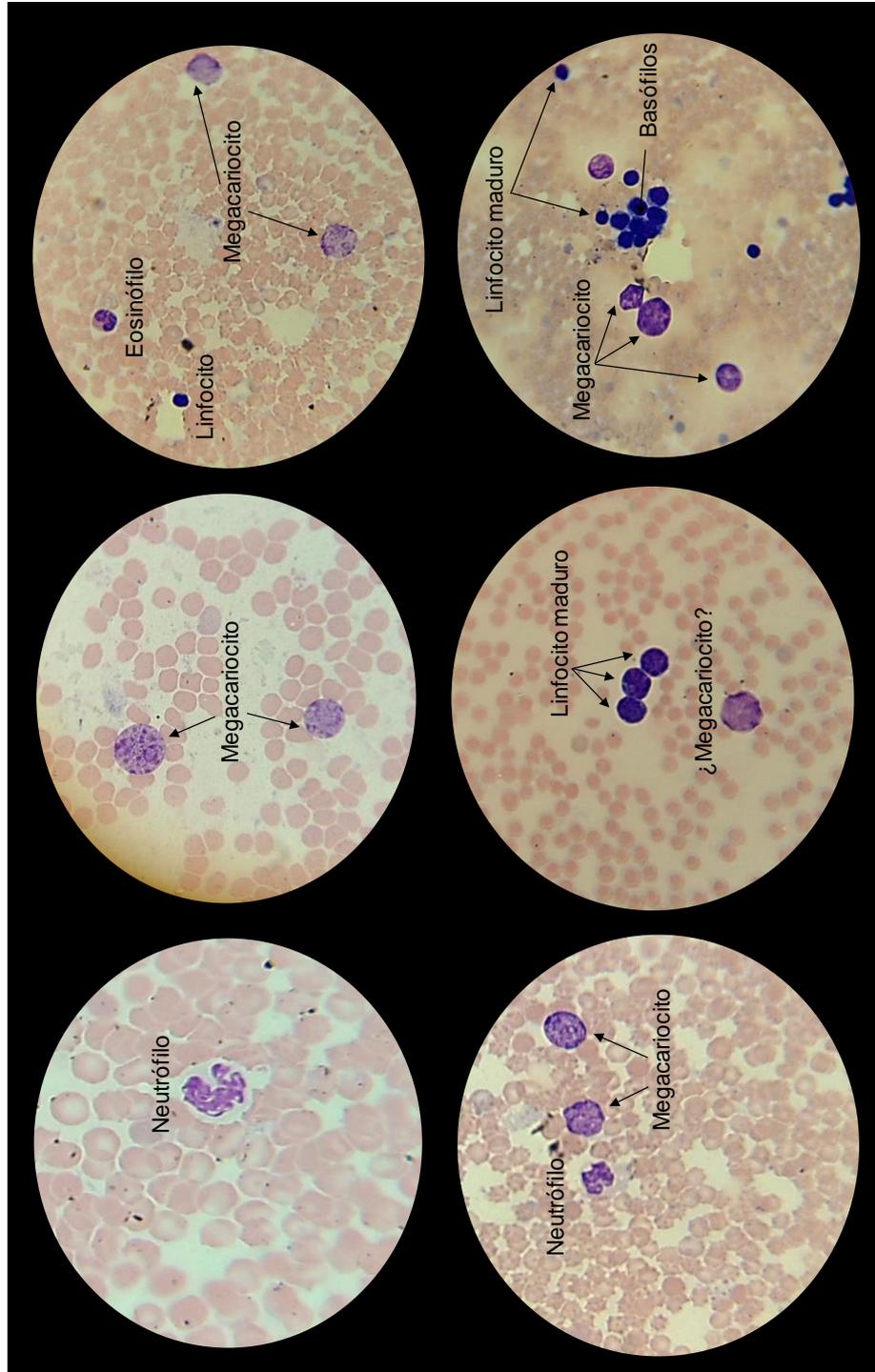
**Figura 99.4.** *Extendido sanguíneo grupo Control sano.* Las microfotografías (May Grünwald-Giemsa x40) corresponden al ratón N° 3 de la condición experimental. Se observaron glóbulos rojos intactos, linfocitos, plaquetas agrupadas, monocitos, neutrófilos maduros y un aparente macrófago en posible proceso de fagocitosis (inferior derecha).

Grupo Control Inmunosuprimido. Presentó abundantes células de gran tamaño, con núcleo prominente, citoplasma pequeño y vacuolado (compatibles con megacariocitos). Mientras que el extendido sanguíneo del ratón N°2 presentó megacariocitos agrupados en masa (Fig. 100.4 – superior izquierda), el extendido del ratón N°4 exhibió monocitos con cromatina bien condensada y megacariocitos en aparente proceso de división celular (Fig. 100.4 - inferior derecha). Se observaron glóbulos rojos de tamaño desigual (anisocitosis).



**Figura 100.4.** *Extendido sanguíneo grupo Control Inmunosuprimido.* Las microfotografías (May Grünwald-Giemsa x40) indican la presencia de células gigantes con enorme núcleo condensado, prácticamente sin citoplasma compatibles con megacariocitos.

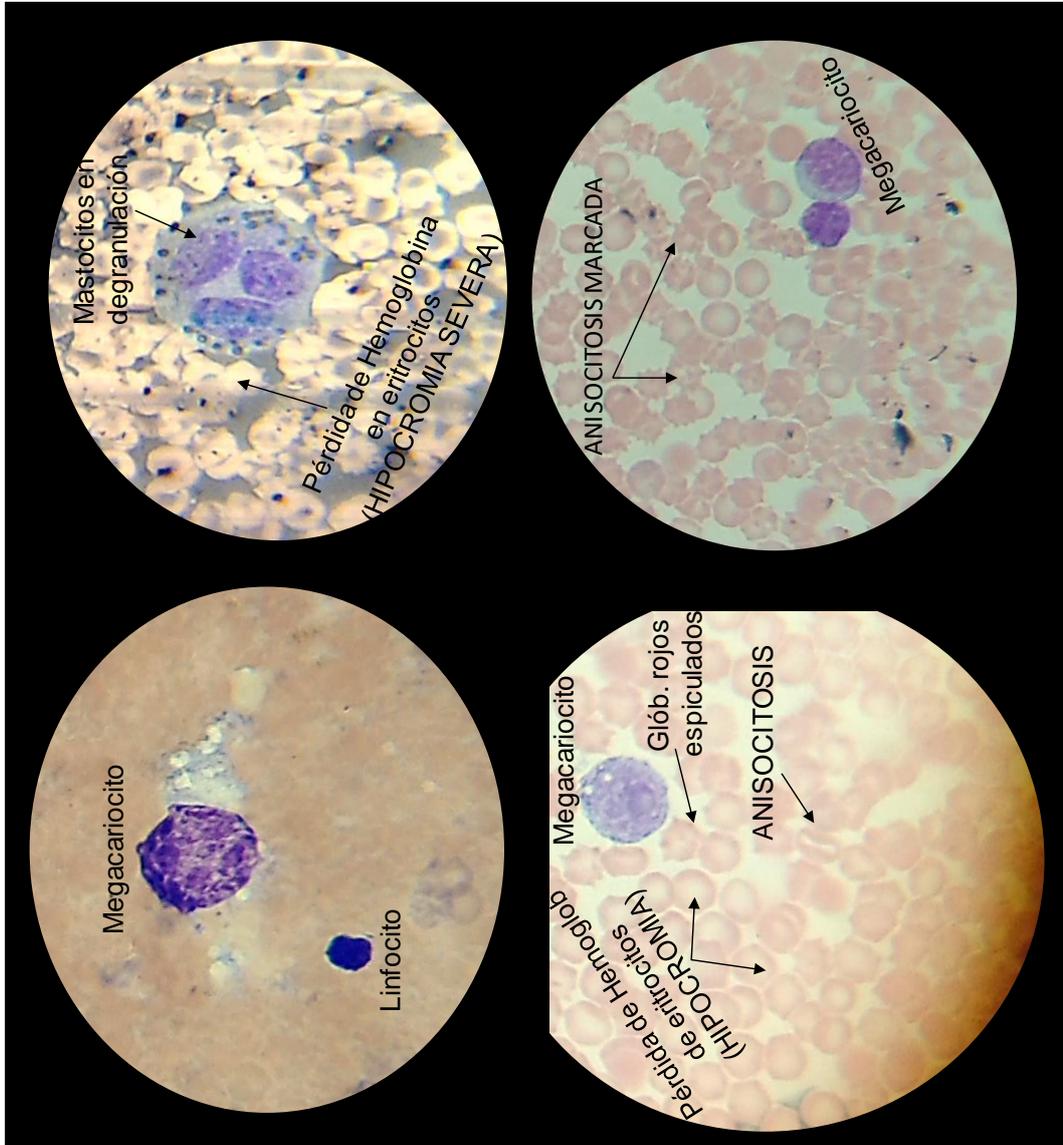
Grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake. Exhibió células sanguíneas maduras como linfocitos y granulocitos polimorfonucleares (neutrófilos y basófilos). Además, se observaron algunas células gigantes multinucleadas compatibles con megacariocitos.

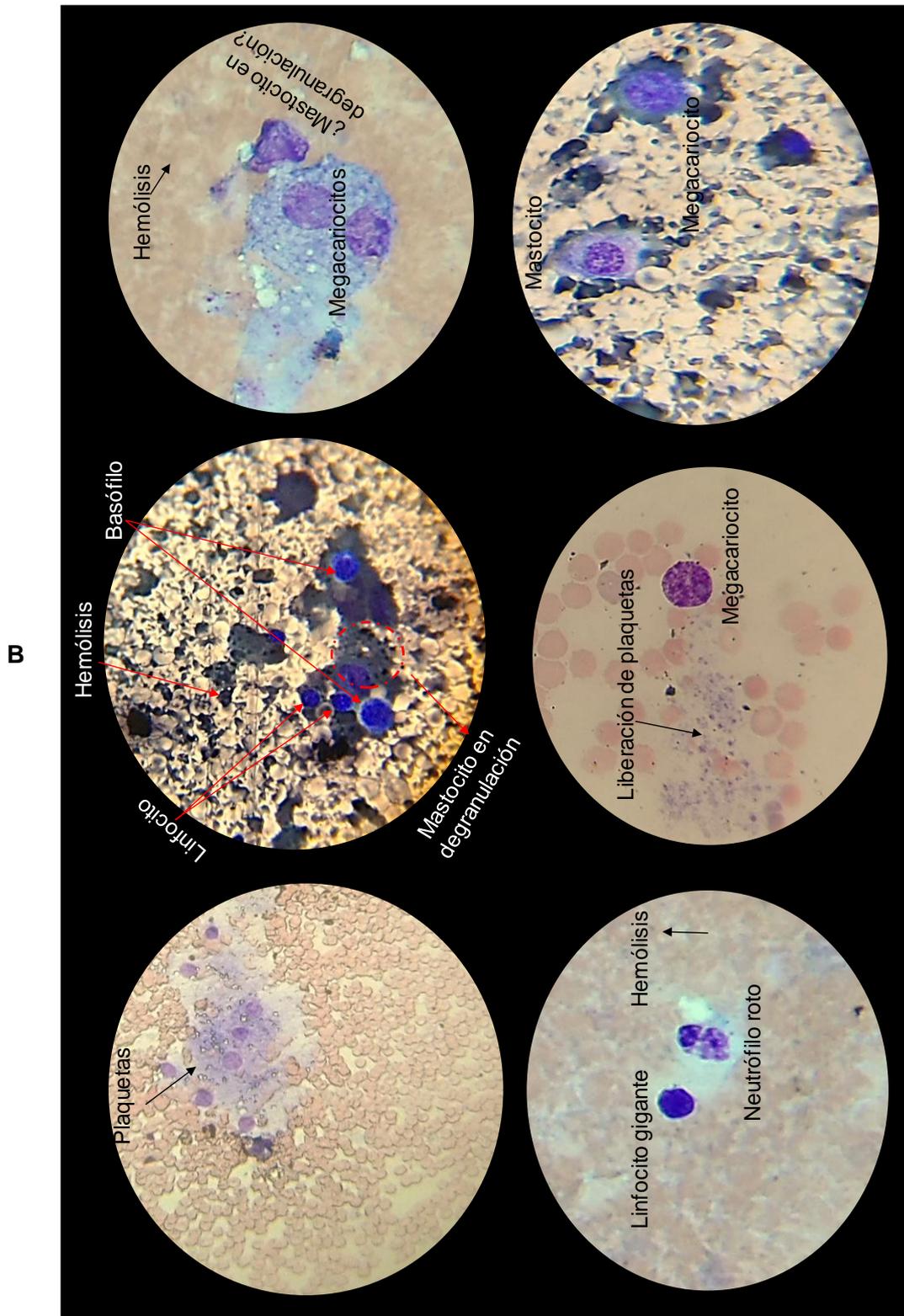


**Figura 101.4.** *Extendido sanguíneo grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake.* Las microfotografías (May Grünwald-Giemsa x40) indican la presencia de células gigantes multinucleadas compatibles con megacariocitos, linfocitos maduros y granulocitos polimorfonucleares.

Grupo inmunosuprimido Tratado con Maitake + Verapamilo. Se observaron glóbulos rojos espiculados con hipocromía y/o pérdida de hemoglobina, indicios de anisocitosis y hemólisis. Además, se registraron megacariocitos liberando plaquetas y mastocitos en degranulación (Fig. 102.4).

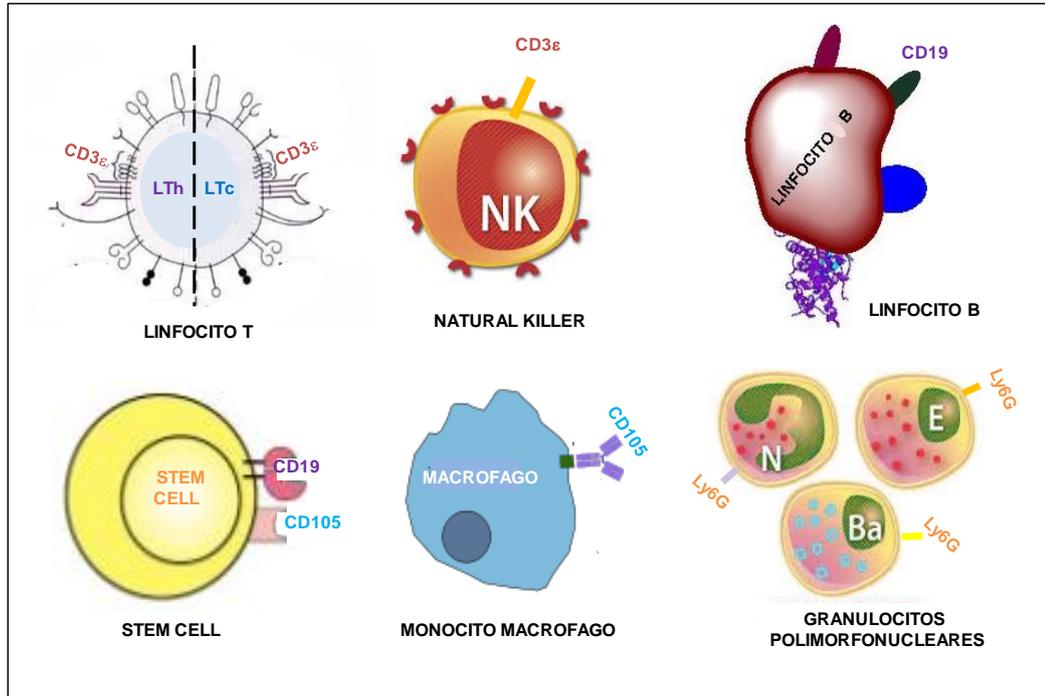
A





**Figura 102.4.** Extendido sanguíneo grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake + Verapamilo. Las microfotografías (May Grünwald-Giemsa x40) indican la presencia de **A)** Megacariocitos, hipocromía, anisocitosis y hemólisis. **B)** Mastocitos en degranulación, megacariocitos liberando plaquetas, granulocitos polimorfonucleares y linfocitos.

**Estudios de citometría de flujo de inmurestauración.** Mediante citometría de flujo se estudió la capacidad inmurestauradora de los  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X de recuperar poblaciones celulares inmunes con expresión antigénica CD3 $\epsilon$ , CD19, CD105 y Ly6G (Fig. 103.4). Tales estudios se realizaron sobre tejidos linfoides murinos (bazo y ganglios linfáticos) removidos durante la autopsia de los animales.

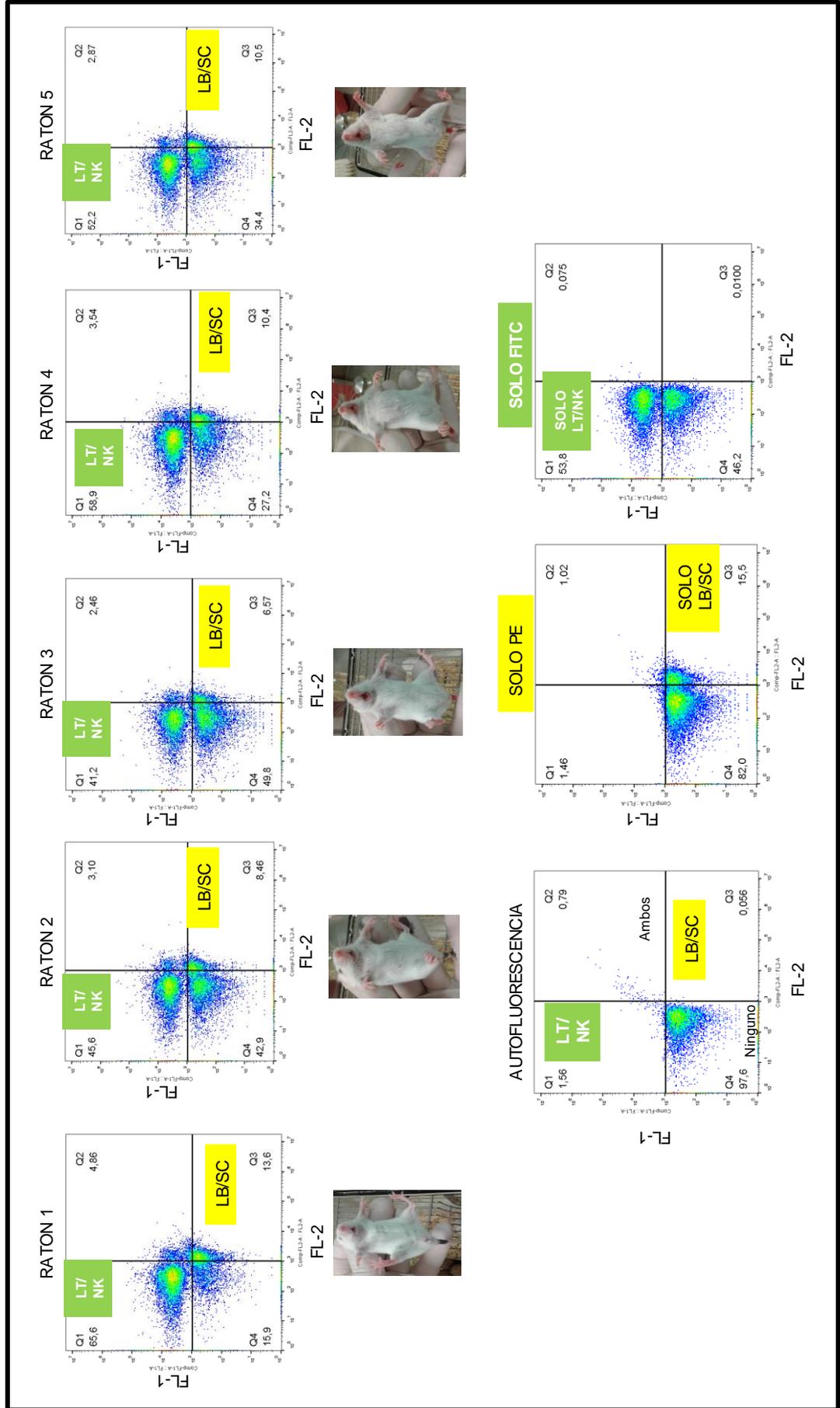


**Figura 103.4.** Marcadores moleculares en citometría de flujo. Se estudió el efecto inmurestaurador de Maitake PRO4X en la recuperación de células inmunes con expresión antigénica CD3 $\epsilon$ , CD19, CD105 y Ly6G de los órganos linfoides ganglionares y esplénico, removidos tras el sacrificio de los ratones.

**I-A) Marcación ganglionar CD3 $\epsilon$  y CD19.** Los resultados citométricos de la marcación de células ganglionares CD3 $\epsilon$  y CD19 se consignan en la Fig. 104.4 a 105.4 y Tabla 40.4. El ensayo se realizó con 4 condiciones experimentales: grupo Control sano, grupo control inmunosuprimido, grupo inmunosuprimido Tratado con Maitake y grupo Inmunosuprimido tratado con Maitake + Verapamilo.

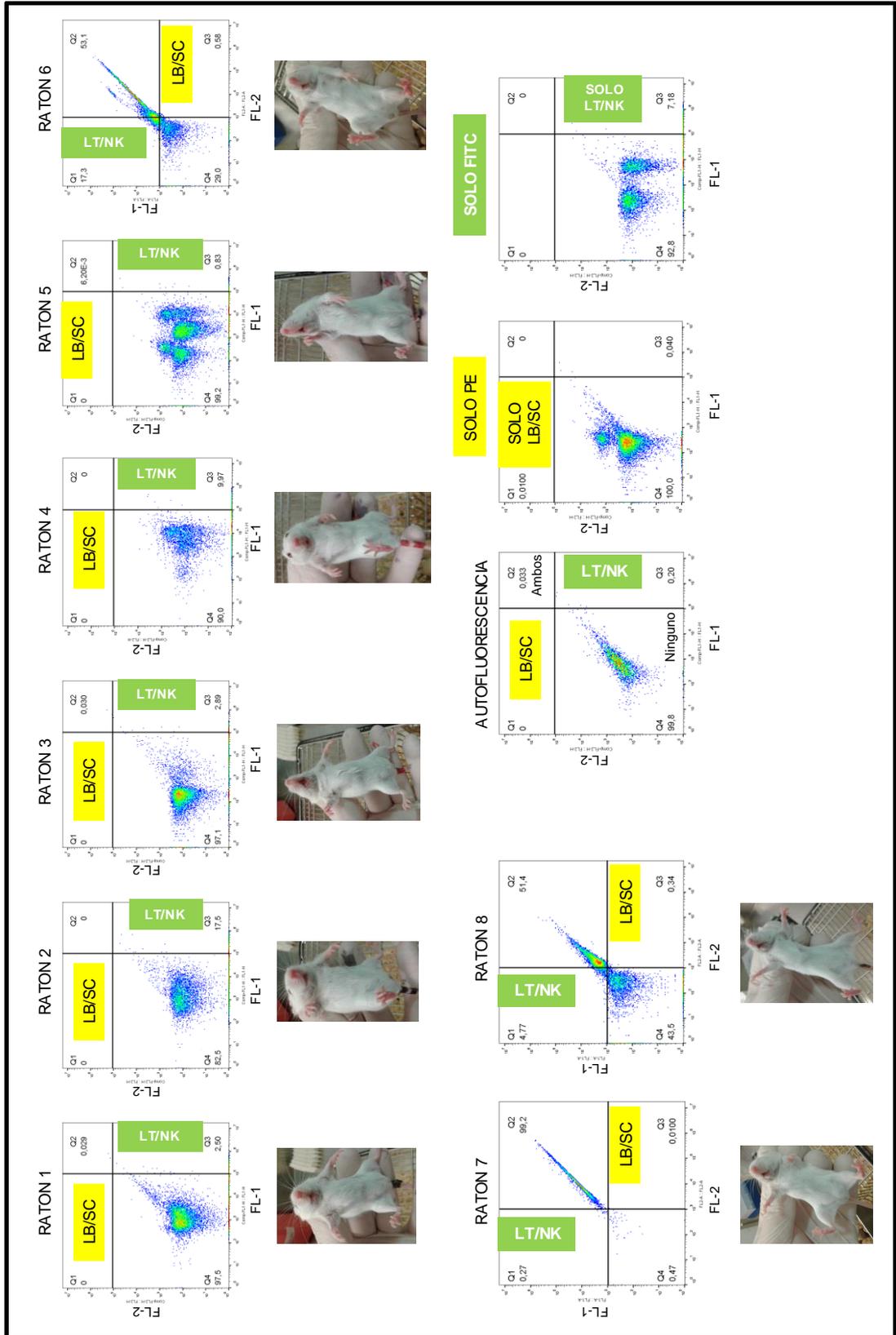
A

MARCACION GANGLIONAR CD3ε/CD19 GRUPO CONTROL SANO

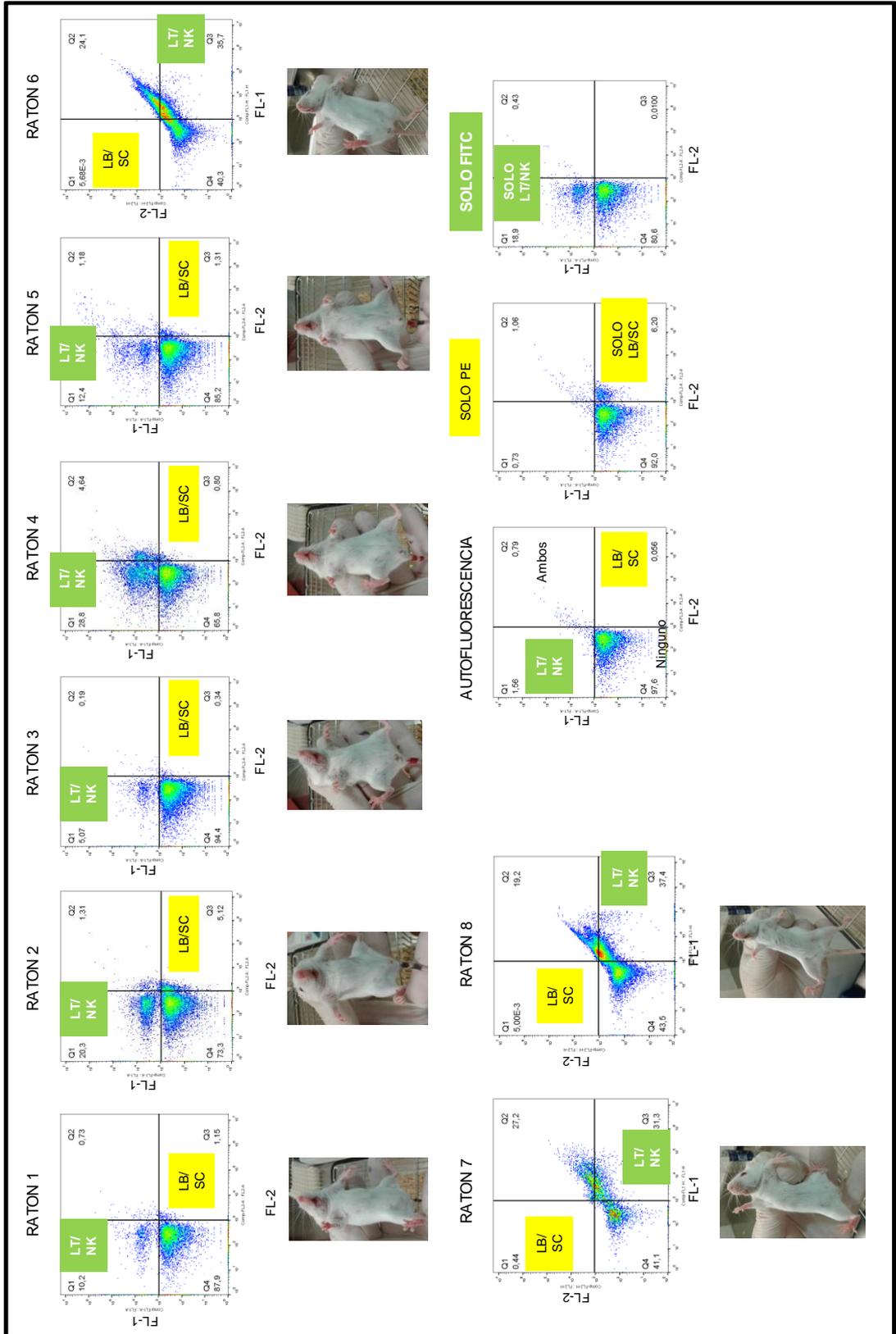


**B**

MARCACION GANGLIONAR CD3ε/CD19 GRUPO CONTROL INMUNOSUPRIMIDO

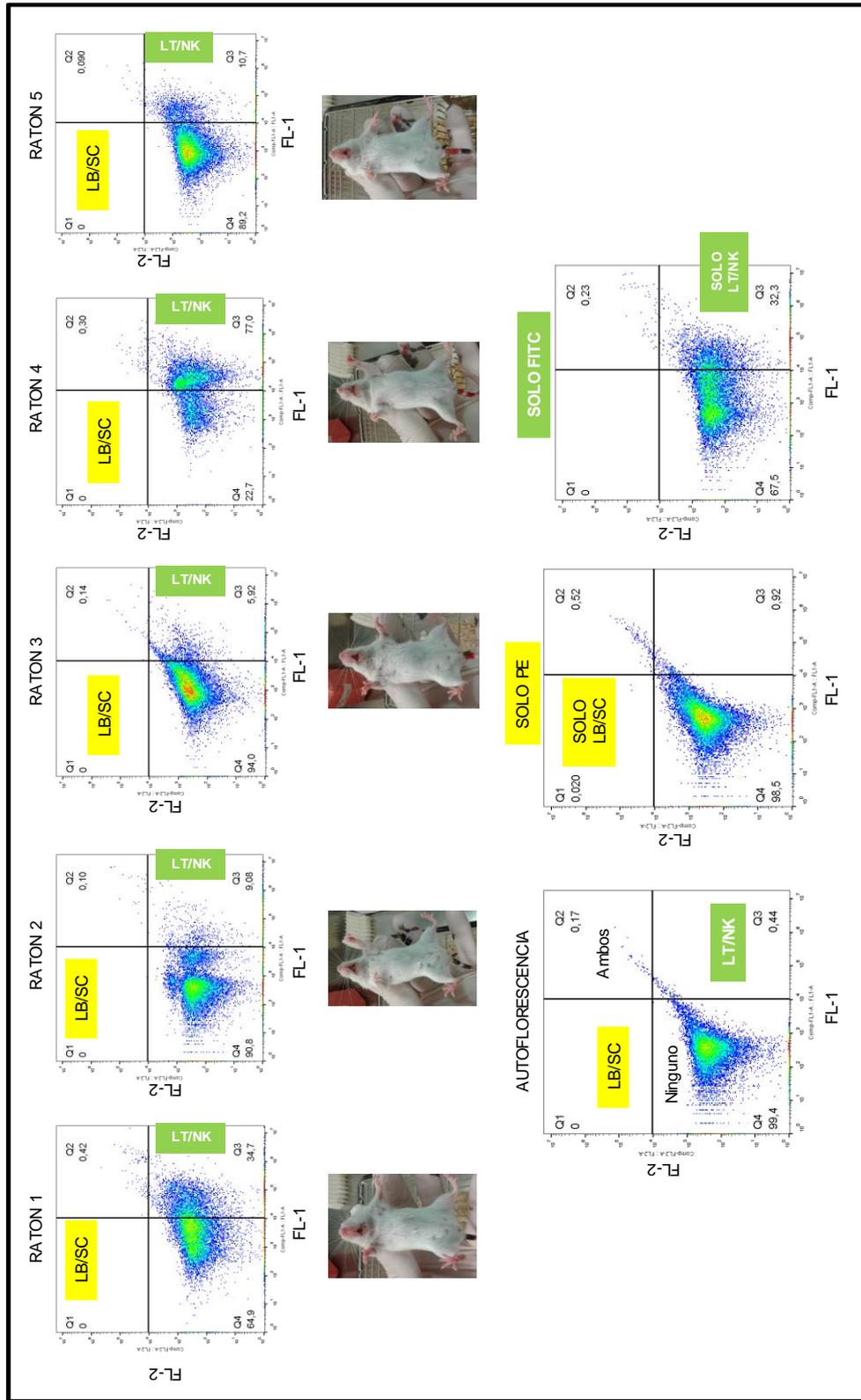


MARCAJON GANGLIONAR CD3&CD19 GRUPO INMUNOSUPRIMIDO TRATADO CON MAITAKE



D

MARCACION GANGLIONAR CD3ε/CD19 GRUPO INMUNOSUPRIMIDO TRATADO CON MAITAKE + VERAPAMILLO

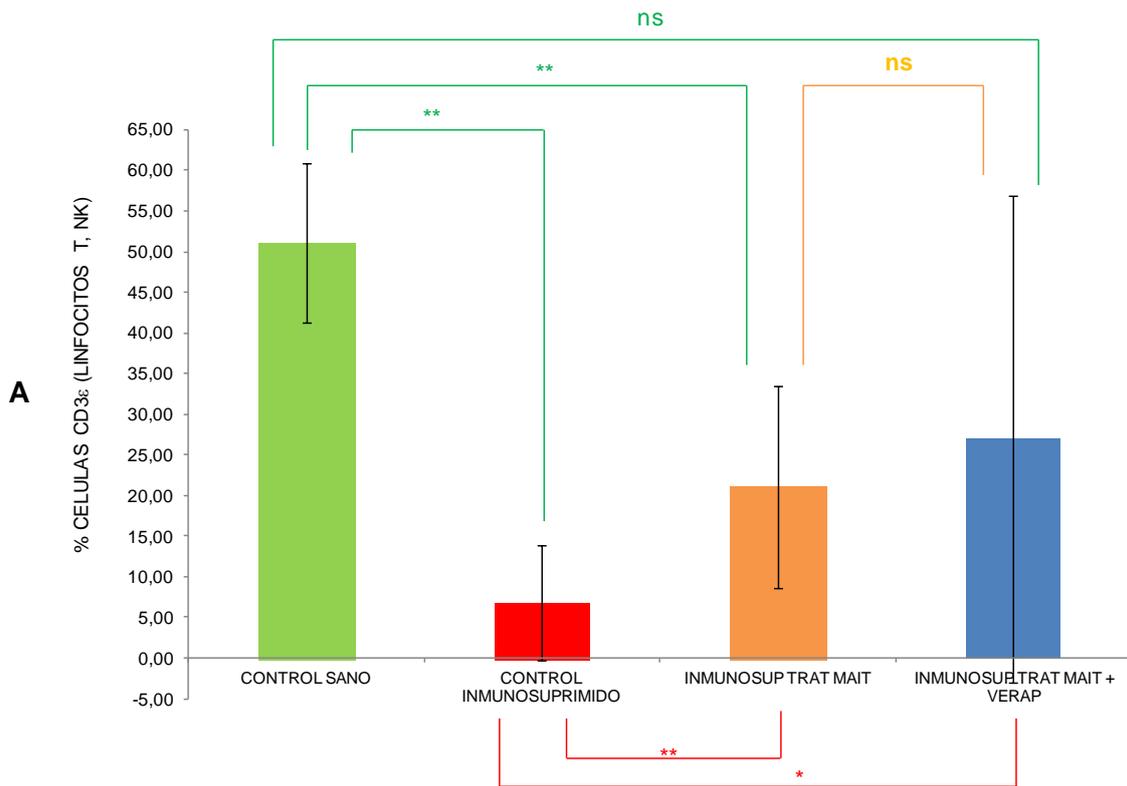


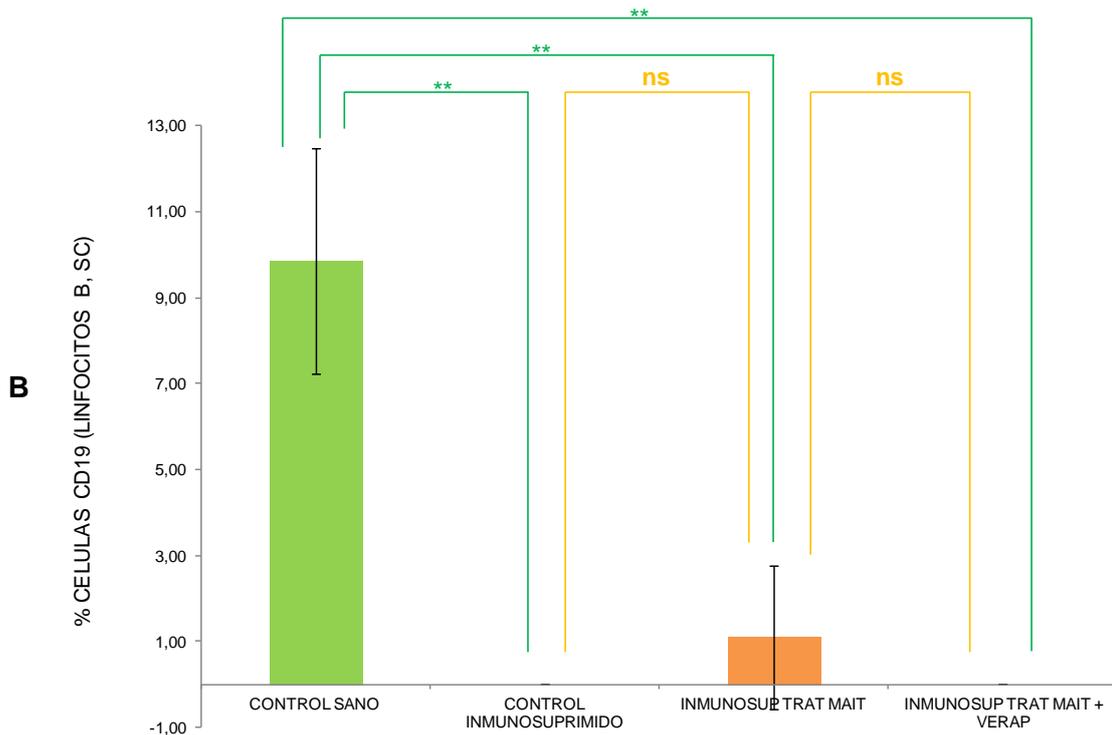
**Figura 104.4.** Expresión ganglionar CD3ε/CD19. Las mismas corresponden a ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales de hembras BALB/c de cuatro condiciones experimentales: **A)** Grupo Control sano. **B)** Control Inmunosuprimido. **C)** Grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake. **D)** Grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake + Verapamilo.

**Tabla 40.4.** Marcación ganglionar CD3 $\epsilon$  y CD19. Los porcentajes obtenidos por citometría de flujo corresponden a ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales de hembras BALB/c tratadas con Maitake PRO4X en un estado de depleción inmunológica y bloqueo cálcico.

MARCACION GANGLIONAR	% CD3 $\epsilon$ (LT/NK)	% CD19 (SC/LB)
CONTROL SANO (n=5)	51,14 $\pm$ 9,85	9,85 $\pm$ 2,62
CONTROL INMUNOSUP (n=8)	6,80 $\pm$ 7,08 (**<0,01vs C. SANO)	0 (**<0,01vs C. SANO)
TRATADO MAITAKE (n=8)	21,09 $\pm$ 12,39 (**<0,01vs C. SANO) (**<0,01vs C. INMUNOSUP)	1,10 $\pm$ 1,67 (**<0,01vs C. SANO)
TRAT. MAITAKE + VERAP (n=5)	27,04 $\pm$ 29,96 (*<0,05 vs C. INMUNOSUP)	0 (**<0,01vs C. SANO)

En la Fig. 105.4 se grafican los porcentajes de recuperación ganglionar CD3 $\epsilon$  /CD19.





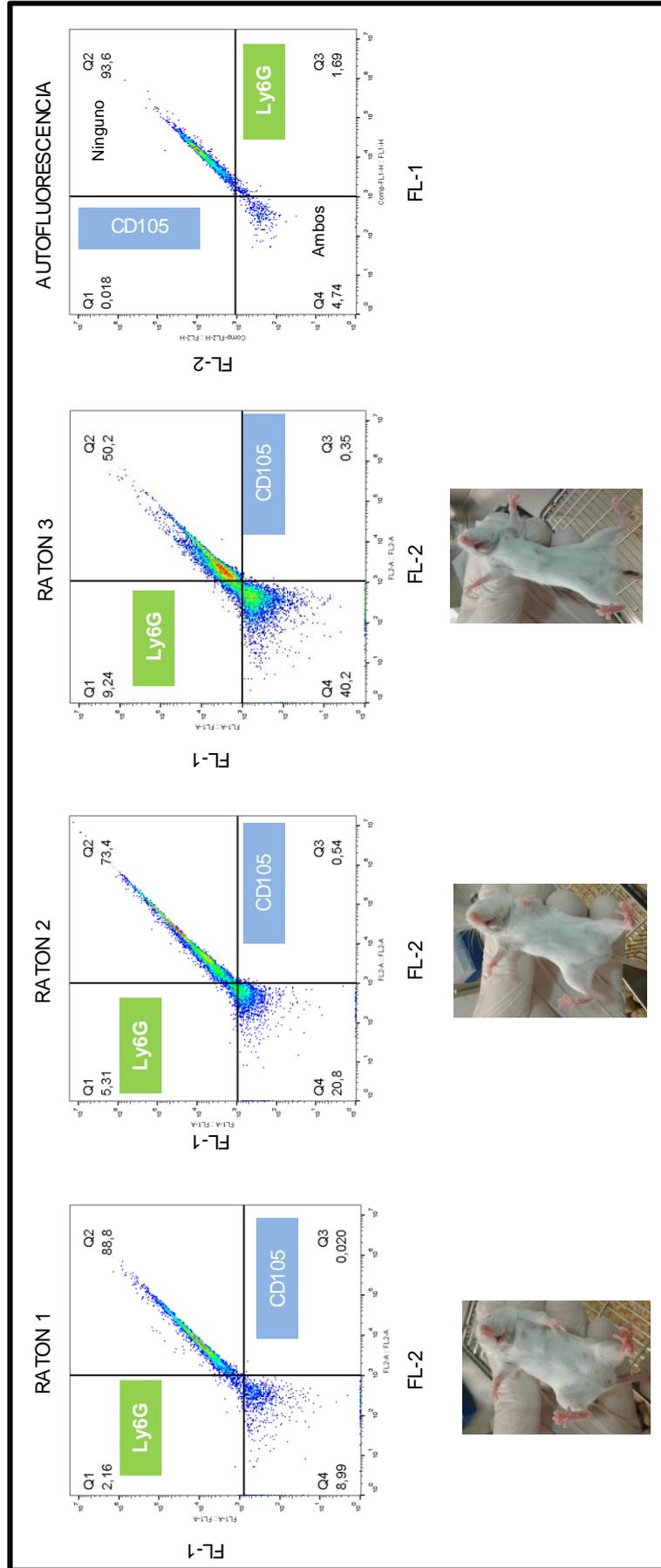
**Figura 105.4.** Efecto inmunorestaurador de Maitake en células ganglionares inmunes CD3 $\epsilon$  y CD19. El ensayo citométrico se realizó en hembras BALB/c inmunosuprimidas con Dexametasona. Se graficó: **A)** Marcación CD3 $\epsilon$  con recupero muy significativo de LT/NK (\*\* $p < 0,01$ ) por efecto de Maitake en un grupo inmunosuprimido. **B)** Marcación CD19 con tendencia al recupero de LBT/SC por efecto de Maitake (ns, $p > 0,05$ ).

Los resultados de Citometría de flujo de la Fig. 105.4-A respecto del recupero de células inmunes ganglionares CD3 $\epsilon$ , sugieren que el tratamiento con Maitake PRO4X permite un recupero muy significativo (\*\* $p < 0,01$ ) del % Linfocitos T/Natural Killer (de  $6,80 \pm 7,08$  % a  $21,09 \pm 12,39$  %) en hembras BALB/c inmunosuprimidas con Dexametasona respecto del Control inmunosuprimido. Por otra parte, la inmunorestauración alcanza valores normales cuando el tratamiento con Maitake es coadyuvante con Verapamilo (de  $21,09 \pm 12,39$  % a  $27,04 \pm 29,96$  %). En cuanto a la marcación CD19, los resultados de la Fig. 115.4-B sugieren que la Dexametasona diaria depleta la población de LB/SC, mientras que el tratamiento con Maitake PRO4X tiende a recuperar la población de LB/SC (de 0 a  $1,10 \pm 1,67$ ) (ns,  $p > 0,05$ ). Pero esa tendencia inmunorestauradora desaparece cuando el tratamiento implica Verapamilo (de  $1,10 \pm 1,67$  a 0).

**I-B) Marcación ganglionar Ly6G y CD105.** Los resultados citométricos de la recuperación ganglionar inmune Ly6G y CD105 se consignan en las Fig. 106.4 a 107.4 y Tabla 41.4. Este ensayo se realizó con 3 condiciones experimentales: Control inmunosuprimido, grupo sano Tratado con Maitake y grupo Inmunosuprimido tratado con Maitake.

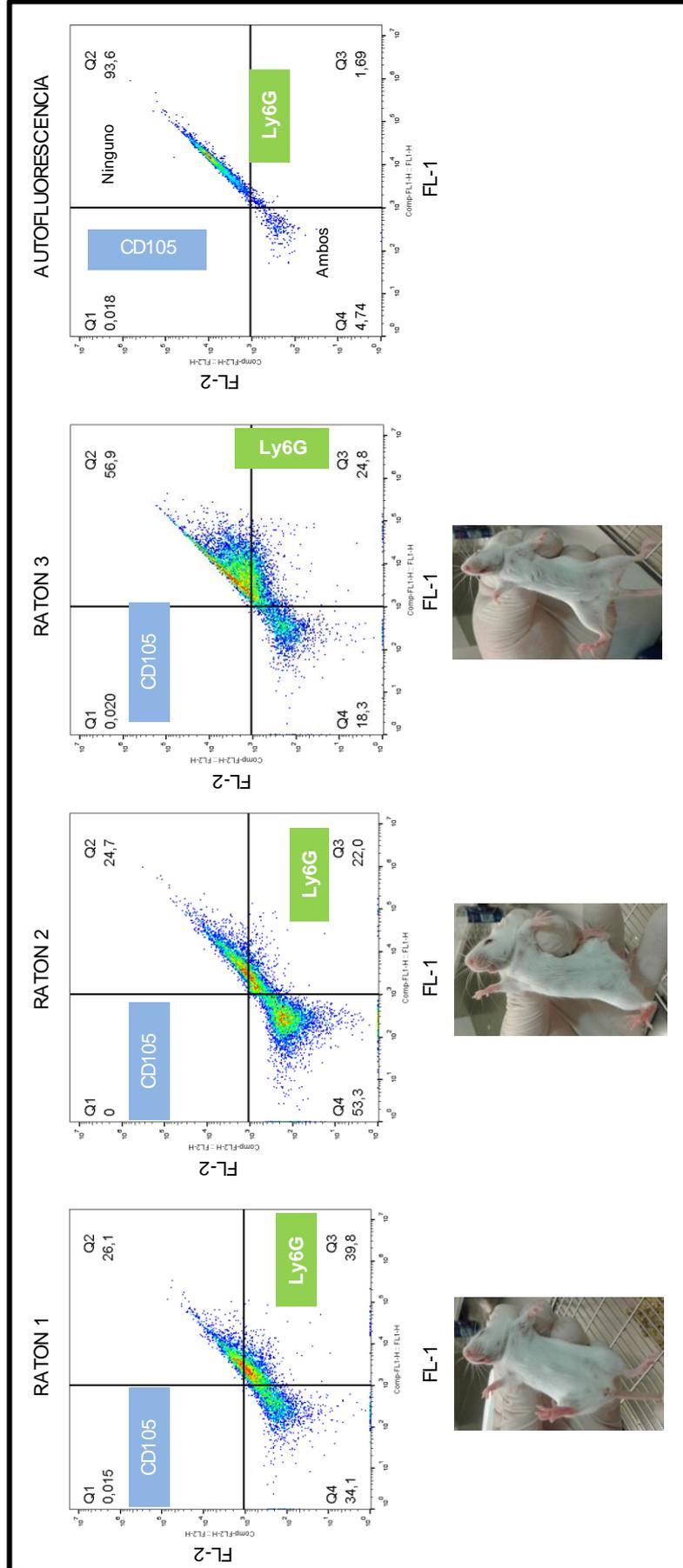
A

MARCACION GANGLIONAR Ly6G/CD105 GRUPO CONTROL INMUNOSUPRIMIDO



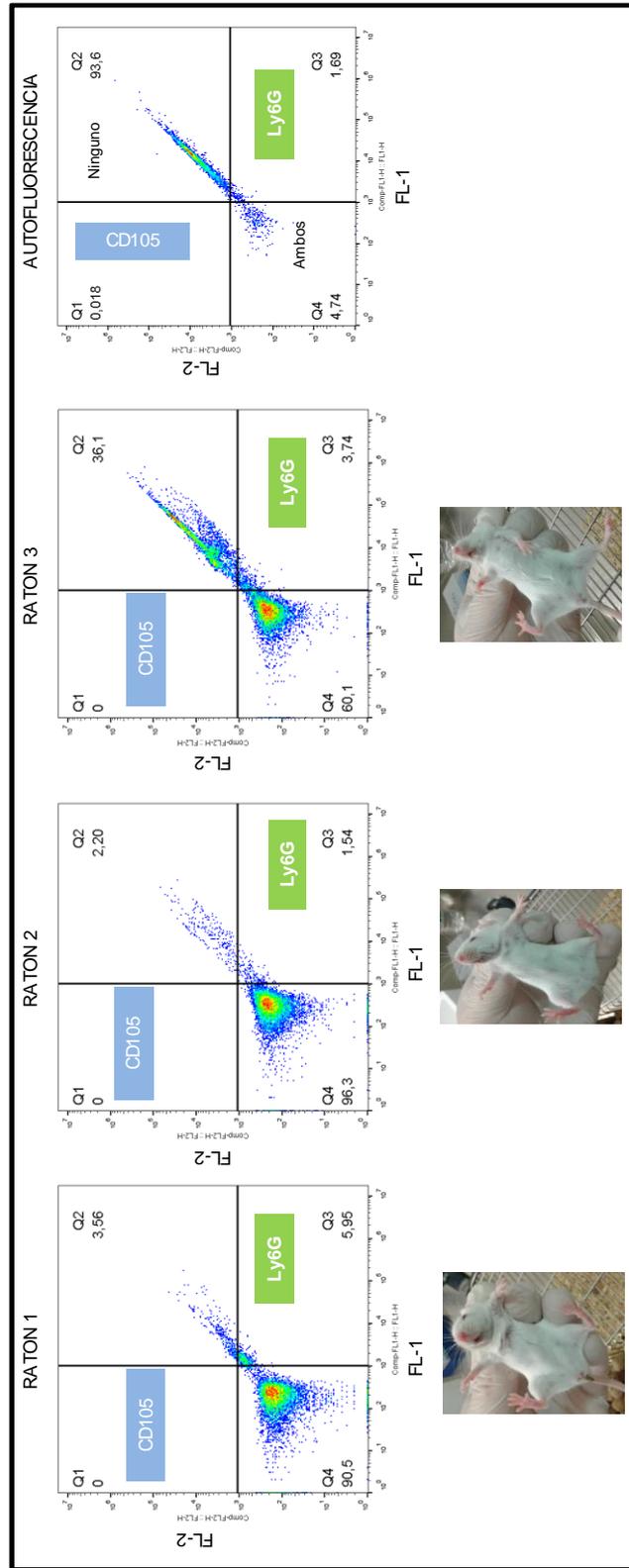
**B**

MARCACION GANGLIONAR Ly6G/CD105 GRUPO INMUNOSUPRIMIDO TRATADO CON MAITAKE



C

MARCIÓN GANGLIONAR Ly6G/CD105 GRUPO SANO TRATADO CON MAITAKE

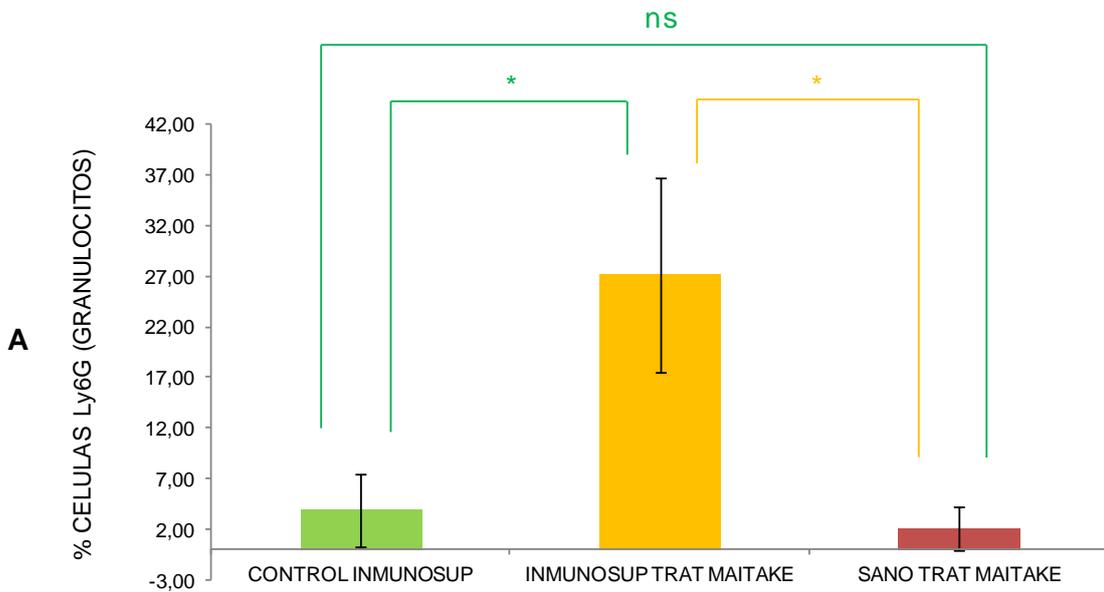


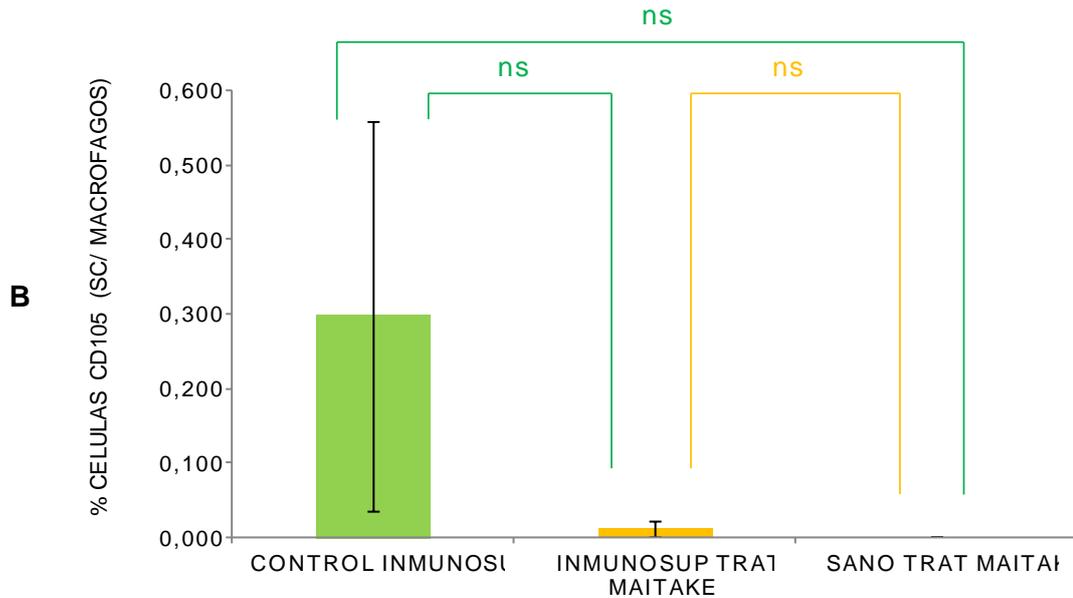
**Figura 106.4.** Expresión ganglionar Ly6G /CD105. Las mismas corresponden a ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales de hembras BALB/c de tres condiciones experimentales: **A)** Grupo Control Inmunosuprimido. **B)** Grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake. **C)** Grupo sano Tratado con Maitake.

**Tabla 40.4.** Marcación ganglionar Ly6G y CD105. Los porcentajes obtenidos por citometría de flujo corresponden a ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales de hembras BALB/c tratadas con Maitake PRO4X en un estado normal y de depleción inmunológica.

MARCACION GANGLIONAR	% Ly6G (Granuloc)	% CD105 (SC/Macróf)
CONTROL INMUNOSUP (n=3)	3,88 ± 3,55	0,297 ± 0,262
INMUNOSUP TRAT MAITAKE (n=3)	27,18 ± 9,57 (*p≤0,05 vs Control Inmunosup)	0,01 ± 0,01
SANO TRAT. MAITAKE (n=3)	2,10 ± 2,13 (*p≤0,05 vs Inmunosup Trat Maitake)	0

En la Fig. 107.4 se grafican los porcentajes de recuperación ganglionar inmune Ly6G y CD105.





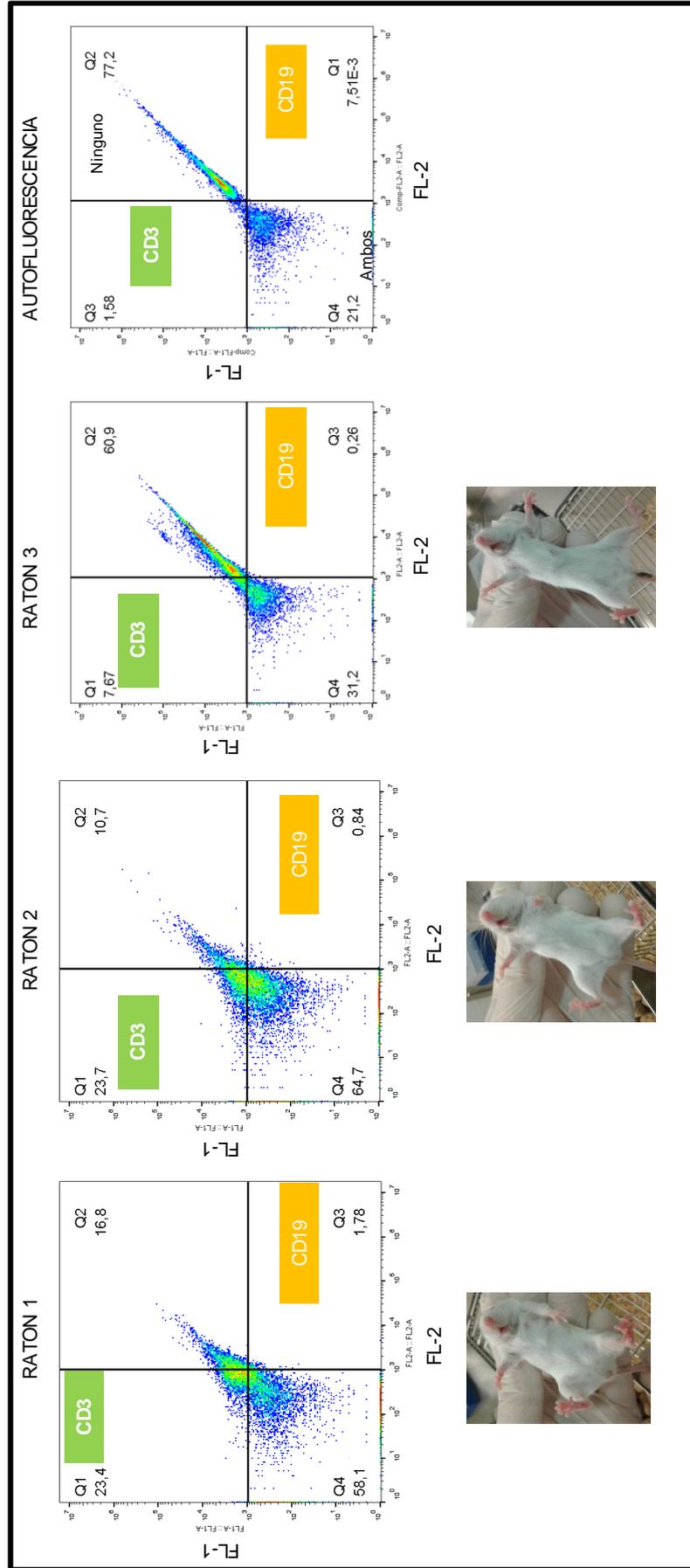
**Figura 107.4.** Efecto inmunorestaurador de Maitake en células ganglionares inmunes Ly6G y CD105. El ensayo citométrico se realizó en hembras BALB/c inmunosuprimidas con Dexametasona. Se graficó: **A)** Marcación Ly6G con diferencias significativas de los % GPN (\* $p < 0,05$ ). **B)** Marcación CD105 sin diferencias significativas de los % SC/Macrófagos (ns,  $p > 0,05$ ).

Los resultados de Citometría de flujo de la Fig. 107.4-A respecto del recupero de células inmunes ganglionares Ly6G, sugieren que el tratamiento con Maitake PRO4X aumenta significativamente (\* $p < 0,05$ ) el % granulocitos polimorfonucleares en ratones inmunosuprimidos con dexametasona respecto del Control inmunosuprimido (de  $3,88 \pm 3,55$  % a  $27,18 \pm 9,57$  %), pero no lo aumenta en ratones sanos. En cuanto a la marcación CD105, los resultados de la Fig. 107.4-B sugieren que la Dexametasona no induce depleción del % de SC/macrófagos, dado que se hallaron diferencias significativas (ns,  $p > 0,05$ ) del nivel de estas células entre los grupos experimentales.

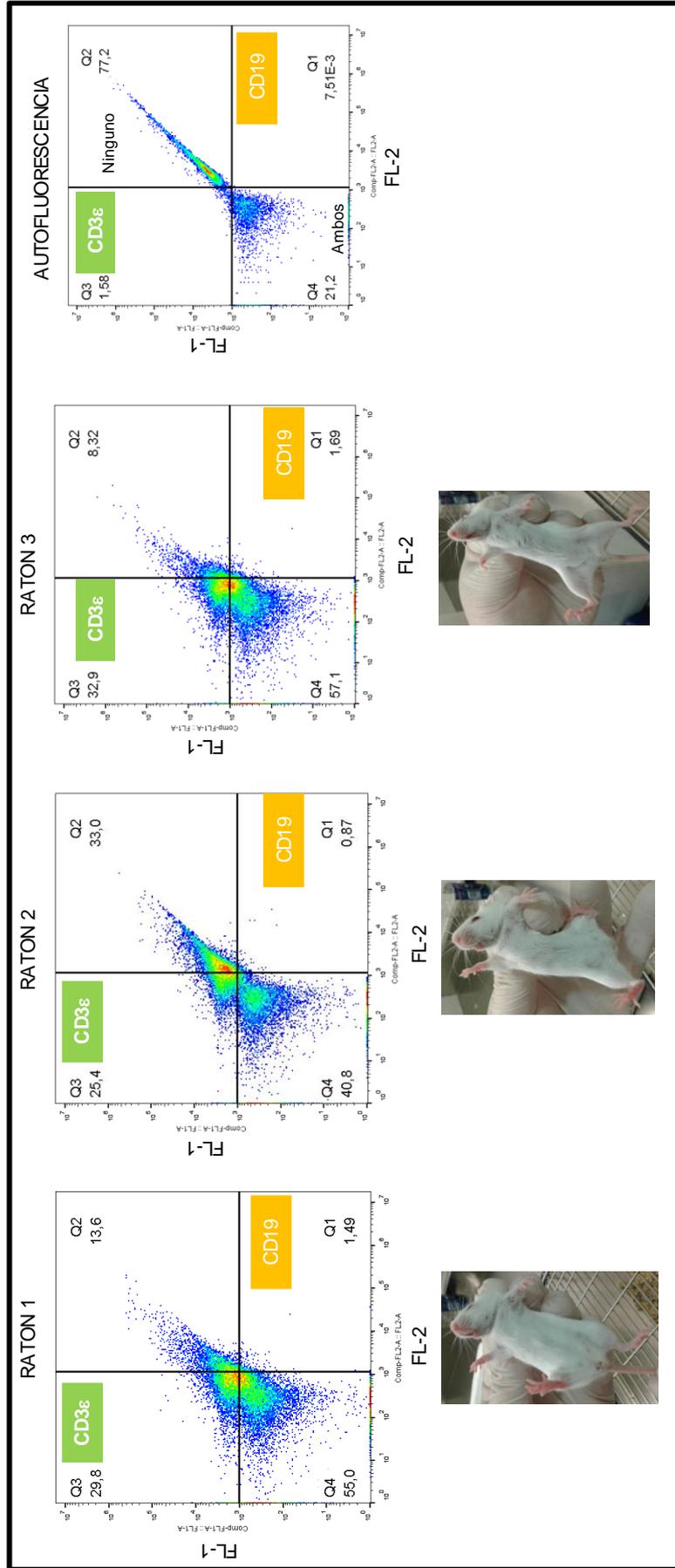
**II-A) Marcación esplénica CD3 $\epsilon$  y CD19.** Los resultados de Citometría de flujo correspondientes al recupero esplénico de células inmunes CD3 $\epsilon$  y CD19 se consignan en las Fig. 108.4 a 109.4 y Tabla 42.4. Nuevamente, este ensayo se realizó con 3 condiciones experimentales: Control inmunosuprimido, grupo sano Tratado con Maitake y grupo Inmunosuprimido tratado con Maitake.

A

MARCACION ESPLENICA CD3ε/CD19 GRUPO CONTROL INMUNOSUPRIMIDO

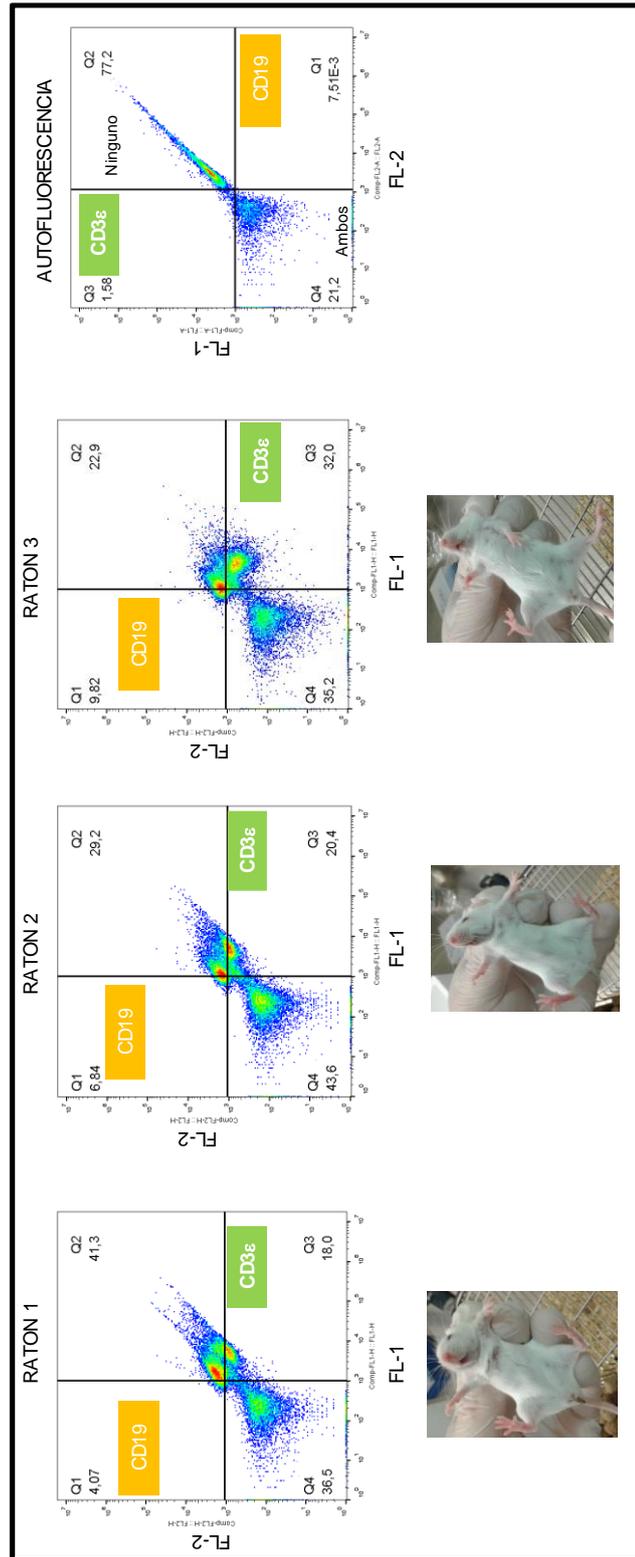


**B**  
**MARCACION ESPLENICA CD3ε/CD19 GRUPO INMUNOSUPRIMIDO TRATADO CON MAITAKE**



C

MARCACION ESPLENICA CD3 $\epsilon$ /CD19 GRUPO SANO TRATADO CON MATAKE

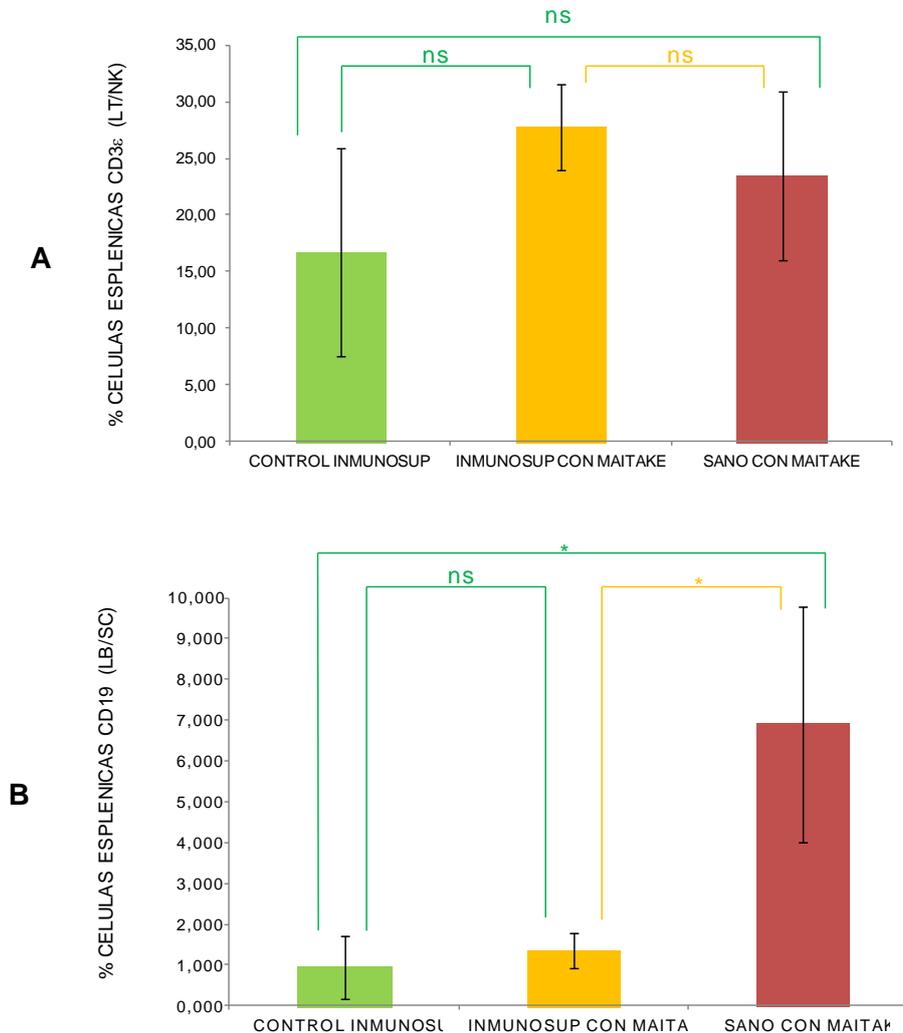


**Figura 108.4.** *Expresión esplénica CD3 $\epsilon$  y CD19.* Las mismas corresponden al bazo murino de hembras BALB/c de tres condiciones experimentales: **A)** Grupo Control Inmunosuprimido. **B)** Grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake. **C)** Grupo sano Tratado con Maitake.

**Tabla 42.4.** Marcación esplénica CD3 $\epsilon$  y CD19. Los porcentajes obtenidos por citometría de flujo corresponden al bazo murino de hembras BALB/c tratadas con Maitake PRO4X en un estado normal y de depleción inmunológica con dexametasona.

% MARCACION GANGLIONAR	% CD3 $\epsilon$ (LT/NK)	% CD19 (LB/SC)
CONTROL INMUNOSUP (n=3)	16,68 $\pm$ 9,17	0,953 $\pm$ 0,767
INMUNOSUP TRAT MAITAKE (n=3)	27,79 $\pm$ 3,77	1,34 $\pm$ 0,43
GRUPO SANO TRAT. MAITAKE (n=3)	23,47 $\pm$ 7,49	6,90 $\pm$ 2,88 (*p $\leq$ 0,05 vs Inmunosup Trat Maitake)

En la Fig. 109.4 se grafican los porcentajes de recuperación esplénica inmune CD3 $\epsilon$  y CD19.



**Figura 109.4.** Efecto inmunorestaurador de Maitake en células esplénicas inmunes CD3 $\epsilon$  y CD19. El ensayo citométrico se realizó en hembras BALB/c inmunosuprimidas con

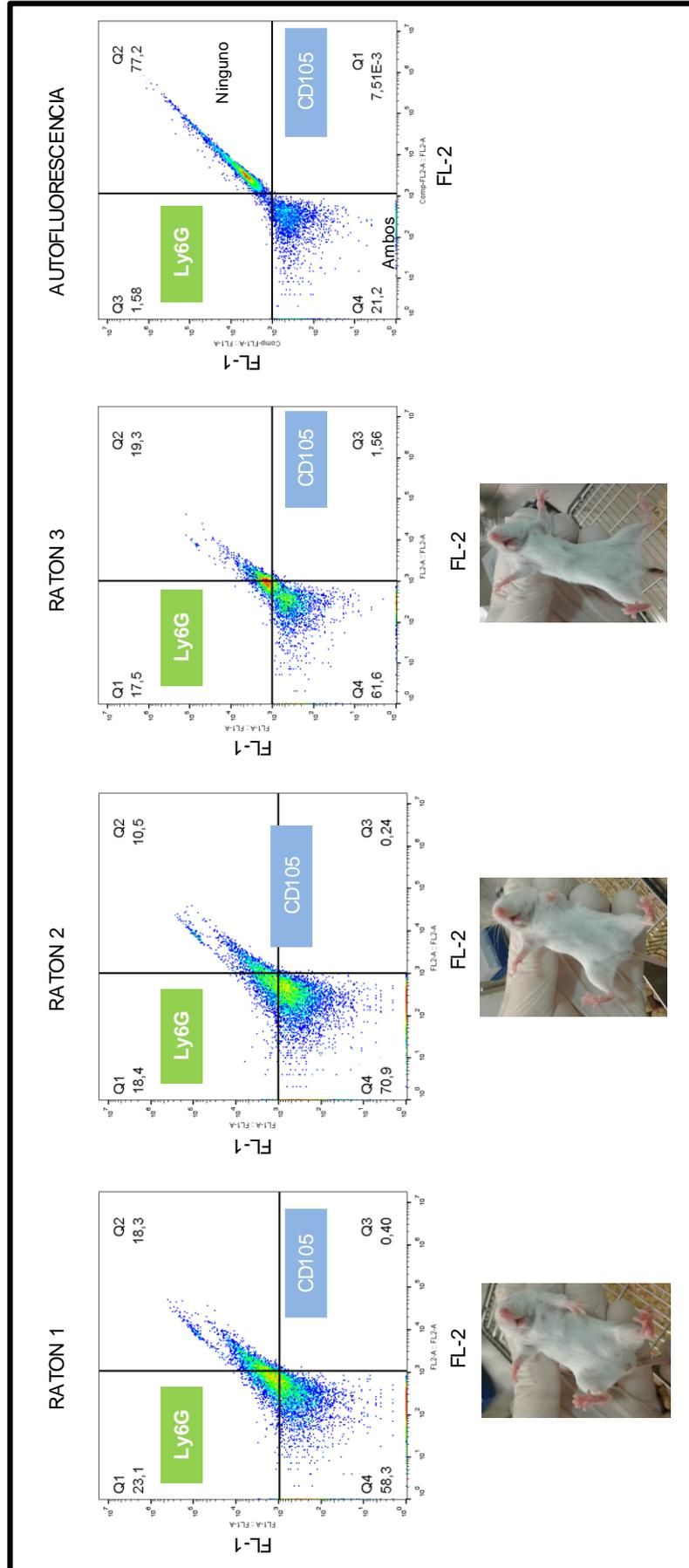
Dexametasona. Se graficó: **A)** Marcación CD3 $\epsilon$  con diferencias no significativas de los % LT/NK (ns,  $p>0,05$ ). **B)** Marcación CD19 con diferencias significativas de los % LB/SC ( $*p<0,05$ ).

Los resultados de Citometría de flujo de la Fig. 109.4-A respecto del recupero de células esplénicas CD3 $\epsilon$ , sugieren que el tratamiento con dexametasona no induce una depleción significativa de la población de LT/NK respecto de los demás grupos experimentales (ns,  $p>0,05$ ). Se observa una tendencia a la reducción del % LT/NK por acción de la dexametasona y una tendencia al aumento de LT/NK por efecto de Maitake en el grupo inmunosuprimido. Respecto de la marcación CD19 (Fig. 109.4-B), observamos una depleción significativa de la población esplénica de LB/SC por acción de la dexametasona ( $*p<0,05$  vs grupo sano), y una tendencia al recupero de dicha población por parte de Maitake (ns,  $p>0,05$ ).

**II-B) Marcación esplénica Ly6G y CD105.** Los resultados de Citometría de flujo correspondientes al recupero esplénico de células inmunes Ly6G y CD105 se consignan en la Tabla 43.4 y las Fig. 110.4 a 111.4. El ensayo se realizó con 3 condiciones experimentales: Control inmunosuprimido, grupo sano Tratado con Maitake y grupo Inmunosuprimido tratado con Maitake. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con dexametasona no induce depleción de los niveles de granulocitos polimorfonucleares, no existiendo diferencias en el % de los mismos entre los distintos grupos experimentales (Fig. 111.4-A). Tampoco se observó diferencia significativa ( $p>0,05$ ) en el nivel de células CD105 (Fig. 111.4-B), sino una tendencia por efecto de la dexametasona a incrementar los % de SC/macrófagos respecto del grupo sano, mientras que, en el grupo inmunosuprimido, Maitake tendió a normalizar esos niveles.

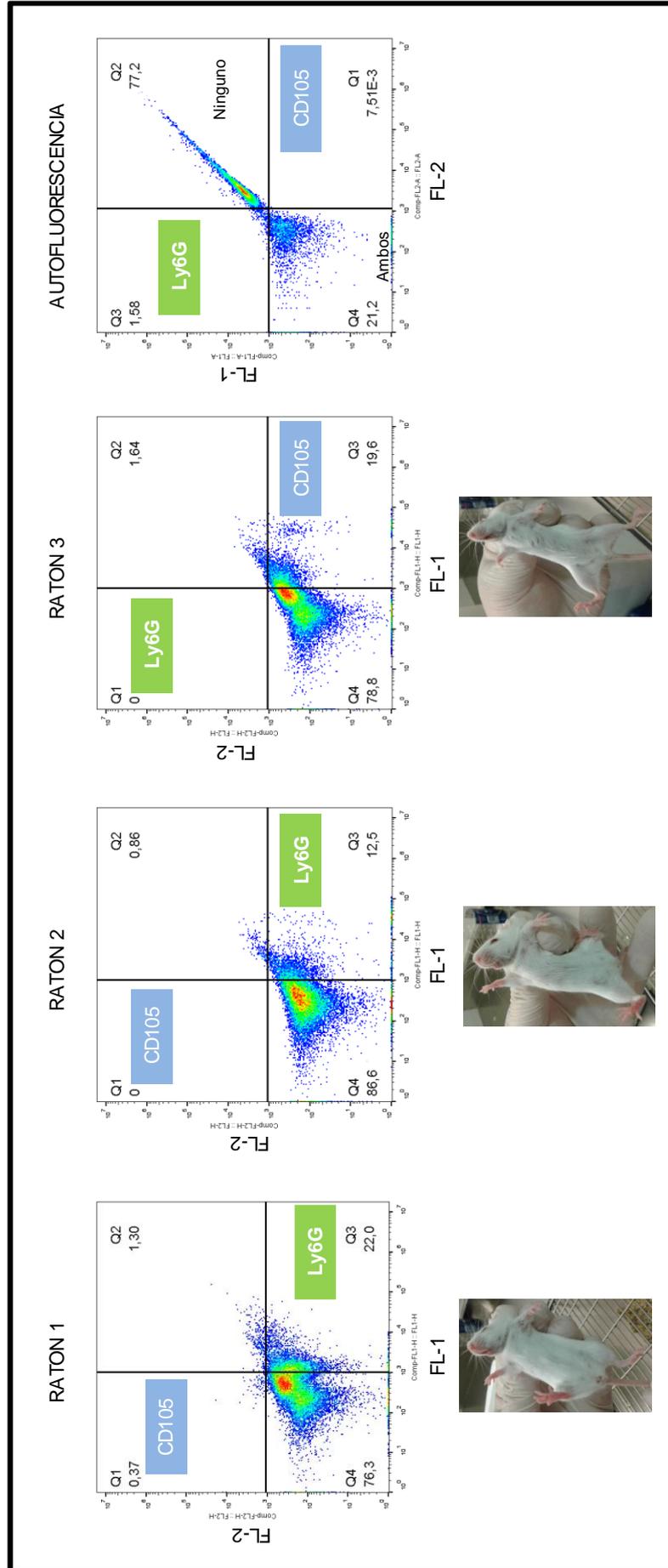
A

MARCACION ESPLENICA Ly6G/CD105 GRUPO CONTROL INMUNOSUPRIMIDO

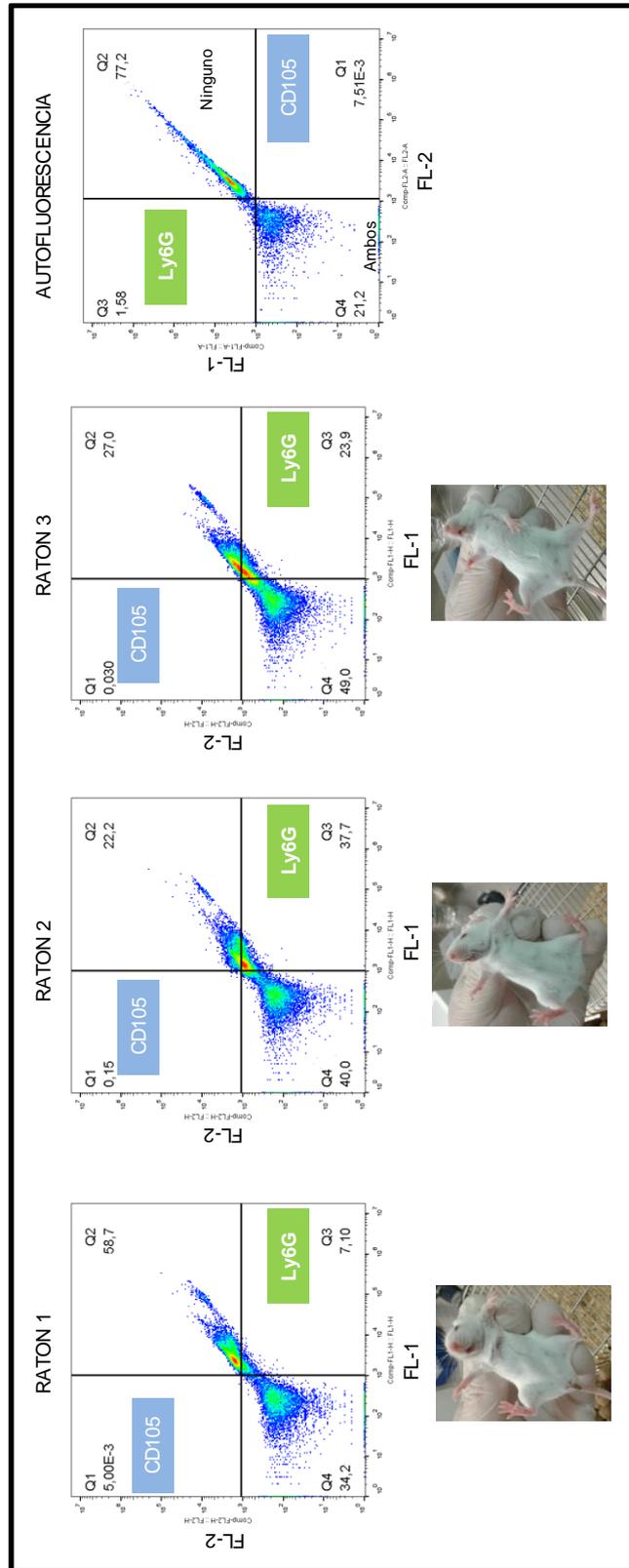


**B**

MARCACION ESPLENICA Ly6G/CD105 GRUPO INMUNOSUPRIMIDO TRATADO CON MAITAKE



**C**  
**MARCACION ESPLENICA Ly6G/CD105 GRUPO SANO TRATADO CON MATAKE**

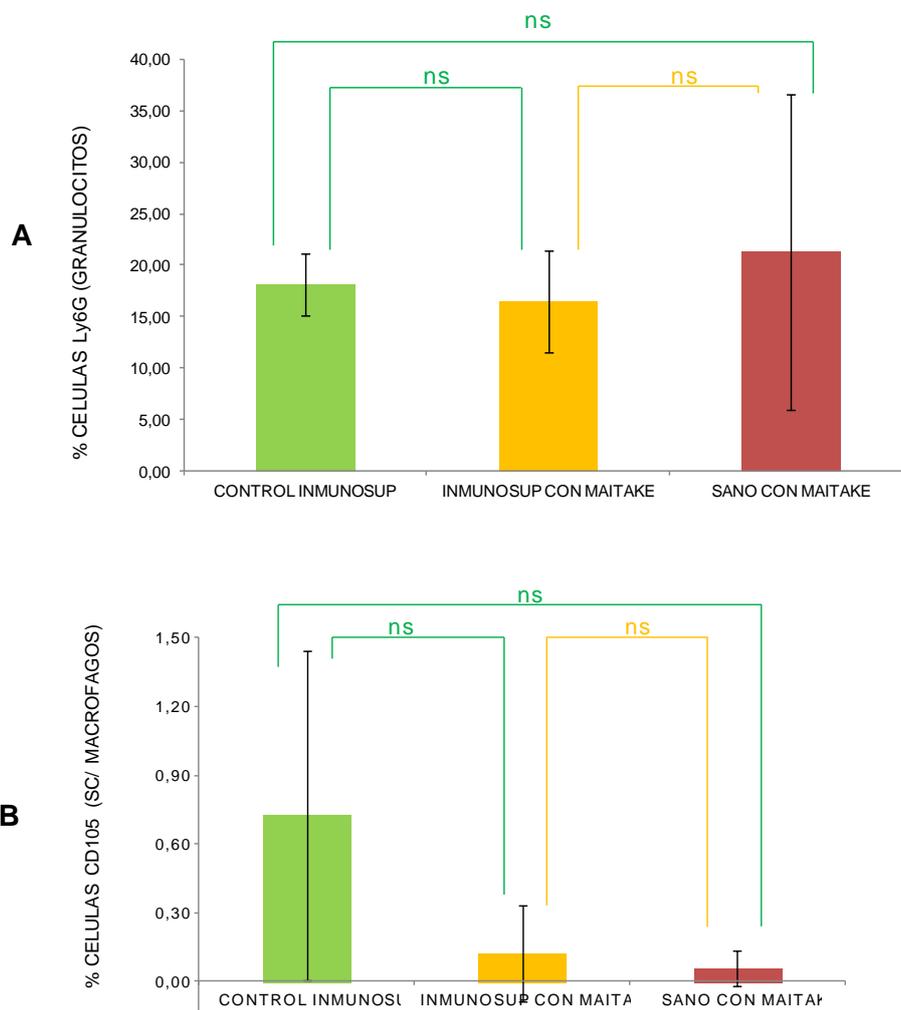


**Figura 110.4.** Expresión esplénica Ly6G y CD105. Las mismas corresponden al bazo murino de hembras BALB/c de tres condiciones experimentales: **A)** Grupo Control Inmunosuprimido. **B)** Grupo Inmunosuprimido Tratado con Maitake. **C)** Grupo sano Tratado con Maitake.

**Tabla 43.4.** Marcación esplénica Ly6G y CD105 . Los porcentajes obtenidos por citometría de flujo corresponden al bazo murino de hembras BALB/c tratadas con Maitake PRO4X en un estado normal y de depleción inmunológica con dexametasona.

% MARCACION GANGLIONAR	% Ly6G (Granulocitos)	% CD105 (SC/Macrófagos)
CONTROL INMUNOSUP (n=3)	18,09 ± 3,01	0,73 ± 0,72
INMUNOSUP TRAT MAITAKE (n=3)	16,45 ± 4,94	0,12 ± 0,21
SANO TRAT. MAITAKE (n=3)	21,32 ± 15,32	0,06 ± 0,08

Los niveles recuperación esplénica inmune Ly6G y CD105, se indican en la Fig. 111.4.

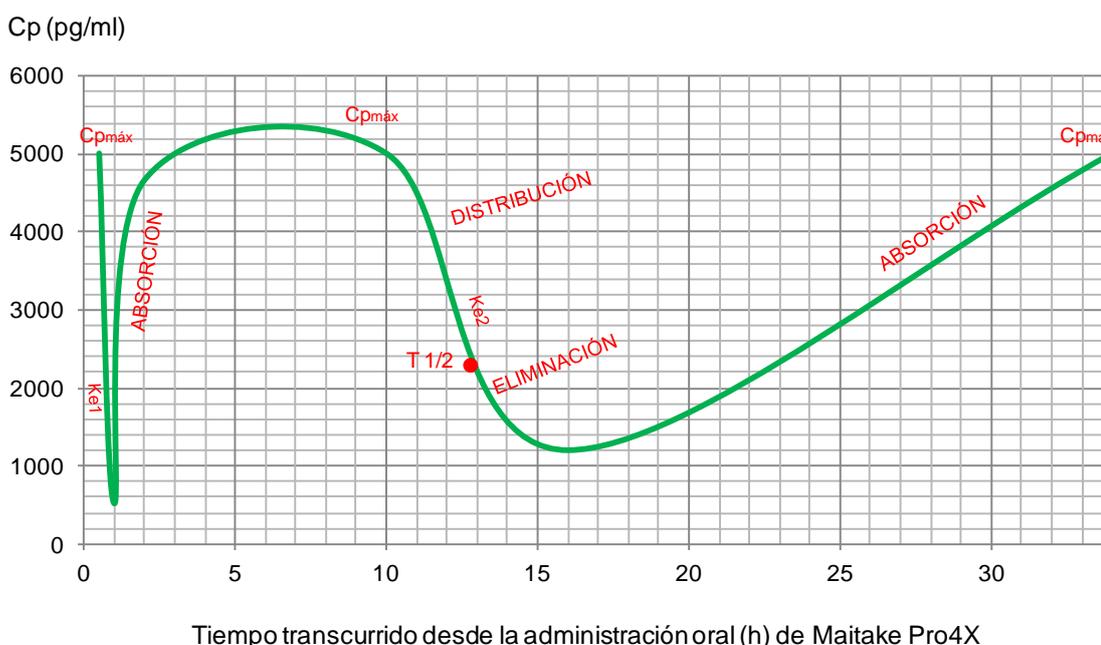


**Figura 111.4.** Efecto inmunorestaurador de Maitake en células esplénicas inmunes Ly6G y CD105. El ensayo citométrico se realizó en hembras BALB/c inmunosuprimidas con Dexametasona. Se graficó: **A)** Marcación Ly6G con diferencias no significativas de los % GPN (ns,  $p > 0,05$ ). **B)** Marcación CD105 con diferencias NO significativas de los % SC/MACROFAGOS (ns,  $p < 0,05$ ).

### IV.3.8 Farmacocinética de $\beta$ -glucanos

#### IV.3.8.1 Farmacocinética en administración oral

Se realizó la cuantificación plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos tras de la administración oral de Maitake PRO4X en ratones BALB/c. Para ello, se emplearon dos animales para cada tiempo (condición), realizándose al sacrificio de los mismos a las 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, 16 h, 24 h y 34 h. La determinación de 1,3- $\beta$ -glucanos se realizó por el ensayo colorimétrico del kit GlucateLL, efectuado en el laboratorio *Cape Cod Inc* de Maryland, EE.UU, el cual permitió obtener curvas de Concentración plasmática (pg/ml) vs tiempo post administración (horas) (Fig. 112). Los parámetros farmacocinéticos que se determinaron fueron ABC (área bajo la curva Cp vs tiempo),  $T_{1/2}$  (tiempo de vida media),  $C_{p\text{máx}}$  (concentración plasmática máxima),  $k_e$  (constante de eliminación),  $k_a$  (constante de absorción),  $T_{a1/2}$  (tiempo de vida media de absorción),  $V_d$  (volumen aparente de distribución) y  $Cl_t$  (aclaramiento sistémico total).



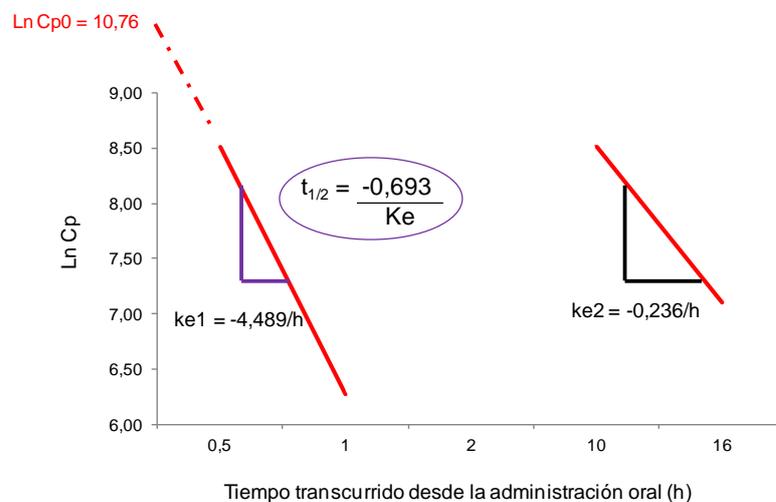
**Figura 112.4.** Concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos vs tiempo post administración oral. La sangre fue colectada durante el sacrificio de ratones BALB/c a tiempos preestablecidos. Las determinaciones plasmáticas de 1,3- $\beta$ -glucanos se efectuaron con el método colorimétrico del kit GlucateLL. Se observó tres picos de  $C_{p\text{máx}}$  tras la administración oral de Maitake PRO4X.

**1) Concentración plasmática máxima ( $C_{p\text{máx}}$ ) y Tiempo máximo ( $T_{\text{máx}}$ ).** Los resultados consignados en la Fig. 112.4, sugieren que los niveles plasmáticos de 1,3- $\beta$ -glucanos se incrementaron rápidamente tras la administración oral, presentando 3 picos de concentración plasmática máxima:

- 1° pico  $C_{p_{m\acute{a}x}} > 5000$  pg/ml a la media hora de la administración oral de Maitake.
- 2° pico  $C_{p_{m\acute{a}x}} > 5000$  pg/ml entre las 2 h y 10 h de la administración oral de Maitake.
- 3° pico  $C_{p_{m\acute{a}x}} > 5000$  pg/ml a las 34 h de la administración oral de Maitake.

Tras el primer pico  $C_{p_{m\acute{a}x}}$ , los niveles plasmáticos de 1,3- $\beta$ -glucanos descendieron abruptamente, produciéndose un nuevo pico  $C_{p_{m\acute{a}x}}$  entre las 2 h y 10 h. A partir de las 10 h, tuvo lugar un descenso gradual de la concentración de 1,3- $\beta$ -glucanos. Pero, a partir de las 16 h comenzó nuevamente un crecimiento progresivo de la concentración de 1,3- $\beta$ -glucanos que alcanzó un tercer pico  $C_{p_{m\acute{a}x}}$  a las 34 h de la administración oral.

**2) Constante de velocidad de eliminación ( $K_e$ ).** Los resultados consignados en la Fig. 112 sugieren que la eliminación de 1,3- $\beta$ -glucanos se corresponde con un modelo cinético de primer orden (monocompartimental). La Fig. 113.4 ilustra la representación semilogarítmica  $C_p$  vs tiempo (recta), a partir de la cual se pudieron determinar las constantes de eliminación (pendientes) denominadas  $K_{e1}$  (intervalo 0,5 h a 1 h) y  $K_{e2}$  (intervalo 10 h a 16 h). La primera constante  $K_{e1}$  presenta una velocidad de eliminación 4,489/h, y  $K_{e2}$  una velocidad 0,236/h. Esto indica alta velocidad de eliminación para el intervalo 0,5 h a 1 h, y eliminación más gradual entre las 10 h y 16 h. La primera eliminación ( $K_{e1}$ ) es 19 veces más rápida que la segunda ( $K_{e1} \approx 19 K_{e2}$ ).



**Figura 113.4.** Curvas semilogarítmicas  $C_p$  vs tiempo. La misma corresponde a los intervalos 0,5 h a 1 h y 10 h a 16 h post administración oral de 1,3- $\beta$ -glucanos. A partir de los gráficos obtenidos se determinaron las pendientes correspondientes a ambas  $ke$ , siendo 19 veces superior la pendiente de la primera  $ke$  respecto de la segunda  $ke$ .

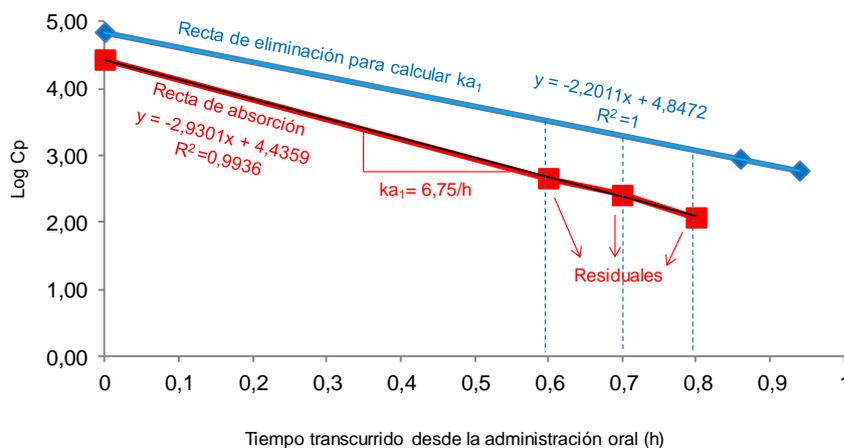
**3) Constante de velocidad de absorción ( $k_a$ ).** La constante de absorción  $k_a$  se determinó por el método de los residuales, suponiendo un modelo cinético de 1° orden con  $K_{a1} > K_{e1}$ . Primeramente, para calcular  $k_{a1}$ , se trazó la recta de eliminación  $\text{Log } C_p$  vs

tiempo en el intervalo 0,86 h a 0,94 h. Se realizó la extrapolación al eje de las ordenadas, resultando en una recta  $y = -2,2011x + 4,8472$  (Tabla 44.4) (Fig. 114.4).

**Tabla 44.4.** Determinación de  $ka_1$  por el método de los residuales. Se tomó como fase de eliminación el intervalo 0,86 h a 0,94 h post administración. Con los valores Log Cp en dicho intervalo se obtuvo la recta semilogarítmica de eliminación, siendo realizada la extrapolación a  $t=0$ .

Recta de eliminación para calcular $ka_1$		
Tiempo (h)	Cp (pg/ml)	Log Cp
0,86	900	2,95
0,94	600	2,78
ecuac recta	$y = -2,2011x + 4,8472$	
Intersección con el eje y	4,85	

Las Cp de absorción seleccionadas correspondieron a los tiempos 0,6 h (3850 pg/ml), 0,7 h (2300 pg/ml) y 0,8 h (1350 pg/ml). Para cada tiempo, se determinó el valor de Log Cp en la recta semilogarítmica de eliminación  $y = -2,2011x + 4,8472$ , resultando en 3,53 (0,6 h), 3,31 (0,7 h) y 3,09 (0,8 h). Aplicando antilogaritmo se obtuvo la Cp de eliminación resultando en 3388,44 pg/ml (0,6 h), 2041,74 pg/ml (0,7 h) y 1230,27 (0,8 h). Los residuales se calcularon por diferencia entre las Cp de la curva de administración oral y sus respectivos Cp en la recta de eliminación  $y = -2,2011x + 4,8472$ , resultando en 461,56 pg/ml (0,6 h), 258,26 (0,7 h) y 119,73 (0,8 h). Se aplicó logaritmo decimal a estos valores, y se obtuvo 2,664 (0,6 h), 2,412 (0,7 h) y 2,078 (0,8 h), que se tomaron para trazar la recta de absorción  $y = -2,9301x + 4,4359$ . La constante de absorción  $ka_1$  se calculó a partir de la pendiente de la recta de absorción  $y = -2,9301x + 4,4359$ , resultando  $ka_1 = 6,75/h$  (Fig. 114). Se verificó que  $ka_1 > ke_1$ .



Tiempo (h)	Cp (pg/ml) curva administración oral	Recta de eliminación		RESIDUALES (Cp elim-Cp abs)	Log RESIDUALES	Pendiente Log RESIDUALES	ka1
		Log Cp	Cp elim (pg/ml)				
0,6	3850	3,53	3388,44	461,56	2,664	2,930	6,75
0,7	2300	3,31	2041,74	258,26	2,412		
0,8	1350	3,09	1230,27	119,73	2,078		

**Figura 114.4.** Primera constante de absorción  $Ka_1$  de 1,3- $\beta$ -glucanos. La misma se determinó por el método de los residuales. Por diferencia entre los valores Cp de la recta de eliminación y Cp de la curva de administración oral para los tiempos 0,6 h, 0,7 h y 0,8 h se obtuvieron los valores residuales a partir de los cuales se graficó la recta de absorción. La pendiente de la recta permitió establecer la constante  $ka_1$ .

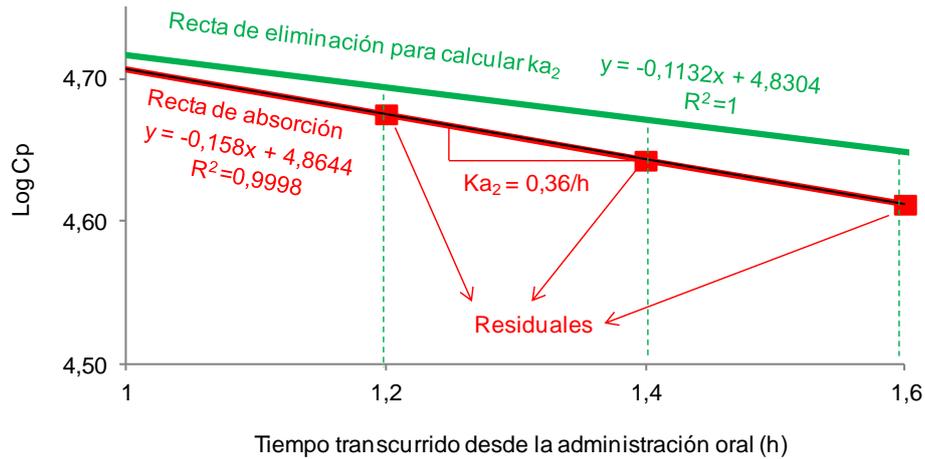
La segunda constante de absorción  $ka_2$  se determinó por el método de los residuales, suponiendo un modelo cinético de 1° orden con  $Ka_2 > Ke_2$ . La recta de eliminación Log Cp vs tiempo se trazó en el intervalo 13 h a 15 h, con su correspondiente extrapolación al eje de ordenadas, resultando en la recta  $y = -0,1144x + 4,83$  (Tabla 45.4) (Fig. 115.4).

**Tabla 45.4.** Valores para determinar  $ka_2$ . La misma se determinó por el método de los residuales, tomando como fase de eliminación el intervalo 13 h a 15 h post administración. Con los valores Log Cp en dicho intervalo se obtuvo la recta semilogarítmica de eliminación, siendo realizada la extrapolación a  $t=0$ .

Recta de eliminación para calcular $ka_2$		
Tiempo (h)	Cp (pg/ml)	Log Cp
13	2300	3,36
15	1350	3,13
ecuac recta	$y = -0,1132x + 4,8304$	
Intersección con el eje y		4,87

Las Cp de absorción elegidas en la curva de administración oral corresponden a los tiempos 1,2 h (1650 pg/ml), 1,4 h (2850 pg/ml) y 1,6 h (3750 pg/ml). Para cada uno de estos tres tiempos se determinó su valor Log Cp en la recta semilogarítmica de eliminación  $y = -0,1132x + 4,8304$ , resultando en 4,69 (1,2 h), 4,67 (1,4 h) y 4,65 (1,6 h). Aplicando antilogaritmo a estos tres valores se obtuvieron las Cp (pg/ml) de eliminación: 48977,88 pg/ml (1,2 h), 46773,51 pg/ml (1,4 h) y 44668,36 (1,6 h).

Los residuales se calcularon por diferencia entre las Cp (pg/ml) de la curva de administración oral y sus respectivos valores de Cp en la recta de eliminación  $y = -0,1132x + 4,8304$ , dando 47327,88 pg/ml (1,2 h), 43923,51 (1,4 h) y 40918,36 (1,6 h). Se aplicó logaritmo decimal a estos valores, obteniéndose 4,675 (1,2 h), 4,643 (1,4 h) y 4,612 (1,6 h), con los cuales se trazó la recta de absorción  $y = -0,158x + 4,8644$ . La constante de absorción  $ka_2$  se obtuvo de la pendiente de la recta de absorción  $y = -0,158x + 4,8644$ , resultando  $ka_2 = 0,36/h$ , lo cual sugiere que por hora se absorberá aproximadamente el 36% de las moléculas en disolución que están disponibles para absorberse (Fig. 115.4). Se verificó que  $ka_2 > ke_2$ . También se observó  $ka_1 > ka_2$ .



Tiempo (h)	Cp (pg/ml) curva administración oral	Recta de eliminación		RESIDUALES (Cp elim-Cp abs)	Log RESIDUALES	Pendiente Log RESIDUALES	ka2
		Log Cp	Cp elim (pg/ml)				
1,2	1650	4,69	48977,88	47327,88	4,675	0,158	0,36
1,4	2850	4,67	46773,51	43923,51	4,643		
1,6	3750	4,65	44668,36	40918,36	4,612		

**Figura 115.4.** Segunda constante de absorción  $Ka_2$  de 1,3- $\beta$ -glucanos. La misma se determinó por el método de los residuales. Por diferencia entre los valores Cp de la recta de eliminación y Cp de la curva de administración oral para los tiempos 1,2 h, 1,4 h y 1,6 h se obtuvieron los valores residuales a partir de los cuales se graficó la recta de absorción. La pendiente de la recta permitió establecer la constante  $ka_2$ .

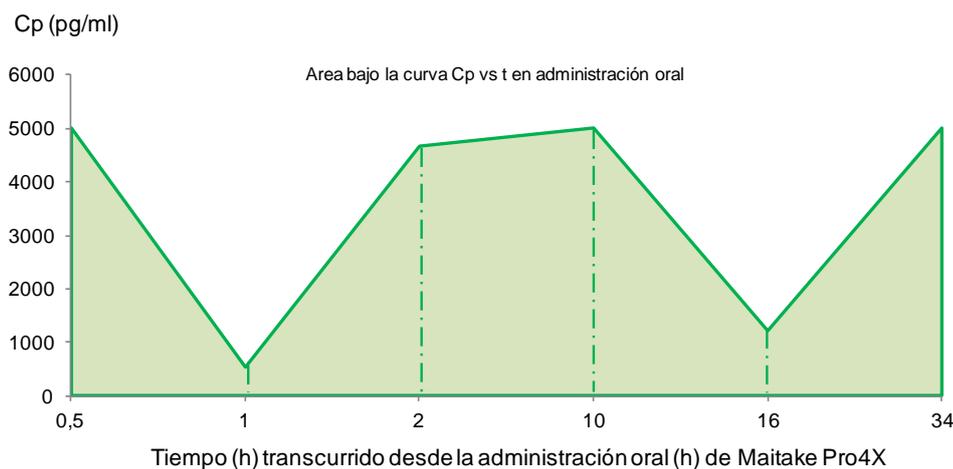
**4) Tiempo de vida media de absorción ( $Ta_{1/2}$ ).** A partir de ambas  $ka$ , se estableció el tiempo de vida media de absorción ( $ta_{1/2}$ ). Utilizando la expresión  $t_{1/2} = -0,693/ka$  se obtuvo para  $ka_1$  el  $ta_{1/2} = 0,1$  h, mientras que para  $ka_2$ , el  $ta_{2/2} = 1,9$  h. Estos resultados sugieren que la concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos que queda por absorberse, se redujo a la mitad a las 0,1 h y a las 1,9 h de la administración oral.

**5) Tiempo de vida media de eliminación ( $T_{1/2}$ ).** A partir de ambas  $ke$ , se estableció el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), mediante la expresión  $t_{1/2} = -0,693/Ke$ . Para el intervalo 0,5 a 1 h,  $t_{1/2} = 0,15$  h, mientras que, entre las 10 h a 16 h,  $t_{1/2} = 2,93$  h. La concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos se redujo a la mitad a las 0,65 h y a las 12,93 h de la administración oral.

**6) Volumen de distribución ( $Vd$ ).** El volumen aparente de distribución se calculó mediante la expresión  $Vd = dosis/Cp_0$ . La dosis administrada a los animales fue 120  $\mu$ g de  $\beta$ -glucanos (4  $\mu$ l Maitake PRO4X).  $Cp_0$  se determinó por extrapolación con el eje de las ordenadas ( $\ln Cp$ ) en el intervalo 0,5 h a 1 h (Fig. 113.4), resultando  $\ln Cp_0 = 10,76$ , y  $Cp_0 = 47098,67$  pg/ml. Como  $Vd = dosis/Cp_0 = 120000000$  pg/47098,67 pg.ml<sup>-1</sup>, resultando  $Vd = 2547,84$  ml (2,55 litros). De modo que, para un ratón de 20 g, el  $Vd = 2,55$  l/0,02 kg, es decir,  $Vd = 127$  ml/g (127 l/kg), esto es un gran valor de  $Vd$ .

**7) Clearance total ( $Cl_t$ ).** El aclaramiento sistémico total ( $Cl_t$ ) se determinó mediante la expresión  $Cl_t = V_d (-Ke)$ . Para  $Ke_1$ ,  $Cl_t = 2,55 \text{ l} \times 4,489 \text{ h}^{-1} = 11,45 \text{ l/h}$  (190,78 ml/min), mientras que para  $Ke_2$ , su  $Cl_t = 10,03 \text{ ml/min}$ .

**8) Area bajo la curva (ABC).** El área bajo la curva (ABC)  $C_p$  vs tiempo, que refleja la cantidad de compuesto biodisponible que llega a la circulación sistémica y es capaz de producir un efecto, se determinó mediante el método trapezoidal (Fig. 116.4), resultando en  $0,118 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  para el intervalo de tiempo 0 h a 34 h.



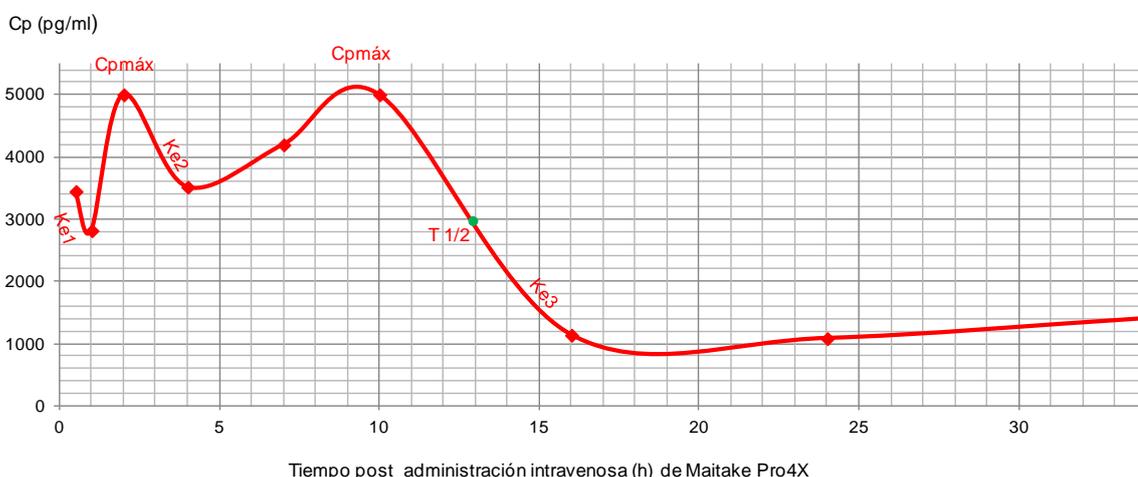
tiempo (h)	$C_p$ (pg/ml)	$ABC_0^t$ (pg x h/ml)
0,5	5000	1250
1	530	2632,5
2	4660	5227,5
10	5000	43867,5
16	1210	62497,5
34	5000	118387,5

**Figura 116.4.** Area bajo la curva (ABC) de  $C_p$  vs tiempo. La misma se determinó por el método trapezoidal, y corresponde a la administración oral de Maitake PRO4X en ratones BALB/c de ambos sexos. En la tabla inferior se indica el ABC para cada tiempo.

#### IV.3.8.2 Farmacocinética en administración intravenosa

Se realizó la cuantificación plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos tras de la administración intravenosa de Maitake PRO4X en la vena marginal de la cola de ratones BALB/c. Para ello, se emplearon dos animales para cada tiempo (condición), realizándose al sacrificio de los mismos a las 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, 16 h, 24 h y 34 h. La determinación de 1,3- $\beta$ -glucanos se realizó por el ensayo colorimétrico del kit GlucateLL, efectuado en el laboratorio *Cape Cod Inc* de Maryland, EE.UU, el cual permitió obtener curvas de Concentración plasmática (pg/ml) vs tiempo post administración (horas) (Fig. 117). Los parámetros farmacocinéticos que se determinaron fueron ABC (área bajo la curva  $C_p$

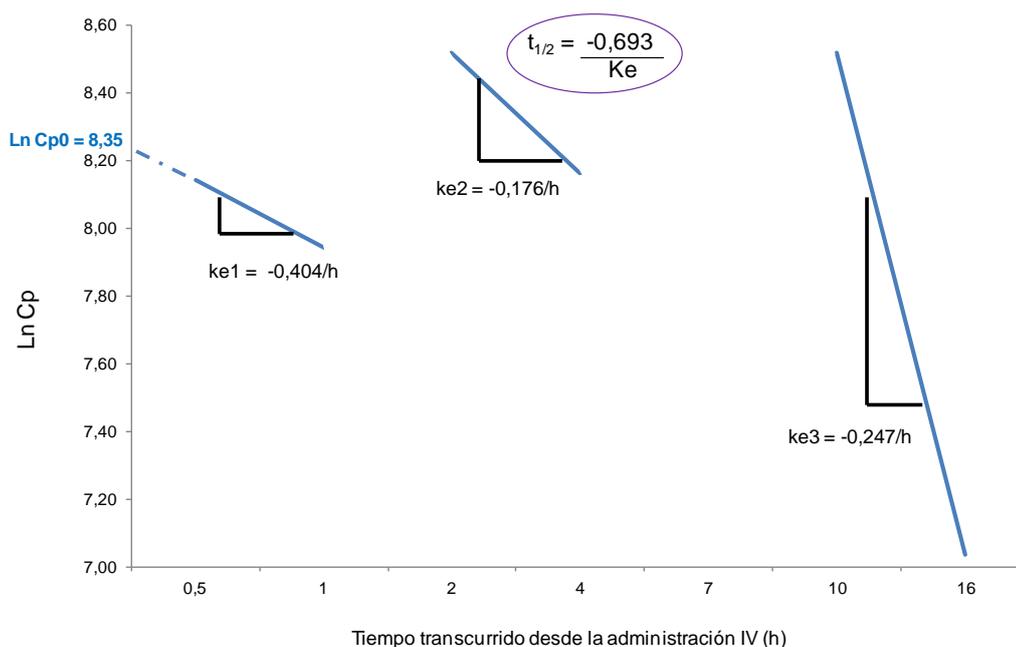
vs tiempo),  $T_{1/2}$  (tiempo de vida media de eliminación),  $C_{p\text{máx}}$  (concentración plasmática máxima),  $k_e$  (constante de eliminación),  $k_a$  (constante de absorción),  $T_{a1/2}$  (tiempo de vida media de absorción),  $V_d$  (volumen aparente de distribución) y  $Cl_t$  (aclaramiento sistémico total).



**Figura 117.4.** Concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos vs tiempo post administración intravenosa. La sangre fue colectada durante el sacrificio de ratones BALB/c a tiempos preestablecidos. Las determinaciones plasmáticas de 1,3- $\beta$ -glucanos se efectuaron con el método colorimétrico del kit GlucateLL. Se observó dos picos de  $C_{p\text{máx}}$  tras la administración intravenosa de Maitake PRO4X.

**1) Concentración máxima ( $C_{p\text{máx}}$ ) y Tiempo máximo ( $T_{\text{máx}}$ ).** Los resultados consignados en la Fig. 117.4 sugieren que los niveles plasmáticos de 1,3- $\beta$ -glucanos presentaron un abrupto descenso luego de la administración intravenosa, seguido de un rápido incremento de la concentración hacia un primer pico  $C_{p\text{máx}} > 5000$  pg/ml a las 2 h de administración. Esta  $C_{p\text{máx}}$  descendió gradualmente entre las 2 h y 4 h, pero nuevamente hizo un segundo pico  $C_{p\text{máx}}$  a las 10 h. Posteriormente, se produjo un tercer descenso gradual de los niveles plasmáticos de 1,3- $\beta$ -glucanos, que tendió a mantenerse constante durante el resto del ensayo.

**2) Constante de velocidad de eliminación ( $K_e$ ).** La eliminación de los 1,3- $\beta$ -glucanos administrados intravenosamente siguió una cinética de 1°orden (monocompartimental). La representación semilogarítmica  $C_p$  vs Tiempo resultó en una recta que permitió calcular tres cinéticas de eliminación:  $Ke_1$  (40,4 % de 1,3- $\beta$ -glucanos/h) para el intervalo 0,5 h a 1 h,  $Ke_2$  (17,6 % de 1,3- $\beta$ -glucanos/h) para el intervalo 2 h a 4 h, y  $Ke_3$  (24,7 % de 1,3- $\beta$ -glucanos/h) para el intervalo 10 h a 16 h (Fig. 118.4). Los resultados obtenidos sugieren que  $Ke_1 > Ke_3 > Ke_2$ , lo cual indica mayor velocidad de eliminación en el intervalo 0,5 h a 1 h (40,4 % de 1,3- $\beta$ -glucanos/h), y eliminación más gradual entre las 2 h y 4 h (17,6 % de 1,3- $\beta$ -glucanos/h).



**Figura 118.4.** Curvas semilogarítmicas  $C_p$  vs tiempo (h). La misma corresponde a 1,3- $\beta$ -glucanos administrados intravenosamente a los intervalos de tiempo 0,5 h a 1 h; 2 h a 4 h, y 10 h a 16 h. Con las rectas obtenidas se determinó su pendiente, la cual permitió calcular las constantes de eliminación  $k_e$ , siendo mayor la correspondiente a la primera eliminación del compuesto (0,5 h a 1 h).

**3) Velocidad de absorción ( $k_a$ ).** Las constantes de velocidad de absorción ( $k_a$ ) fueron determinadas por el método de los residuales. Para ello, se trazó la recta de eliminación  $\text{Log } C_p$  vs tiempo se trazó en el intervalo de tiempo 0,68 h a 0,80 h, con su correspondiente extrapolación al eje de ordenadas, resultando en  $y = -0,2823x + 3,6784$ , lo cual permitió determinar  $k_{a1}$  (Tabla 46.4).

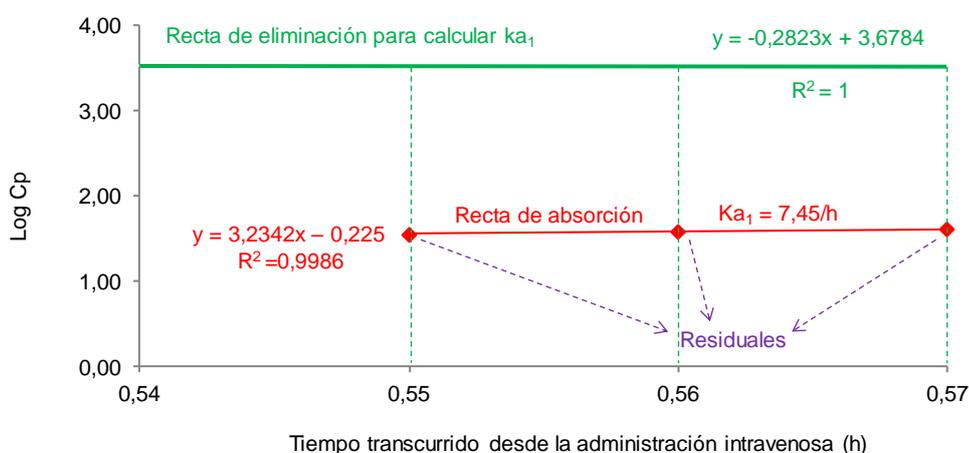
**Tabla 46.4.** Determinación de  $k_{a1}$  por el método de los residuales. Se tomó como fase de eliminación el intervalo 0,68 h a 0,80 h post administración IV. Con los valores  $\text{Log } C_p$  en dicho intervalo se obtuvo la recta semilogarítmica de eliminación, siendo realizada la extrapolación a  $t=0$ .

Recta de eliminación para calcular $k_{a1}$		
Tiempo (h)	$C_p$ (pg/ml)	$\text{Log } C_p$
0,68	3065	3,49
0,80	2835	3,45
ecuac recta	$y = -0,2823x + 3,6784$	
Intersección con el eje y		3,68

Los valores  $C_p$  seleccionados de la fase ascendente de la curva IV correspondieron a los tiempos 0,55 h (3370 pg/ml), 0,56 h (3350 pg/ml) y 0,57 h (3330 pg/ml). Para cada tiempo se determinó el  $\text{Log } C_p$  en la recta de eliminación  $y = -0,2823x + 3,6784$ ,

resultando en 3,523 (0,55 h), 3,520 (0,56 h) y 3,517 (0,57 h). Aplicando antilogaritmo a estos tres valores se obtuvo la Cp de eliminación: 3334,26 pg/ml (0,55 h), 3311,31 pg/ml (0,56 h) y 3288,52 (0,57 h).

Los residuales se calcularon por diferencia entre las Cp (pg/ml) de la curva de administración intravenosa y sus respectivos valores de Cp en la recta de eliminación  $y = -0,2823x + 3,6784$ , resultando 35,74 pg/ml (0,55 h), 38,69 (0,56 h) y 41,48 (0,57 h). Se aplicó logaritmo decimal a estos valores y se obtuvo 1,55 (0,55 h), 1,59 (0,56 h) y 1,62 (0,57 h), con los cuales se trazó la recta de absorción  $y = -3,2342x - 0,225$ . La constante  $ka_1$  se obtuvo de la pendiente de la recta, siendo  $ka_1 = 7,45/h$  (Fig. 119.4). Se verificó que  $ka_1 > ke_1$ .



Tiempo (h)	Cp (pg/ml) curva administración oral	Recta de eliminación		RESIDUALES (Cp elim-Cp abs)	Log RESIDUALES	Pendiente Log RESIDUALES	ka1
		Log Cp	Cp elim (pg/ml)				
0,55	3370	3,523	3334,26	35,74	1,55	3,23	7,45
0,56	3350	3,520	3311,31	38,69	1,59		
0,57	3330	3,517	3288,52	41,48	1,62		

**Figura 119.4.** Primera constante de absorción  $ka_1$  de 1,3- $\beta$ -glucanos. La misma se determinó por el método de los residuales. Por diferencia entre los valores Cp de la recta de eliminación y Cp de la curva oral para los tiempos 0,55 h, 0,56 h y 0,57 h se obtuvieron los valores residuales a partir de los cuales se graficó la recta de absorción. La pendiente permitió establecer  $ka_1$ .

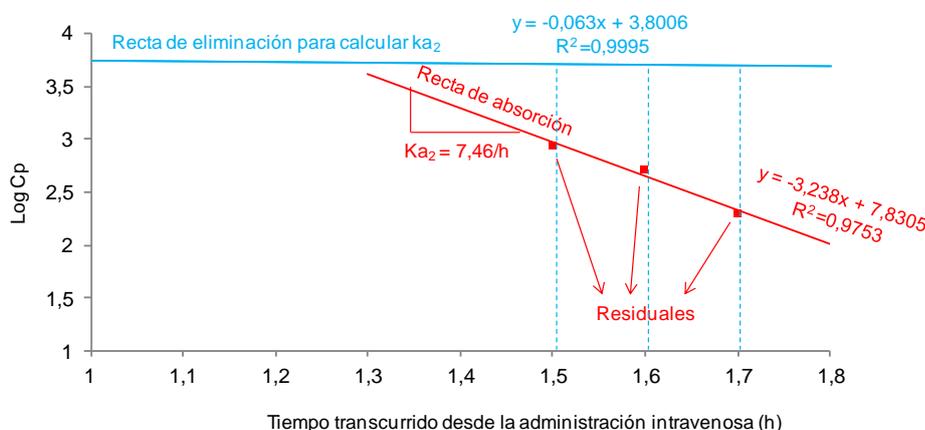
La segunda constante de absorción  $ka_2$  también se determinó por el método de los residuales. La recta de eliminación Log Cp vs tiempo para calcular  $ka_2$  se trazó para el intervalo de tiempo 3,2 h a 4 h, con su correspondiente extrapolación al eje de ordenadas, resultando en  $y = -0,063x + 3,8006$  (Tabla 47) (Fig. 120.4).

**Tabla 47.4.** Determinación de  $ka_2$  por el método de los residuales. Se tomó como fase de eliminación el intervalo 3,2 h a 4 h post administración IV. Con los valores Log Cp en dicho intervalo se obtuvo la recta semilogarítmica de eliminación, siendo realizada la extrapolación a  $t=0$ .

Recta de eliminación para calcular $ka_2$		
Tiempo (h)	Cp (pg/ml)	Log Cp
3,2	4000	3,60
4	3515	3,55
ecuac recta	$y = -0,063x + 3,8006$	
Intersección con el eje y	3,83	

Los valores Cp de la fase ascendente de la curva IV seleccionados corresponden a los tiempos 1,5 h (4250 pg/ml), 1,6 h (4500 pg/ml) y 1,7 h (4700 pg/ml). Para cada uno se determinó el valor Log Cp en la recta de eliminación  $y = -0,063x + 3,8006$ , resultando en 3,71 (1,5 h), 3,70 (1,6 h) y 3,69 (1,7 h). Aplicando antilogaritmo a estos tres valores se obtuvo la Cp (pg/ml) de eliminación: 5128,61 pg/ml (1,5 h), 5011,87 pg/ml (1,6 h) y 4897,79 (1,7 h).

Los residuales se calcularon por diferencia entre las Cp (pg/ml) de la curva IV y sus respectivos valores de Cp en la recta de eliminación  $y = -0,063x + 3,8006$ , resultando 878,61 pg/ml (1,5 h), 511,87 (1,6 h) y 197,79 (1,7 h). Se aplicó logaritmo decimal a estos valores, obteniéndose 2,94 (1,5 h), 2,71 (1,6 h) y 2,30 (1,7 h), con los cuales se trazó la recta de absorción  $y = -3,238x + 7,8305$ . La constante  $ka_2$  se obtuvo a partir de la pendiente de la recta, siendo  $ka_2 = 7,46/h$  (Fig. 120). Se verificó que  $ka_2 > ke_2$ .



Tiempo (h)	Cp (pg/ml) curva administración oral	Recta de eliminación		RESIDUALES (Cp elim-Cp abs)	Log RESIDUALES	Pendiente Log RESIDUALES	$ka_1$
		Log Cp	Cp elim (pg/ml)				
1,5	4250	3,71	5128,61	878,61	2,94	3,24	7,46
1,6	4500	3,70	5011,87	511,87	2,71		
1,7	4700	3,69	4897,79	197,79	2,30		

**Figura 120.4.** Segunda constante de absorción  $ka_2$  de 1,3- $\beta$ -glucanos. La misma se determinó por el método de los residuales. Por diferencia entre los valores Cp de la recta de eliminación y Cp de la curva oral para los tiempos 1,5 h, 1,6 h y 1,7 h se obtuvieron los valores residuales a partir de los cuales se graficó la recta de absorción. La pendiente permitió establecer  $ka_2$ .

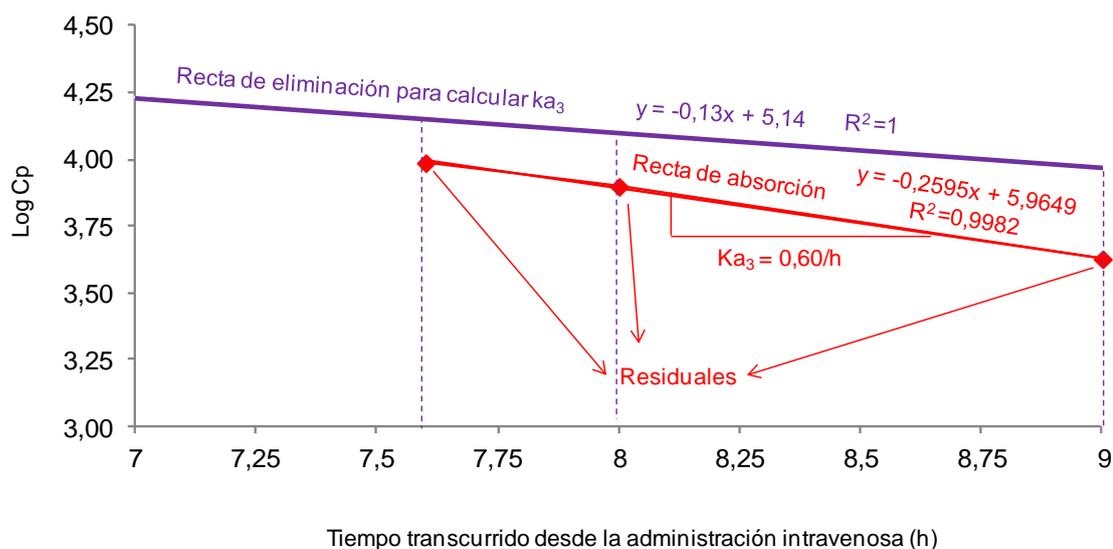
La tercera constante de absorción  $ka_3$  se determinó por el método de los residuales. La recta de eliminación Log Cp vs tiempo para calcular  $ka_3$  se trazó en el intervalo de tiempo 15 h a 16 h, con su correspondiente extrapolación al eje de ordenadas, resultando en  $y = -0,13x + 5,14$  (Tabla 48.4) (Fig. 121.4).

**Tabla 48.4.** Determinación de  $ka_3$  por el método de los residuales. Se tomó como fase de eliminación el intervalo 15 h a 16 h post administración IV. Con los valores Log Cp en dicho intervalo se obtuvo la recta semilogarítmica de eliminación.

Recta de eliminación para calcular $ka_3$		
Tiempo (h)	Cp (pg/ml)	Log Cp
15	1533	3,19
16	1140	3,06
ecuac recta	$y = -0,13x + 5,14$	
Intersección con el eje y		5,14

Los valores Cp de la fase ascendente de la curva IV seleccionados corresponden a los tiempos 7,6 h (4440 pg/ml), 8 h (4690 pg/ml) y 9 h (5100 pg/ml). Para cada uno de ellos se determinó el valor Log Cp en la recta de eliminación  $y = -0,13x + 5,14$  resultando en 4,15 (7,6 h), 4,10 (8 h) y 3,97 (9 h). Aplicando antilogaritmo a estos valores se obtuvo la Cp (pg/ml) de eliminación: 14125,38 pg/ml (7,6 h), 12589,25 pg/ml (8 h) y 9332,54 (9 h).

Los residuales se calcularon por diferencia entre las Cp (pg/ml) de la curva IV y sus respectivos valores de Cp en la recta de eliminación  $y = -0,13x + 5,14$  resultando 9685,38 pg/ml (7,6 h), 7899,25 (8 h) y 4232,54 (9 h). Se aplicó logaritmo decimal a estos valores, obteniéndose 3,99 (7,6 h), 3,90 (8 h) y 3,63 (9 h), con los cuales se trazó la recta de absorción  $y = -0,2595x + 5,9649$ . La constante  $ka_3$  se obtuvo a partir de la pendiente de la recta, siendo  $ka_3 = 0,60/h$  (Fig. 121.4). Se verificó que  $ka_3 > ke_3$ .



Tiempo (h)	Cp (pg/ml) curva administración oral	Recta de eliminación		RESIDUALES (Cp elim-Cp abs)	Log RESIDUALES	Pendiente Log RESIDUALES	ka3
		Log Cp	Cp elim (pg/ml)				
7,6	4440	4,15	14125,38	9685,38	3,99	0,26	0,60
8	4690	4,10	12589,25	7899,25	3,90		
9	5100	3,97	9332,54	4232,54	3,63		

**Figura 121.4.** Tercera constante de absorción  $Ka_3$  de 1,3- $\beta$ -glucanos. La misma se determinó por el método de los residuales. Por diferencia entre los valores Cp de la recta de eliminación y Cp de la curva oral para los tiempos 7,6 h, 8 h y 9 h se obtuvieron los valores residuales a partir de los cuales se graficó la recta de absorción. La pendiente permitió establecer la constante  $ka_3$ .

**4) Tiempo de vida media de absorción ( $ta_{1/2}$ ).** A partir de los valores  $ka$ , se estableció el tiempo de vida media de absorción ( $ta_{1/2}$ ) o tiempo que tarda en reducirse a la mitad la concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos que queda por absorberse. Mediante la expresión  $t_{1/2} = -0,693/ka$ , resultó  $ta_{1/2} = 0,09$  h tanto para  $ka_1$  y  $ka_2$ , y 1,2 h para  $ka_3$ .

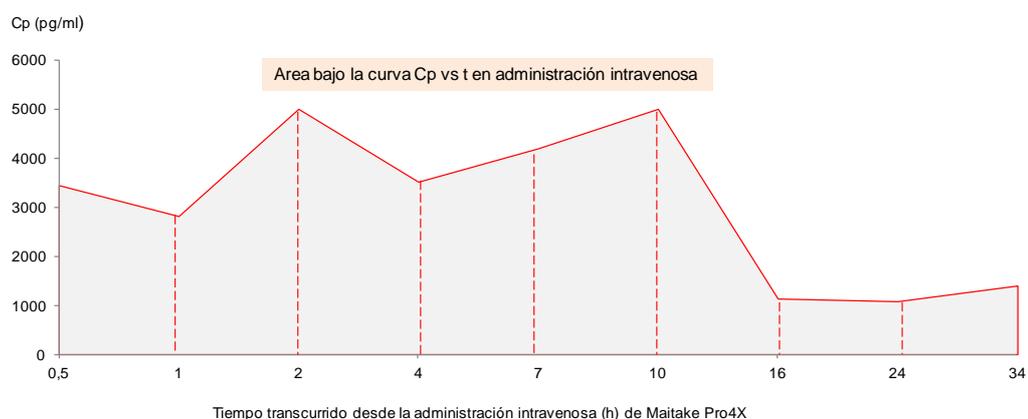
**5) Tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ).** A partir de  $ke$ , pudo establecerse el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), mediante la expresión  $t_{1/2} = -0,693/Ke$ . Se obtuvo que para  $ke_1$  el  $t_{1/2} = 1,7$  h, para  $ke_2$  fue 3,9 h, y 2,81 h para  $ke_3$ , de modo que la concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos se redujo a la mitad a las 1,7 h, a las 5,9 h y a las 12,81 h. Se observó que, durante la primera y segunda eliminación del compuesto, los niveles plasmáticos de 1,3- $\beta$ -glucanos aumentaron previo a alcanzar el tiempo de vida media.

**6) Volumen de distribución (Vd).** El volumen aparente de distribución se calculó mediante la expresión  $Vd = dosis/Cp_0$ . La dosis intravenosa administrada a los animales fue de 120  $\mu g$  de  $\beta$ -glucanos (4  $\mu l$  de Maitake Pro4X), mientras que la concentración plasmática al tiempo 0 ( $Cp_0$ ) se determinó por extrapolación con el eje de las ordenadas

( $\ln C_p$ ) en el intervalo 0,5 h a 1 h, resultando  $\ln C_{p0}=8,35$ , de modo que  $C_{p0}= 4230,18$  pg/ml. Por lo cual, el  $V_d = 1,2 \cdot 10^8 \text{ pg}/4230,18 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1} = 28367,59 \text{ ml}$  (28,37 l). Así, para un ratón de 20 g el  $V_d = 28,37 \text{ l}/0,02 \text{ kg} = 1418,5 \text{ l/kg}$  (1418,5 ml/g).

**7) Clearance total ( $Cl_t$ ).** El aclaramiento sistémico total ( $Cl_t$ ) se determinó a través de la expresión  $Cl_t=V_d (-K_e)$ . Para  $Ke_1$ , el  $Cl_t=28,37 \text{ l} \times 0,404 \text{ h}^{-1}= 11,46 \text{ l/h}$  (191 ml/min), para  $Ke_2$ , el  $Cl_t= 83,22 \text{ ml/min}$ , mientras que para  $Ke_3$ , el  $Cl_t= 116,79 \text{ ml/min}$ .

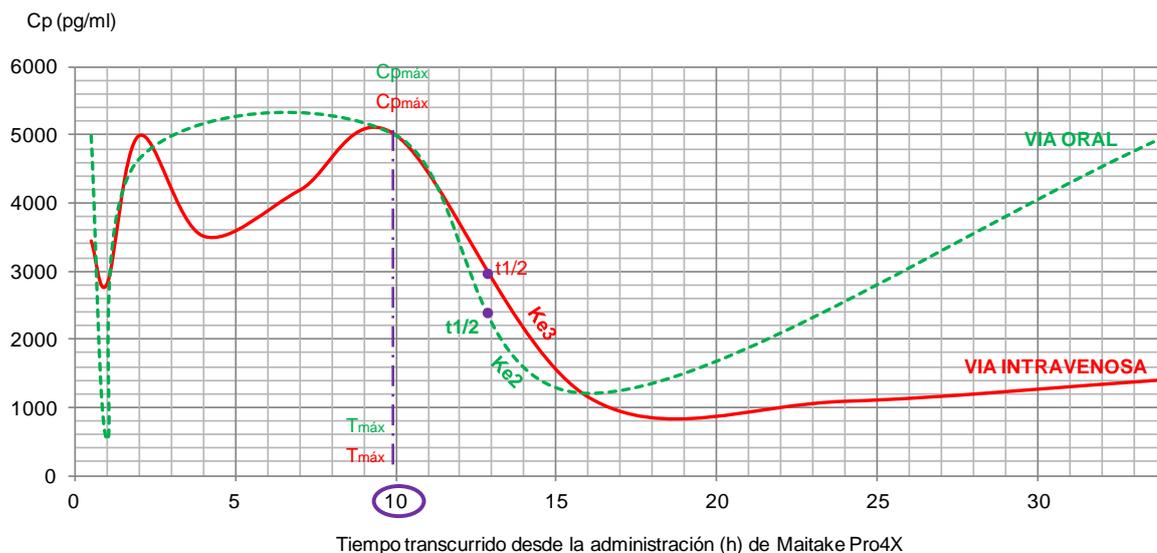
**8) Area bajo la curva (ABC).** El área bajo la curva (ABC) de  $C_p$  vs tiempo en administración IV fue determinado mediante el método trapezoidal (Fig. 122.4), dando  $0,08 \mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$  en el intervalo de tiempo 0 h a 34 h.



tiempo (h)	$C_p$ (pg/ml)	$ABC_0$ (pg x h/ml)
0,5	3445	861,25
1	2815	2426,25
2	5000	6333,75
4	3515	14848,75
7	4195	26413,75
10	5000	40206,25
16	1135	58611,25
24	1080	67471,25
34	1400	79871,25

**Figura 122.4.** Area bajo la curva (ABC) de  $C_p$  vs tiempo. La misma se determinó por el método trapezoidal, y corresponde a la administración intravenosa de Maitake PRO4X en ratones BALB/c de ambos sexos. En la tabla inferior se indica el ABC para cada tiempo.

Comparación de la farmacocinética vía oral vs vía intravenosa. Los parámetros farmacocinéticos de ambas vías se consignan en la Fig. 123.4. La comparación de los resultados obtenidos sugiere que algunas constantes de eliminación resultaron similares en ambas vías ( $ke_{3IV}$  y  $ke_{2oral}$ ). Por otra parte, ambas rutas coincidieron en un  $T_{máx}= 10$  h. El  $t_{1/2}$  de eliminación fue similar en ambas vías (12,93 h en oral y 12,81 h en IV). Se halló similitud en valores de aclaramiento sistémico total. No obstante, la vía IV presentó mayor volumen de distribución, pero menor ABC  $C_p$  vs tiempo.



PARAMETROS FARMACOCINÉTICOS	VIA DE ADMINISTRACION	
	ORAL	INTRAVENOSA
N° PICOS Cpmáx	3	2
Tmáx (h)	0,5; 10 y 34	2 y 10
Ka (h-1)	6,75 y 0,36	7,45; 7,46 y 0,6
Ke (h-1)	4,489 y 0,236	0,404; 0,176 y 0,247
T 1/2 (h)	0,65 y 12,93	12,81
Ta 1/2 (h)	0,1 y 1,9	0,09; 0,09 y 1,2
Cp0 (pg/ml)	47098,67	4230,18
Vd (l)	2,55	28,37
Cl sistémico total (ml/min)	190,78; 10,03	191; 83,22; 116,79
ABC <sup>34</sup> <sub>0</sub> (pg x h/ml)	118000	80000

**Figura 123.4.** Parámetros farmacocinéticos en vía oral e IV. Los mismos corresponden a la administración oral e intravenosa de Maitake PRO4X en ratones BALB/c de ambos sexos. La sangre fue colectada durante el sacrificio de los animales a tiempos preestablecidos y sobre plasma sanguíneo se efectuaron las determinaciones de 1,3-β-glucanos mediante el método colorimétrico del kit GlucateLL.

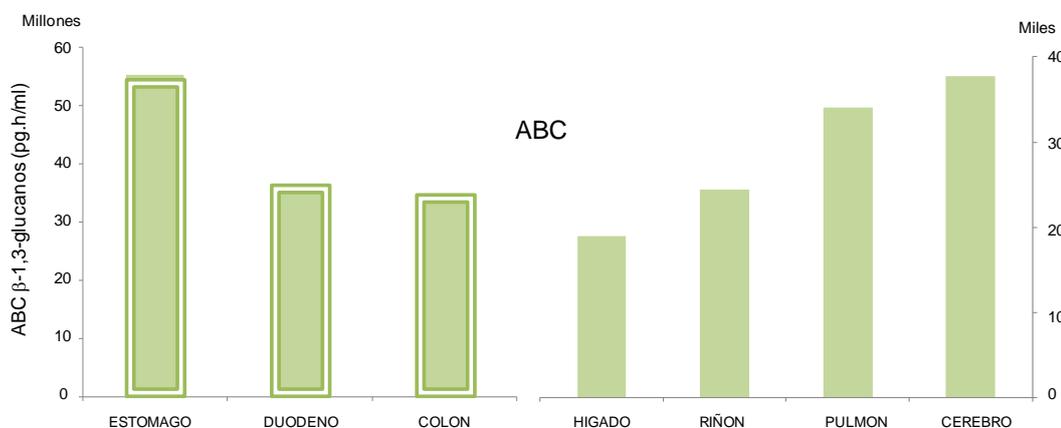
### IV.3.9 Biodistribución de $\beta$ -glucanos

#### IV.3.9.1 Biodistribución en administración oral

Se realizó la cuantificación tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos en distintos órganos murinos (hígado, riñón, duodeno, colon, pulmón y cerebro) luego de la administración oral de Maitake PRO4X. Se emplearon dos ratones BALB/c de ambos sexos por cada tiempo (condición), realizándose al sacrificio de estos y remoción de los órganos a las 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, 16 h, 24 h y 30 h. Las determinaciones de  $\beta$ -glucanos se realizaron por el ensayo colorimétrico del kit GlucateLL, efectuado en el laboratorio *Cape Cod Inc* de Maryland, EE.UU, permitiendo la obtención de curvas de Captación tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos vs tiempo post administración oral (Tabla 49.4) (Fig. 124.4).

**Tabla 49.4.** Biodistribución tisular  $\beta$ -glucanos. Se indica la captación, en distintos órganos murinos, de 1,3- $\beta$ -glucanos. Los tiempos corresponden a las 2 h, 7 h y 30 h post administración oral de la dosis terapéutica de Maitake PRO4X. Las determinaciones se efectuaron con el método colorimétrico del kit GlucateLL. Se calculó el área bajo la curva en cada órgano estudiado, relativizándolos a la distribución gástrica (tomada como 100% de captación). Se hallaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) entre los tiempos investigados.

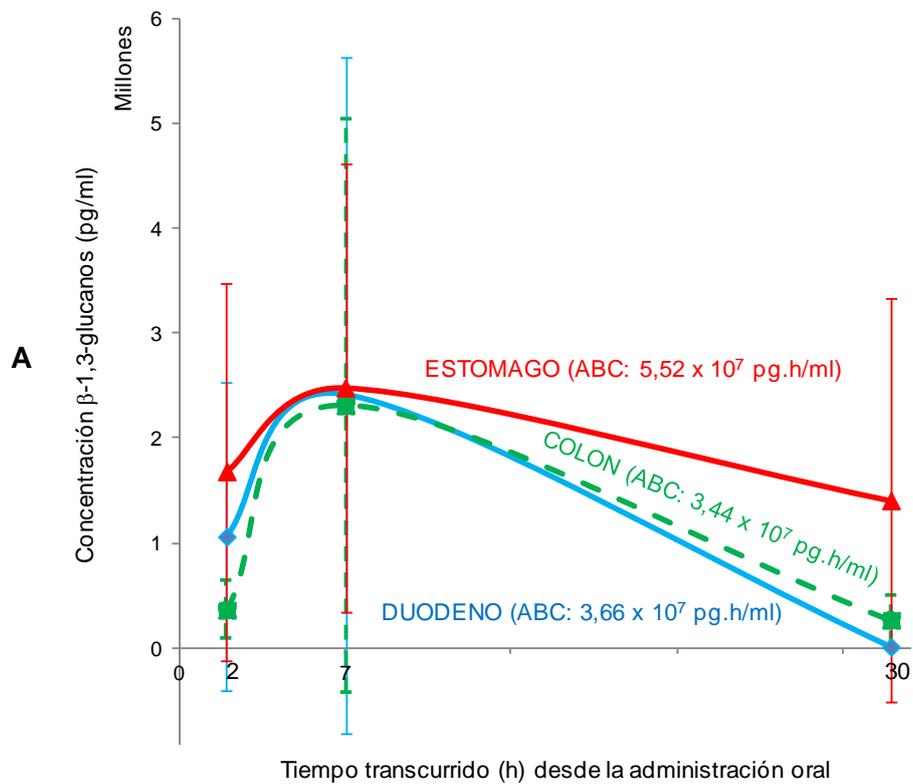
Biodistribución de $\beta$ -1,3-glucanos en órganos luego de la administración oral en ratones BALBc					
ORGANO	MEDIA $\pm$ DS (pg/ml)			ABC <sup>30h</sup> (pg x h/ml)	% BIODIST RELATIVO A ESTOMAGO
	2 h (n=2)	7 h (n=2)	30 h (n=2)		
ESTOMAGO	1685000 $\pm$ 1803122,29	2485000 $\pm$ 2142533,55	1408000 $\pm$ 1926158,87	5,52 x 10 <sup>7</sup>	100,00
DUODENO	1062500 $\pm$ 1467246,57	2416500 $\pm$ 3229356,67	10650 $\pm$ 919,24	3,66 x 10 <sup>7</sup>	66,30
COLON	363500 $\pm$ 277892,97	2315000 $\pm$ 2736503,24	268500 $\pm$ 242537,63	3,44 x 10 <sup>7</sup>	62,32
CEREBRO	280 $\pm$ 56,57	2515 $\pm$ 1152,58	155 $\pm$ 63,64	3,77 x 10 <sup>4</sup>	0,07
PULMON	1110 $\pm$ 1117,23	1850 $\pm$ 1781,91	475 $\pm$ 49,50	3,41 x 10 <sup>4</sup>	0,06
RIÑÓN	760 $\pm$ 367,7	1135 $\pm$ 1124,30	575 $\pm$ 572,76	2,44 x 10 <sup>4</sup>	0,04
HIGADO	380 $\pm$ 70,71	1155 $\pm$ 106,07 (*)	155 $\pm$ 63,64 (**)	1,89 x 10 <sup>4</sup>	0,03

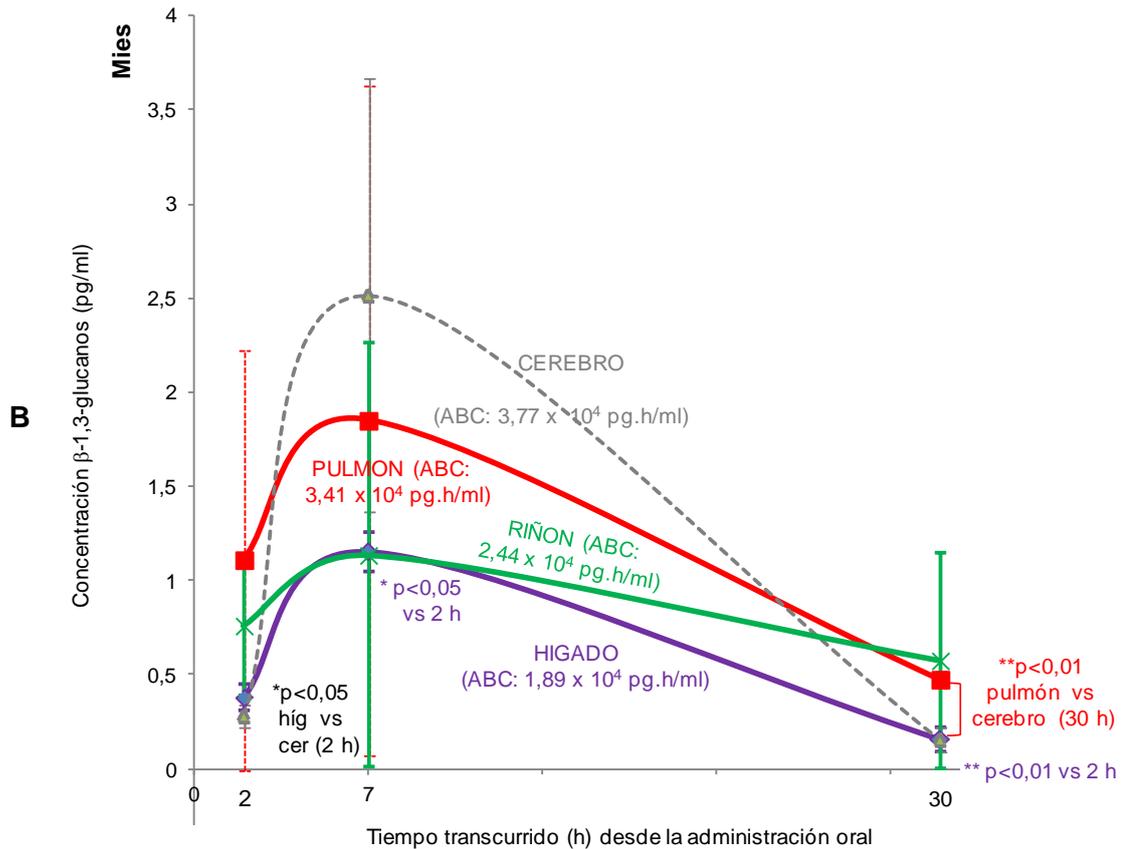


**Figura 124.4.** Biodistribución tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos. Se compararon las captaciones en los distintos órganos murinos entre las 2 h y las 30 h de la administración oral de Maitake PRO4X.

Las determinaciones se efectuaron con el método colorimétrico del kit GlucateLL. La biodistribución en los órganos gastrointestinales (estómago, duodeno, colon) fue del orden de los millones de pg.h/ml, mientras que en los demás fue de miles de pg.h/ml.

Los resultados consignados en la Tabla 50.4 y la Fig. 124.4 respecto de la captación tisular de  $\beta$ -glucanos tras la administración oral, sugieren que las mayores concentraciones ocurrieron en estómago ( $5,52 \times 10^7$  pg.h/ml), duodeno ( $3,66 \times 10^7$  pg.h/ml) y colon ( $3,44 \times 10^7$  pg.h/ml). Además, hemos registrado un importante nivel de captación en cerebro (ABC de  $3,77 \times 10^4$  pg.h/ml) y pulmón, y en menor medida a nivel hepático ( $1,89 \times 10^4$  pg.h/ml) y renal ( $2,44 \times 10^4$  pg.h/ml). El área bajo la curva de biodistribución tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos para los distintos órganos se indica en la Fig. 125.4.





**Figura 125.4.** Curvas de biodistribución tisular de  $\beta$ -glucanos. Las mismas corresponden al área bajo la curva de captación de 1,3- $\beta$ -glucanos de distintos órganos murinos tras la administración oral de Maitake PRO4X. Se indican los valores medios  $\pm$  2 desvíos estándar de: **A)** Captación gástrica, colónica y duodenal en millones de pg/ml. **B)** Captación cerebral, pulmonar, hepática y renal en miles de pg/ml. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) entre las captaciones tisulares y sus tiempos.

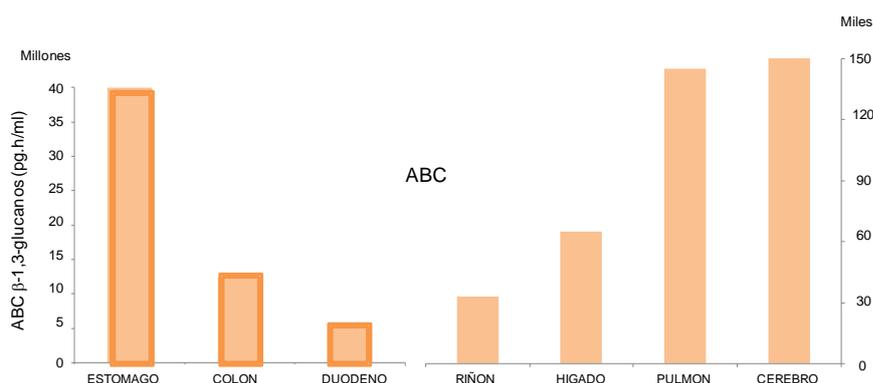
Los resultados consignados en la Fig. 125.4 de área bajo la curva de captación tisular de  $\beta$ -glucanos, sugieren que la mayor captación hepática (Fig. 125.4-B) se produce a las 7 h (\* $p < 0,05$  vs 2 h), y la menor a las 30 h (con \*\* $p < 0,01$  vs 2 h). Por otra parte, la captación hepática a las 2 h es significativamente mayor a la que sucede a igual tiempo en cerebro (con \* $p < 0,05$ ). Asimismo, la captación cerebral a las 30 h es significativamente menor a la ocurrida a igual tiempo en pulmón (con \*\* $p < 0,01$ ).

## IV.3.9.1 Biodistribución en administración intravenosa

Se realizó la cuantificación tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos en distintos órganos murinos (hígado, riñón, duodeno, colon, pulmón y cerebro) luego de la administración intravenosa de Maitake PRO4X a través de la vena marginal de la cola. Se emplearon dos ratones BALB/c de ambos sexos por cada tiempo (condición), realizándose al sacrificio de los mismos y remoción de los órganos a las 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 10 h, 16 h, 24 h y 30 h. Las determinaciones de  $\beta$ -glucanos se realizaron por el ensayo colorimétrico del kit GlucateLL, efectuado en el laboratorio *Cape Cod Inc* de Maryland, EE.UU, permitiendo la obtención de curvas de Captación tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos vs tiempo post administración intravenosa (Tabla 50.4) (Fig. 126.4).

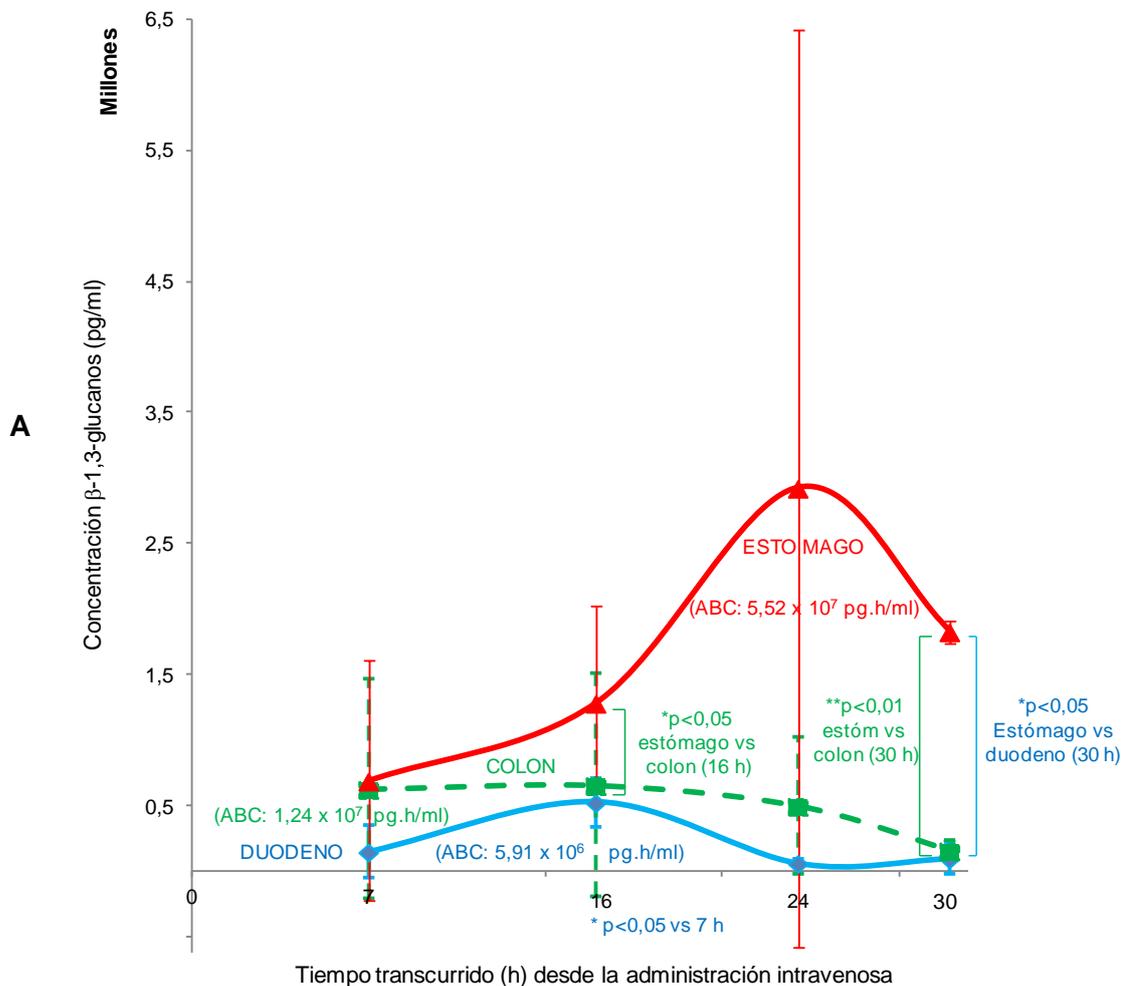
**Tabla 50.4.** Biodistribución tisular  $\beta$ -glucanos. Se indica la captación, en distintos órganos murinos, de 1,3- $\beta$ -glucanos. Los tiempos corresponden a las 7 h, 16 h, 24 h y 30 h post administración intravenosa de la dosis terapéutica de Maitake PRO4X. Las determinaciones se efectuaron con el método colorimétrico del kit GlucateLL. Se calculó el área bajo la curva en cada órgano estudiado, relativizándolos a la distribución gástrica (tomada como 100% de captación). Se hallaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) entre los tiempos investigados.

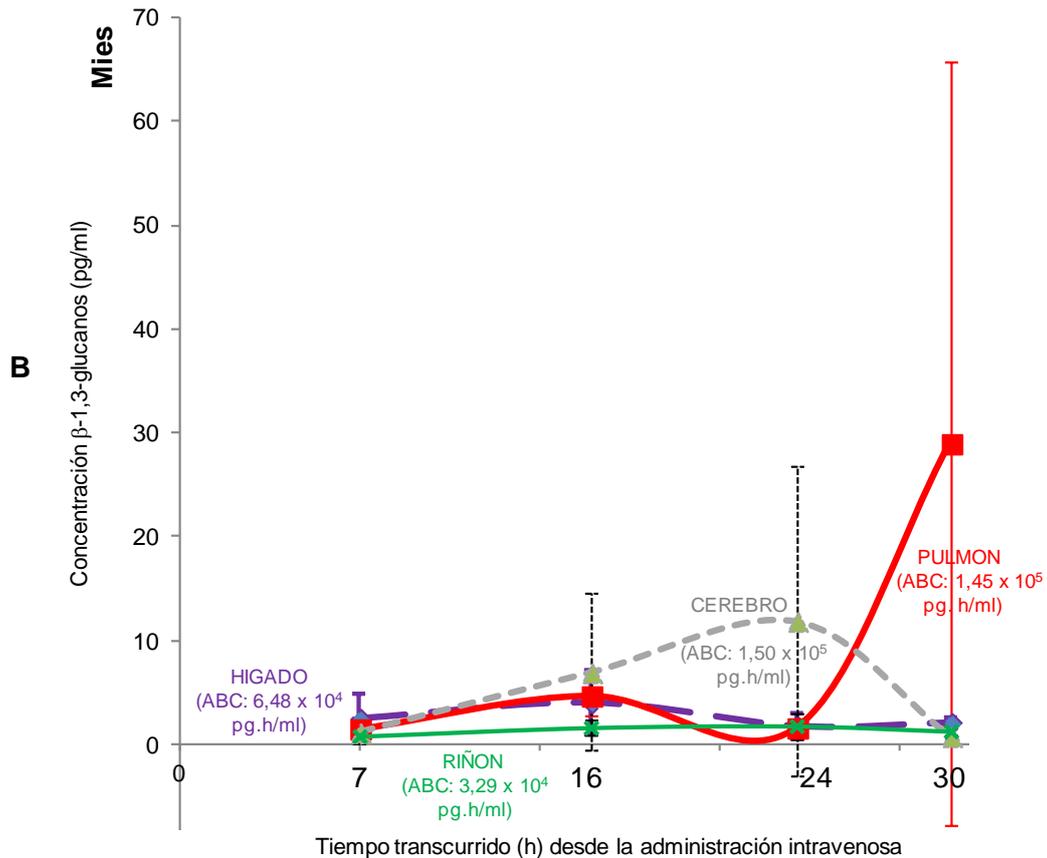
Biodistribución de $\beta$ -1,3-glucanos en órganos luego de la administración intravenosa						
ORGANO	MEDIA $\pm$ DS (pg/ml)				ABC <sup>30</sup> <sub>7h</sub> (pg x h/ml)	% BIODISTRIB RELATIVO A ESTOMAGO
	7 h (n=2)	16 h (n=2)	24 h (n=2)	30 h (n=2)		
ESTOMAGO	692000 $\pm$ 916410,39	1285000 $\pm$ 742462,12	2925000 $\pm$ 3500178,57	1830000 $\pm$ 84852,81	4,00 x 10 <sup>7</sup>	100,00
COLON	628000 $\pm$ 837214,43	657000 $\pm$ 852770,78	499500 $\pm$ 523966,12	159500 $\pm$ 71417,78	1,24 x 10 <sup>7</sup>	31,00
DUODENO	150700 $\pm$ 205485,23	527000 $\pm$ 188090,40 (*)	64500 $\pm$ 31819,81	100100 $\pm$ 117238,30	5,91 x 10 <sup>6</sup>	14,78
CEREBRO	1175 $\pm$ 1067,73	6950 $\pm$ 7566,04	11900 $\pm$ 14849,24	800 $\pm$ 98,99	1,50 x 10 <sup>5</sup>	0,38
PULMON	1520 $\pm$ 707,11	4700 $\pm$ 1838,48	1620 $\pm$ 424,26	28980 $\pm$ 36797,84	1,45 x 10 <sup>5</sup>	0,36
HIGADO	2535 $\pm$ 2354,67	4050 $\pm$ 3040,56	1800 $\pm$ 1216,22	2115 $\pm$ 431,34	6,48 x 10 <sup>4</sup>	0,16
RIÑON	765 $\pm$ 516,19	1590 $\pm$ 735,39	1740 $\pm$ 1244,51	1245 $\pm$ 770,75	3,29 x 10 <sup>4</sup>	0,08



**Figura 126.4.** Biodistribución tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos. Se compararon las captaciones de los distintos órganos murinos entre las 7 h y las 30 h de la administración intravenosa de Maitake PRO4X. Las determinaciones se efectuaron con el método colorimétrico del kit GlucateLL. La biodistribución en los órganos gastrointestinales (estómago, duodeno, colon) fue del orden de los millones de pg.h/ml, mientras que en los demás fue de miles de pg.h/ml.

Los resultados consignados en la Tabla 50.4 y la Fig. 126.4 de área bajo la curva de captación tisular de  $\beta$ -glucanos post administración intravenosa, sugieren que la mayor captación tuvo lugar a nivel gastrointestinal, como en la administración oral, siendo nuevamente el estómago el órgano de mayor acumulación ( $4 \times 10^7$  pg.h/ml), seguido de colon ( $1,24 \times 10^7$  pg.h/ml) y duodeno ( $5,91 \times 10^6$  pg.h/ml). También se observó un importante nivel de captación cerebral ( $1,5 \times 10^5$  pg.h/ml) y pulmonar ( $1,45 \times 10^5$  pg.h/ml). En menor medida, se registró biodistribución en hígado ( $6,48 \times 10^4$  pg.h/ml) y riñón ( $3,29 \times 10^4$  pg.h/ml). El área bajo la curva de biodistribución tisular de  $\beta$ -glucanos se indica en la Fig. 127.4.





**Figura 127.4.** Curvas de biodistribución tisular de  $\beta$ -glucanos. Las mismas corresponden al área bajo la curva de captación de 1,3- $\beta$ -glucanos de distintos órganos murinos tras la administración intravenosa de Maitake PRO4X. Se indican los valores medios  $\pm$  2 desvíos estándar de: **A)** Captación gástrica, colónica y duodenal en millones de pg/ml. **B)** Captación cerebral, pulmonar, hepática y renal en miles de pg/ml. Se observaron diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) entre las captaciones tisulares y sus tiempos.

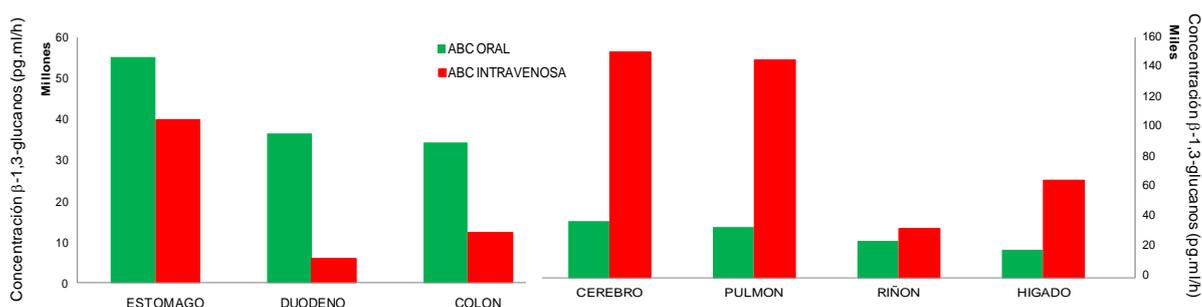
Los resultados consignados en la Fig. 127.4 de área bajo la curva de captación gastrointestinal de  $\beta$ -glucanos, sugieren que la mayor captación duodenal se produce a las 16 h (\* $p < 0,05$  vs 7 h). Mientras que la captación gástrica a las 16 h y 30 h fue significativamente mayor que la de colon a igual tiempo (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  respectivamente). Por otra parte, la captación gástrica a las 30 h fue significativamente mayor que la duodenal a igual tiempo (\* $p < 0,05$ ).

Biodistribución tisular de  $\beta$ -glucanos en administración oral vs intravenosa. El área bajo la curva (pg.h/ml) de biodistribución tisular de  $\beta$ -glucanos por ambas vías de administración se resume en la tabla 53.4 y Fig. 128.4 y 129.4. Los resultados obtenidos sugieren que los mayores niveles de captación se produjeron en el sistema

gastrointestinal (estómago, duodeno y colon) para ambas vías de administración. Mientras que la menor captación se registró en hígado y riñón para ambas vías. Comparativamente, la acumulación gastrointestinal resultó mayor tras la administración oral (Fig. 129.4). Sin embargo, la captación cerebral, pulmonar, renal y hepática fue superior tras la administración intravenosa.

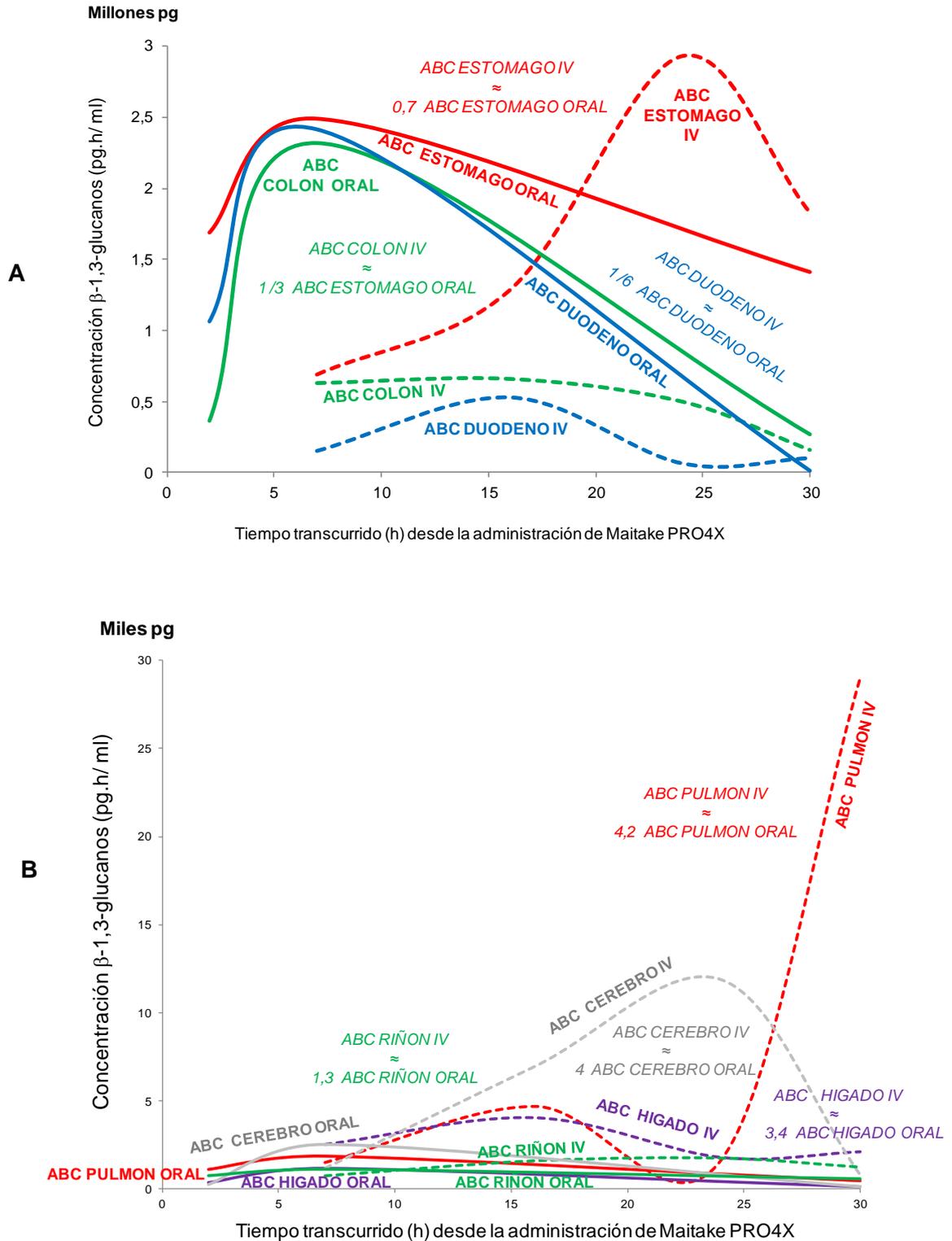
**Tabla 51.4.** Biodistribución tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos. Se compara el área bajo la curva (pg.ml/h) de ambas vías de administración (oral e intravenosa) para cada uno de los órganos estudiados. La administración oral presentó mayor biodistribución de  $\beta$ -glucanos en órganos gastrointestinales, mientras que la vía intravenosa tuvo mayor captación en cerebro, pulmón, hígado y riñón. Se consignan, además, valores relativos a ambas vías de administración.

Biodistribución tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos post administración oral e intravenosa de Maitake Pro4X			
ORGANO	AREA BAJO LA CURVA DE BIODISTRIBUCION TISULAR (pg x ml/h)		CAPTACION TISULAR POR VIA INTRAVENOSA RELATIVA A LA VIA ORAL
	ORAL	INTRAVENOSA	
ESTOMAGO	$5,52 \times 10^7$	$4,00 \times 10^7$	0,72
DUODENO	$3,66 \times 10^7$	$5,91 \times 10^6$	0,16
COLON	$3,44 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7$	0,36
CEREBRO	$3,77 \times 10^4$	$1,50 \times 10^5$	3,98
PULMON	$3,41 \times 10^4$	$1,45 \times 10^5$	4,25
RIÑON	$2,44 \times 10^4$	$3,29 \times 10^4$	1,35
HIGADO	$1,89 \times 10^4$	$6,48 \times 10^4$	3,43



**Figura 128.4.** Biodistribución tisular de 1,3- $\beta$ -glucanos. Se compara ABC de los distintos órganos murinos en administración oral (columnas verdes) e intravenosa (columnas rojas). La biodistribución en los órganos gastrointestinales (estómago, duodeno, colon) fue del orden de los millones de pg.h/ml en ambas vías, mientras que en los demás fue de miles de pg.h/ml.

Las curvas de Captación tisular de  $\beta$ -glucanos de ambas vías se comparan en la Fig. 129.4.



**Figura 129.4.** Curvas de biodistribución tisular de  $\beta$ -glucanos. Las mismas corresponden al área bajo la curva de captación de 1,3- $\beta$ -glucanos de distintos órganos murinos tras la administración oral e intravenosa de Maitake PRO4X. Se indican los valores medios  $\pm$  2 desvíos estándar de: **A)** Captación gástrica, colónica y duodenal en millones de pg/ml. **B)** Captación cerebral, pulmonar, hepática y renal en miles de pg/ml. Se consignan los valores relativos de ABC.

## **V- DISCUSSION**



Existen muchos reportes que asocian el consumo regular de los extractos purificados de *Grifola frondosa* (Fracción D de Maitake) con numerosos beneficios terapéuticos, fundado en su potencial antitumoral e inmunoactivador. Sin embargo, no se han realizado estudios exhaustivos sobre aspectos farmacológicos, farmacocinéticos y toxicológicos que garanticen seguridad, inocuidad y eficacia en la administración a un paciente.

Las propiedades antitumorales e inmunopotenciadoras de Fracción D de Maitake han sido poco exploradas para su aplicación en patologías tumorales mamarias o cuadros clínicos de inmunosupresión. Por esta razón, la presente Tesis Doctoral pretende profundizar la investigación de los aspectos farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos de los  $\beta$ -glucanos de Fracción D de Maitake, así como también sus efectos terapéuticos en la prevención y el tratamiento del cáncer de mama, la recuperación de poblaciones linfocitarias específicas y la interacción con drogas oncológicas convencionales (Tamoxifeno, Ciclofosfamida, Doxorubicina). Ello con la finalidad de realizar un aporte significativo al desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas que permitan optimizar la utilización farmacológica de los  $\beta$ -glucanos de Maitake.

Como parte de nuestros estudios experimentales, hemos observado en ensayos de caracterización fisicoquímica, que los valores de pH de los extractos purificados de Maitake medidos a 20°C (temperatura ambiente) y 37°C (temperatura corporal), resultaron ácidos (pH=5,6 en Maitake Standard y 5,8 en Maitake PRO4X). La semejanza de estos valores -pese a las diferentes temperaturas y concentración de  $\beta$ -glucanos: el producto PRO4X cuadruplica al Standard en la concentración proteoglucánica-, nos sugiere independencia de pH respecto de la temperatura y la concentración glicoproteica. Por otra parte, ambos productos resultaron solubles en solventes polares (agua, metanol, etanol) e insolubles en solventes apolares (n-hexano, acetato de etilo), demostrando su naturaleza hidrofílica y polar. Asimismo, observamos una relación inversa entre la concentración proteoglucánica y la solubilidad en solventes polares apróticos (como acetona), siendo el extracto glicoproteico más concentrado (PRO4X) insoluble en acetona, y el menos concentrado (Standard) soluble en acetona. Más aún, Maitake PRO4X demostró solubilidad en sustancias de pH ácido (ácido clorhídrico), pH neutro (agua destilada), y pH alcalino (bicarbonato), en cuyo último caso se observó ligera ionización. Asimismo, resultó insoluble en aceite, resaltando su naturaleza hidrofílica. Respecto de la concentración proteoglucánica total, hemos observado un contenido de producto coincidente con lo declarado en el rótulo para Maitake PRO4X, pero la mitad del contenido declarado en la versión Standard. Como el envase analizado de este último había sido previamente utilizado, es probable que el producto se hubiera degradado, oxidado o variado su composición química con el tiempo. Lo hasta aquí expuesto, nos sugiere que Fracción D de Maitake tiene naturaleza hidrofílica y polar. La similitud de pH del producto con el pH gastrointestinal hace pensar en una buena absorción a ese nivel, lo cual se asocia con lo discutido más abajo de nuestros resultados de biodistribución para administración oral e intravenosa. Tsukagoshi S y Col. (1984) [203] habían reportado que, tras la administración oral de basidiomicetes en ratas, fragmentos de  $\beta$ -glucanos radiomarcados fueron absorbidos en el tracto digestivo. Sin embargo, el alto peso molecular de los  $\beta$ -glucanos del extracto de Maitake, hace

pensar en la gran dificultad de dichas moléculas para atravesar las membranas biológicas por difusión simple, requiriendo de un receptor específico tras el ingreso a la circulación sistémica, a fin de desencadenar su acción molecular mediada por segundos mensajeros intracelulares. Nakashima A y Col. (2018) [204] en coincidencia con Brown y Col. (2001, 2002) [205, 206] habían reportado que el receptor de membrana Dectina-1 reconoce  $\beta$ -glucanos con enlaces  $\beta$ -1,3 y/o  $\beta$ -1,6 presentes en las paredes fúngicas, proponiendo a dicho receptor como un nuevo blanco terapéutico para los efectos inmunomoduladores de los  $\beta$ -glucanos. Dado que numerosos reportes científicos asocian el efecto antitumoral de *G. frondosa* (Maitake) a la capacidad inmunoactivadora de sus  $\beta$ -glucanos, nos propusimos investigar el efecto antitumoral directo del extracto de Maitake sobre cultivos *in vitro* de células tumorales mamarias, con independencia del rol inmunoactivador que pudieran tener sus  $\beta$ -glucanos. Para ello, tratamos cultivos tumorales mamarios de la línea MCF-7 (humana) con el extracto glicoproteico de Maitake, y observamos que la mayor dosis ensayada de Maitake Standard (367  $\mu$ g/ml) reducía significativamente (\* $p < 0,05$ ) la viabilidad celular hasta un 40% (40,38 + 8,65) luego de 24 horas de tratamiento. Por otra parte, dicha dosis inducía muerte celular esencialmente por un mecanismo apoptótico (95,83%  $\pm$  1,08 con \* $p \leq 0,05$ ) tras 24 horas de incubación con Maitake. Empleando dosis inferiores de 367  $\mu$ g/ml observamos también porcentajes estadísticamente significativos de muerte celular dosis-dependiente. Estos resultados nos han sugerido que a determinada concentración de Maitake Standard, los  $\beta$ -glucanos reducirían la viabilidad celular MCF-7, señalando la existencia de un umbral de activación de muerte tumoral, para células que naturalmente se resisten a morir dadas sus características de crecimiento *in vitro* y *comunicación intercelular* (pérdida de inhibición por contacto, invasividad, etc.). Si el mecanismo de muerte desencadenado por los proteoglucanos fuera dependiente de la acción de un receptor de membrana, podría inferirse que solo una concentración lo suficientemente alta de  $\beta$ -glucanos (como  $\geq 367 \mu$ g/ml) resultaría capaz de activar las vías de transducción de señales para generar muerte de células tumorales MCF-7. Konno S (2007) [207] estudió el efecto de varios compuestos comerciales derivados de hongos comestibles y observó que la Fracción GD de Maitake redujo la viabilidad de células tumorales de bazo en más del 90% luego de 72 horas de tratamiento. Shomori K y Col. (2009) [208], por su parte, y en concordancia con nuestros resultados, hallaron que el extracto ME de Maitake (en concentración del 10%), redujo la viabilidad de células tumorales gástricas humanas (línea MTK-1) de 40% a 60% a las 24 horas, y 10% a las 72 horas de tratamiento. Más recientemente, Alonso y Col. (2017) [209] indicaron en una curva de dosis-respuesta, que 300  $\mu$ g/ml de Maitake PRO4X redujeron la viabilidad de células tumorales murinas LM3 en cultivo *in vitro* a 62,5% a las 24 horas, 27% a las 48 horas y 23 % a las 72 horas de tratamiento.

Los resultados de nuestro ensayo TUNEL con células tumorales mamarias MCF-7, sugirieron que el mecanismo de muerte inducido por Maitake fue esencialmente apoptótico. La máxima dosis ensayada de Maitake Standard (367  $\mu$ g/ml) indujo un 95% (95,83  $\pm$  1,04) de apoptosis en la población de células tumorales MCF-7. Hemos observado que la relación entre el % de apoptosis y la concentración de Maitake fue directamente proporcional y resultó dosis-dependiente. Talles resultados sugieren que los componentes glicoproteicos de Maitake estimularían la expresión de genes específicos inductores de apoptosis celular. Fullerton S y Col. (2000) [210], examinaron

el efecto antitumoral de los  $\beta$ -glucanos de Maitake (Grifon D) en cultivos *in vitro* de células de cáncer prostático (línea PC-3), y hallaron en estudios dosis-respuesta que 480  $\mu\text{g/ml}$  de  $\beta$ -glucanos de Maitake (Grifon D) indujeron 95% de apoptosis celular tumoral tras 24 horas de tratamiento, en un mecanismo parcialmente originado por elevación del estrés oxidativo inducido por Maitake, sugiriendo una acción terapéutica sobre el cáncer prostático. Shomori K y Col. (2009) [208], por su parte, observaron que el extracto ME de Maitake reducía por apoptosis la viabilidad de células tumorales gástricas humanas (línea MTK-1). Mientras que Degen M y Col. (2013) [211], demostraron que la combinación de Fracción D de Maitake + Vitamina K3 causaba significativa disminución de la viabilidad celular en carcinoma renal (línea ACHN) a través del arresto del ciclo celular en fase G1 mediado por p21 (WAF1), culminando en muerte apoptótica.

Los resultados de nuestros ensayos de expresión génica en células tumorales mamarias MCF-7 tratadas con Maitake Standard, sugirieron una regulación del perfil de expresión génica por parte de los componentes glicoproteicos del compuesto purificado. Hemos hallado cambios en la expresión de genes específicos asociados a la supresión del fenotipo tumoral mamario con funciones apoptóticas, de supresión tumoral y reparación de DNA. Nuestros resultados sugieren que Maitake incrementa la expresión de múltiples genes pro-apoptóticos desencadenantes de muerte celular programada como BAK1, BCLAF1, BCL2L13, RASSF2, FADD y SPARC. Inactiva la vía anti-apoptótica PI3K-AKT (bloqueadora de muerte tumoral); activa genes supresores de tumores como PTEN y RASSF2; sobreexpresa a genes inhibidores del crecimiento y la proliferación celular tumoral como RBBP4, IGFBP5, CAV1, p27/kip1; estimula la vía antiproliferativa TGF- $\beta$ ; inactiva las vías proliferativas AKT, IGF y NF-kappa-B. Up-regula genes bloqueadores de metástasis e invasividad tumoral como ITGA2, ITGA9, MTSS1, CAV1, y reduce la expresión del marcador molecular CD44 asociado a metástasis. Tales resultados sugieren la capacidad de los  $\beta$ -glucanos de activar un receptor de membrana específico desencadenante de la cascada de señales intracelulares que conduzcan, por ejemplo, a la regulación de la transcripción génica de determinadas proteínas asociadas al transporte proteico o a la regulación del ciclo celular, entre algunas de las funciones reguladas por el extracto glicoproteico. La enorme variedad de genes específicos con diversidad de funciones biológicas que resultan modulados por Maitake (metabolismo, transporte, síntesis, ciclo celular, fosforilación, etc.), nos hace pensar en la inmensa heterogeneidad y multiplicidad de funciones sobre las cuales Maitake podría ejercer un efecto directo. Li Z y Col. (2000) [212] han afirmado que la apoptosis representa una defensa celular intrínseca contra la tumorigénesis, y específicamente BAK-1, inductor de apoptosis, podría utilizarse en terapia génica antitumoral por jugar un importante rol en el desencadenamiento de la muerte celular programada. También demostraron que la inactividad del mismo era seguida del desarrollo de células tumorales [212]. Pues bien, nuestros ensayos RT-PCR demostraron que Maitake induce aumentos significativos en la expresión de BAK-1, alcanzándose la máxima sobreexpresión génica con 367  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard. La proteína BAK-1 podría ser estimulada por la conversión de BID a tBID (BH3 Interacting Domain death agonist) estimulado por las proteínas caspasas 1 o 7. La proteína BAK-1 oligomerizada estimula la membrana mitocondrial y produce la liberación de factores mitocondriales tales como Citocromo C (en nuestros estudios up-regulado 5,75 veces respecto del Control con 367  $\mu\text{g/ml}$  de Maitake Standard), APAF-1 (Up-regulado 4,64 veces respecto del control) y procaspasa-7 para

formar un complejo proteico o apoptosoma. Posteriormente, la caspasa 7 (sobreeexpresada por Maitake) es capaz de activar a la caspasa-1 desencadenando el proceso apoptótico en células tumorales mamarias MCF-7.

Prosiguiendo con nuestros ensayos *in vitro*, analizamos si los efectos apoptóticos de Maitake PRO4X se extendían también a las células mamarias normales (línea humana MCF-10A), como ocurría con las células tumorales mamarias MCF-7. Lo que hallamos fue que ninguna de las concentraciones ensayadas de  $\beta$ -glucanos de Maitake indujo muerte celular -con significancia estadística-. Más aún, no observamos cambios significativos de viabilidad o proliferación celular ( $p > 0,05$ ) para ninguno de los tiempos de incubación ensayados (24 h, 48 h, 72 h). Si consideramos que Maitake en células tumorales mamarias MCF-7 aumenta significativamente la muerte celular apoptótica y reduce la viabilidad celular, pero no existe ese efecto en células mamarias normales MCF-10A, queda evidenciada la toxicidad selectiva de los componentes glicoproteicos del extracto con especificidad sobre las células tumorales. Este hallazgo representa una enorme ventaja sobre las mayoría de las drogas quimioterapéuticas convencionales que inducen apoptosis en mayor o menor medida sobre todas las células en división activa, sanas y enfermas, careciendo de especificidad, y provocando numerosos e incluso graves efectos adversos que terminan por reducir la calidad de vida del paciente. Los resultados presentados hasta aquí nos permiten inferir que Maitake en células mamarias normales, no promueve la cascada de señales intracelulares desencadenantes de muerte apoptótica. Choromanska A y Col. (2018) [213] han reportado recientemente que los  $\beta$ -glucanos de avena poseen importantes propiedades antitumorales, pero nula toxicidad sobre células normales. Respecto de los receptores celulares, Zhu W y Col. (2014) [214] han reportado la presencia de receptores Dectina-1 en células epiteliales mamarias de rata, mientras que Xia Y y Col. (2016) [215] asociaron la expresión predominante del receptor Dectina-1 en células claras de carcinoma renal con un peor pronóstico en pacientes que padecen la enfermedad.

Otro de nuestros ensayos *in vitro*, permitió evidenciar que el tratamiento de células tumorales mamarias MCF-7 con Maitake + Laminarina (inhibidor Dectina-1), redujo significativamente el efecto de muerte celular desencadenado por Maitake ( $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren una mayor afinidad de los receptores dectina-1 por Laminarina que por  $\beta$ -glucanos de Maitake. Además, un probable complejo Laminarina-Dectina impediría la unión de los  $\beta$ -glucanos al receptor tumoral bloqueando el mecanismo que conduce a la muerte celular programada. Nuestros resultados aquí presentados concuerdan con los publicados por Ujita M y Col. (2009) [216], quienes reportaron en macrófagos humanos una estricta especificidad de unión del receptor Dectina-1 a ciertos ligandos, y el bloqueo de la unión de  $\beta$ -glucanos a su receptor por efecto de la Laminarina. Por otra parte, nuestros ensayos revelaron que el bloqueo de los receptores dectina-1 con Laminarina no modifica el efecto reductor de viabilidad tumoral de Maitake, sino que solo disminuye la muerte tumoral inducida por los proteoglucanos. En ese sentido, Cui F y Col. (2007) [217] han reportado que los péptidos-polisacáridos de *Grifola frondosa* pueden ejercer acción antiproliferativa en células de cáncer gástrico humano (línea celular SGC-7901) mediante un mecanismo de arresto del ciclo celular, además de inducir muerte celular. Mientras que Louie B y Col. (2010) [218] y Pyo P y Col. (2008) [219], observaron un efecto antiproliferativo

sinérgico sobre células de cáncer de próstata (línea celular PC3) inducido por activación de la protein kinasa dependiente de DNA bicatenario (DNA-PK) que podría actuar en la fase G1 del ciclo celular para detener el crecimiento tumoral.

El efecto directo de los proteoglicanos de Maitake PRO4X + Verapamilo (quelante del calcio extracelular) en células tumorales MCF-7 lo estudiamos en cultivos *in vitro*. Observamos que todos los cultivos tratados con Verapamilo presentaron destrucción celular masiva, con enorme campo de detritos y restos celulares, lo cual reveló un efecto celular tóxico por parte de Verapamilo 734 µg/ml. Yakisich JS y Col. (2017) [220] han reportado un rol clave de la apoptosis en la eliminación de células pulmonares cancerígenas muy resistentes por efecto de Verapamilo + Sorafenib. Por su parte, Pajak B y Col. (2012) [221] publicaron que Verapamilo inicia un proceso autofágico de muerte en células de adenocarcinoma de colon humano (línea celular COLO 205). Nuestros resultados, demostraron que Maitake no fue capaz de ejercer efecto en presencia de Verapamilo 734 µg/ml, sugiriendo la necesidad del ión  $Ca^{2+}$  extracelular para el desarrollo del proceso apoptótico. La ausencia de un umbral mínimo de  $Ca^{2+}$ , resultaría incompatible con la vida celular ya que serían bloqueados todos los mecanismos moleculares dependientes de la activación de receptores y segundos mensajeros intracelulares de la vía celular.

Nuestros ensayos *in vitro* también fueron realizados sobre células tumorales mamarias murinas LM3, a los fines de investigar el efecto de los β-glucanos de Maitake en líneas celulares no humanas. Observamos que los valores de muerte celular relativa no variaron significativamente ( $p > 0,05$ ) al incrementarse las concentraciones y los tiempos de incubación con Maitake. Sin embargo, Alonso E y Col. (2017) [209] habían reportado que la dosis de 570,6 µg/ml de Fracción D de Maitake por 24 horas, reducía la viabilidad de células tumorales murinas LM3. Sin perjuicio de ello, comprobamos que Maitake también ejerce un efecto de muerte celular en cultivos tumorales murinos LM3, además del ya observado para células tumorales humanas MCF-7. Es importante destacar que la línea tumoral MCF-7 es clasificada molecularmente dentro del fenotipo luminal A de cáncer de mama (por sus receptores de estrógeno ER y progesterona PR y ausencia del receptor Her-2) [222], mientras que la línea tumoral murina LM3 carece de tales receptores. Ello sugiere que la muerte celular inducida por Maitake no requiere de tales receptores. Esto representa una opción terapéutica significativa en el tratamiento de neoplasias mamarias de fenotipos tumorales agresivos, como el triple negativo (fenotipo basal carente de receptores de estrógeno, progesterona y Her-2), que suele ser los de peor pronóstico por la ausencia de blancos terapéuticos hormonales.

También hemos investigado en células tumorales mamarias murinas LM3 los efectos *in vitro* de la quimioterapia combinada (Doxorrubicina + Ciclofosfamida), observando que la muerte celular se incrementaba con el aumento de la concentración de Doxorrubicina + Ciclofosfamida, duplicándose a las 48 horas de tratamiento ( $*p < 0,05$ ). Kugawa y Col. (2004) [223] había investigado previamente la muerte inducida por Doxorrubicina y Ciclofosfamida en células tumorales MCF-7, observando que Ciclofosfamida inducía un 20% de muerte apoptótica, mientras que Doxorrubicina conseguía el 60% de muerte por mecanismos no apoptóticos. La administración conjunta de estas drogas más 5-fluorouracilo, llegaba al 60% de muerte por mecanismos completamente no apoptóticos. Comparando nuestros resultados *in vitro* de los tratamientos quimioterapia y Maitake

PRO4X en células tumorales murinas LM3, hallamos que la muerte inducida por quimioterapia fue significativamente mayor (\* $p < 0,05$ ) a la generada por Maitake, pero solo a las 24 horas de tratamiento, puesto que con la incubación a 48 h y 72 h no se observaban diferencias significativas de muerte entre ambos tratamientos. Estos resultados nos sugieren un efecto antitumoral gradual de Maitake al inicio del tratamiento, pero igualmente efectivo en el corto y mediano plazo que la quimioterapia. Creemos entonces que la gradualidad de acción de Maitake en células tumorales LM3 podría estar asociada a un mecanismo apoptótico de muerte [209], mientras que la mayor rapidez de acción de las drogas quimioterápicas se deba a mecanismos no apoptóticos [223].

Los estudios de toxicidad aguda (a dosis única) se encuentran dentro de la batería de ensayos de primera línea imprescindibles para estimar el potencial tóxico de una sustancia, siendo recomendable completar la caracterización toxicológica del nuevo producto con ensayos a dosis repetidas [224, 225]. En nuestro estudio de dosis única, valoramos la toxicidad aguda *in vivo* de los  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X empleando un modelo experimental murino de ratones BALB/c. Los mismos recibieron una dosis oral única de 2000 mg/kg peso de extracto glicoproteico (400 veces superior a la considerada terapéutica) siendo observados durante dos semanas. Los resultados obtenidos nos permitieron situar la DL50 del producto por encima de los 2000 mg/kg de peso, ya que no registramos la muerte de ningún animal. Respecto del peso corporal, la dosis administrada indujo un efecto regulador de peso, impidiendo aumentos significativos del mismo respecto del Control, en especial en los machos. El peso aumentó significativamente en ratones macho del grupo Control, los cuales eran adultos jóvenes, en etapa de crecimiento y desarrollo. Resulta indudable entonces la existencia de un efecto residual de Maitake sobre la regulación del peso corporal transcurrido cierto tiempo de la administración. Varios reportes dan cuenta de la capacidad de Maitake de inhibir la ganancia de peso y de grasa corporal [226, 227]. Coincidiendo con nuestros resultados, Minamino K y Col. (2008) observaron que Maitake inhibía la acumulación metabólica de triglicéridos [228]. Por otra parte, como el peso es uno de los parámetros que mejor revela el estado de salud general del animal, observamos que 2000 mg/kg de Maitake PRO4X no inducen reducciones significativas del mismo, y en machos BALB/c contribuyen a regularlo. Respecto del consumo alimentario, el tratamiento con la dosis aguda reguló las cantidades de alimentos ingeridos respecto del Control, tanto en machos como en hembras: los ratones tratados presentaron menor consumo alimentario que los controles, lo cual podría asociarse con el menor peso corporal observado. Huang X y Col. (2011) [229] reportaron para ratones obesos menor incremento de peso corporal y menor ingesta energética al aumentar el consumo de  $\beta$ -glucanos. Mientras que Vitaglione P y Col. (2009) [230], por su parte, demostraron que los  $\beta$ -glucanos pueden controlar el apetito al modular las sensaciones de saciedad mediante la Grelina y el Péptido Y, con reducción del consumo energético. En cuanto a las manifestaciones clínicas y conductuales registradas en nuestros ensayos, observamos midriasis (en hembras Control y Tratadas), distensión abdominal (en el grupo Control), letargia (en el Control), piloerección (en el grupo Tratado). Estos signos se registraron tras la ingesta de un gran volumen de líquido (500  $\mu$ l) en un muy corto período de tiempo (30-50 minutos), representado casi la mitad de la volemia de los animales. Cabe mencionar que los  $\beta$ -glucanos son un tipo de fibra soluble naturalmente

presente en cereales como avena y cebada, aunque también pueden hallarse en algas y setas [231]. Se trata de un polímero lineal de unidades de glucosa conectadas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) y  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) [232]. Se localizan principalmente en las paredes celulares del endosperma del grano de avena [233], cuyo contenido en  $\beta$ -glucanos varía según las condiciones de cultivo y de crecimiento [234]. Diferentes estudios reportan una variación de 2 a 3 veces el contenido del polímero para diversos cultivos de avena [235 – 237]. Además, el glucano es regulado por la enzima  $\beta$ -glucanos endohidrolasa (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4), que degrada la pared celular del endosperma durante la germinación [238], o la preparación de alimentos [239], reduciendo la concentración del polímero. Por ello, su contenido en el grano de avena puede variar de 1,8% a 5,5%, alcanzado en algunas variedades del cereal hasta un 7% del peso seco total [240], aunque lo más habitual es hallarlo en un 4 - 5,5% [241 – 243]. Al igual que otros tipos de fibras solubles, los  $\beta$ -glucanos forman geles viscosos en el tracto gastrointestinal retrasando el vaciamiento gástrico e interfiriendo con la actividad de diferentes enzimas pancreáticas, lo que ralentiza los procesos digestivos y la absorción de nutrientes [243-245] al tiempo que incrementa la excreción de ácidos biliares [246 – 247]. Tal viscosidad se relaciona con algunos efectos sanitarios como reducción de la glucosa plasmática postprandial, mejoramiento de la respuesta insulínica, y disminución del colesterol sanguíneo entre otros [245, 247- 249]. Tanto el peso molecular como la conformación de los  $\beta$ -glucanos de avena son factores a considerar, ya que influyen en las propiedades físicas del alimento, como solubilidad y viscosidad [234] y, por ende, en los efectos sobre la salud. Wolever y Cols. [250], luego de analizar en individuos sanos el efecto hipocolesterolemizante de cereales de desayuno con  $\beta$ -glucanos de avena de diferentes pesos moleculares, observaron que el consumo de cereales de peso molecular alto (2210 kDa) y medio (530 kDa) reducía la concentración sérica de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en forma similar en ambos casos (5%), siendo un 50% más baja cuando el peso molecular del  $\beta$ -glucano era bajo (210 kDa). Diversos estudios han señalado que para que este tipo de polímeros de la avena produzcan un impacto en la reducción del colesterol sanguíneo es necesario que el mismo posea un peso molecular de al menos 1200 kDa [251- 252], factor a tener en cuenta junto con la cantidad de  $\beta$ -glucanos ingeridos, en los estudios de eficacia sobre el colesterol sanguíneo [234, 243, 253]. Regresando a nuestros estudios de toxicidad aguda, observamos en los animales Control que ingirieron 500  $\mu$ l de agua destilada, signos de ligera toxicidad probablemente asociados a la hiperhidratación aguda, lo cual habría generado dilución rápida y excesiva del sodio sanguíneo (hiponatremia). Esto pudo resultar en un descenso de la presión osmótica plasmática e hipoosmolaridad (baja tonicidad). Dado que el ión  $\text{Na}^+$  juega un papel esencial en la conducción del impulso nervioso, una hiponatremia severa podría causar depleción de la función cerebral. Sin embargo, los mayores síntomas neurológicos observados en los animales del Control estuvieron asociados a desorientación, letargia, disminución de la capacidad de reacción tras la administración de agua, los cuales podrían atribuirse a un eventual cuadro de encefalopatía hiponatémica e hipertensión endocraneana, que en nuestro caso resultó reversible y se normalizó a las 24 horas post administración. El cuadro final referido podría acompañarse de edema de la conjuntiva ocular, lo cual justificaría la midriasis observada en los animales de los dos grupos de experimentación. Boulard G y Col. (2003) han relacionado la midriasis con edema osmótico por intoxicación acuosa [254]. La ingesta repentina de un volumen excesivo de líquido también podría explicar

el edema abdominal agudo que observamos, que podría resultar del ingreso repentino de agua al espacio intracelular. En el caso de los animales tratados con 2000 mg/kg Maitake PRO4X, el único signo clínico observado en forma sostenida fue la piloerección, tanto de machos como hembras. También se registró midriasis al comienzo del tratamiento, con reversión de la misma en las 24 horas siguientes. Respecto de la piloerección, se trata de una reacción del sistema nervioso simpático -también conocido como sistema adrenérgico o noradrenérgico, en el cual su principal neurotransmisor es la noradrenalina-. La activación simpática está asociada con la respuesta a situaciones conocidas como "E" (escape, estrés o emergencia) en las cuales se produce liberación directa de la adrenalina desde las glándulas suprarrenales hacia la circulación sanguínea. Uno de los muchos efectos es el reflejo piloerector. Como respuesta a situaciones de peligro, el sistema nervioso simpático prepara al organismo para la huida o la lucha: aumenta el ritmo cardíaco, conduce más sangre a los grandes grupos musculares, dilata las pupilas agudizando la vista, y puede inducir piloerección. Por ende, estimamos que una sobredosis de Maitake PRO4X -en concentración 400 veces superior a la considerada terapéutica- podría inducir respuesta al estrés y activar el sistema de defensa de los animales tratados. En concordancia con los resultados mencionados, V. Vetvickova y J. Vetvickova (2014) [255] han reportado que el tratamiento oral de ratones BALB/c de 8 semanas de edad con 61,5 µg Maitake-Gold 404 estimulaba el sistema inmune de defensa. La relevancia de nuestros resultados radica en comprobar que la hipervolemia resultante de la administración aguda de un alto volumen de agua -responsable de algunos de los signos clínicos observados en el grupo Control- no tuvo el mismo impacto clínico en ratones Tratados con alto volumen de Maitake. Estos hallazgos evidencian los efectos de los β-glucanos en el manejo más adecuado de la variación aguda del volumen sanguíneo, probablemente por la alta distribución tisular de las macromoléculas. En cuanto a los parámetros hematológicos, hemos observado que la administración aguda de β-glucanos redujo significativamente el hematocrito % (desde 33.00±1.22 hasta 28.20±4.44) (\*p<0,05), el recuento eritrocitario/mm<sup>3</sup> (desde 6.5x10<sup>6</sup>, hasta 5.58x10<sup>6</sup>), el recuento leucocitario/mm<sup>3</sup> (desde 6660±3510 hasta 3600±1138), y la concentración % de hemoglobina (desde 11.18±0.41 hasta 9.52±1.53); mientras que no se observaron cambios significativos (p>0,05) en el recuento plaquetario (mm<sup>3</sup>), volumen corpuscular medio (fl), hemoglobina corpuscular media (%) y concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl). Estos resultados sugieren que la administración aguda de un gran volumen de extracto glicoproteico podría estar induciendo hemodilución por hiperhidratación y/o anemia, lo cual justificaría en cierto punto la caída significativa del % hematocrito, % hemoglobina y recuento eritrocitario (mm<sup>3</sup>). Faure AM y Col. (2015) han sugerido que los β-glucanos de cereales pueden reducir potencialmente la biodisponibilidad del hierro [256], mientras que Jawadi S y Col. (2018) han demostrado que las bacterias gram negativas son capaces de secuestrar hierro libre del medio a través de la acción de β-1,2-glucanos derivados de la pared celular microbiana [257]. Estos reportes nos permiten suponer que la administración aguda de una dosis elevada de β-glucanos podría inducir anemia ferropénica y reducción de los parámetros hematológicos asociados, por menor biodisponibilidad de hierro. De modo que la mayor parte de los cambios hematológicos observados en las 24 horas siguientes a la administración de Maitake podrían deberse a hemodilución por hiperhidratación tras la ingesta del producto en volumen equivalente al 50% de la volemia total de los animales. Es importante mencionar que la leucopenia

observada en el Grupo tratado (disminución de leucocitos  $< 4000/\text{mm}^3$ ), fue uno de los cambios hematológicos más relevantes registrados en nuestro ensayo. Si bien la misma resultó compatible con la vida de los ratones, y no afectó en forma visible el comportamiento de ninguno de ellos, la leucopenia puede ser el resultado de una enfermedad subyacente o de tratamientos quimioterápicos, pudiendo tener síntomas propios. Los casos leves suelen ser asintomáticos y pasan inadvertidos, pero a medida que se incrementa la reducción del número de glóbulos blancos, los pacientes pueden sentir una sensación general de malestar, con fatiga y debilidad, mareos, o pérdida del apetito. Conforme la condición empeora, los síntomas son más notorios, graves y peligrosos. Sin glóbulos blancos suficientes para luchar contra las enfermedades, se establecen infecciones, y aparecen cuadros de anemia, menorragia, y estomatitis. Por otra parte, es importante destacar que el efecto más significativo de los  $\beta$ -glucanos 1,3 y 1,6 puede ser descrito como de refuerzos inmunes inespecíficos particularmente estimulando macrófagos y neutrófilos. Estos tipos celulares integran la primera línea de defensa inmune, siendo capaces de fagocitar y eliminar bacterias, virus y otros patógenos. Además, producen importantes citoquinas, como IL-1 (interleucina-1), IL-6 y TNF- $\alpha$ , que representan el inicio de una reacción en cadena capaz de activar el sistema inmune humoral, y el interferón  $\gamma$ , clave en la lucha contra los virus. Todas las funciones principales de los macrófagos se ven mejoradas por acción de los  $\beta$ -glucanos (1,3) y (1,6). Estudios en los que fue administrada una única dosis del compuesto, demuestran un pico de efecto en la función de los macrófagos al cabo de 72 horas. Por su parte, los granulocitos neutrófilos, células claves del sistema inmune, poseen al igual que los macrófagos, receptores CR3 específicos para la macromolécula  $\beta$ -glucánica. De modo que la adhesión a los receptores mejora tanto la capacidad destructiva de estos neutrófilos como la migración por quimiotaxis al sitio donde se halla la infección o inflamación. Los neutrófilos son estimulados por proteínas sanguíneas especiales denominadas quimioquinas, migrando al sitio de la infección, siendo las primeras células inmunes en responder a una lesión o infección. El pretratamiento de los neutrófilos con  $\beta$ -glucanos mejora su capacidad y velocidad migratoria al sitio de la amenaza. Existen indicios de que los  $\beta$ -glucanos reequilibran el sistema inmune, principalmente dirigido por la resistencia humoral regulada por células auxiliares Th2, desplazándolo hacia una respuesta más regulada por células auxiliares Th1, en particular hacia una respuesta inmune celular, incrementando la resistencia a infecciones bacterianas y parasitarias. Dado que Maitake fue reportado como agente inmunoestimulante a dosis terapéuticas, la presencia de leucopenia en nuestro ensayo a dosis muy altas del producto representa un contrasentido, constituyendo un efecto secundario tóxico presumiblemente asociado a la administración de una dosis 400 veces superior a la considerada terapéutica. Como resumen de nuestros resultados de toxicidad aguda podemos afirmar que la DL50 del producto se halla por encima de los 2000 mg/kg y no tiene mayores efectos tóxicos y/o letales sobre la salud de los animales tratados que los mencionados. Entre ellos resaltamos leucopenia, piloerección y disminución de glóbulos rojos, como los más importantes y destacados. En cuanto al aspecto y dimensión de los órganos internos, hemos observado en los animales Tratados con Maitake PRO4X un peso significativamente mayor (\* $p < 0,05$ ) en corazón, bazo, glándula mamaria e Intestino completo + estómago, con colon inflamado e indicios de constipación. El tejido hepático resultó más pálido que el del Control, con menor densidad de vasos sanguíneos/unidad de área y calibre más pequeño. También registramos mayor peso cardíaco en el grupo

tratado. Aarsaether E et al (2006) han reportado que los  $\beta$ -glucanos atenúan la respuesta inflamatoria y protegen contra la lesión por isquemia-reperfusión en animales [258]; mientras que Chen J y Col. (2008) han referido que los  $\beta$ -glucanos alivian la lesión isquémica cardíaca en la diabetes [259]. Respecto del mayor peso esplénico, Briones G et al (2001) han reportado que los  $\beta$ -1,2-glucanos de bacterias causante de brucelosis (*Brucella sp.*) son capaces de inducir esplenomegalia por reclutamiento masivo de monocitos, neutrófilos y células dendríticas [260]. Mientras que Torello C.O y Col (2010) [261] observaron que la administración de 150 y 300 mg/kg de  $\beta$ -1,3-glucano puede prevenir la esplenomegalia causada por *Listeria Monocitogenes* debido al aumento de progenitores de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) de médula ósea. Respecto de la glándula mamaria, Zhu W y Col. (2011) [262] han reportado que los  $\beta$ -glucanos tienen un efecto protector del tejido mamario en ratas contra la mastitis aguda inducida por lipopolisacáridos. En cuanto a la inflamación intestinal, Heinsbroek SE et al (2015) observaron que el tratamiento con  $\beta$ -1,3-glucanos en ratones con inflamación intestinal inducida por dextrano sulfato sódico agrava el curso de la inflamación, pudiendo interferir con la respuesta inmune intestinal. Sin embargo, Liu B y Col. (2015) [263] han reportado un efecto protector de los  $\beta$ -glucanos de avena en la colitis ulcerosa de ratones con enfermedad inflamatoria intestinal, con inhibición de la expresión de factores proinflamatorios. Respecto de las dimensiones hepáticas, Chen P et al (2011) hallaron en ratones un efecto protector de los  $\beta$ -glucanos solubles frente al daño hepático inducido por etanol [264]. Mientras que Karaduman D et al (2010) han reportado que los  $\beta$ -glucanos pueden reducir el daño hepático inducido por el antineoplásico taxol a través del bloqueo del cambio del área portal y la supresión de procesos necróticos [265]. Posteriormente realizamos estudios de expresión génica en tejido mamario para investigar los efectos agudos de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X sobre la expresión de genes específicos asociados al fenotipo tumoral mamario que resultaron modulados en estudios previos de nuestro grupo, entre ellos SPARC, PTEN, IGFBP5, ABCG2 y CUL3. Hallamos que SPARC se expresó débilmente en el grupo Tratado, no registrándose su expresión en el Control. Por su parte, los genes PTEN, IGFBP5, ABCG2 y CUL3 se expresaron tanto en el tejido Control como en los Tratados. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes en cuanto el efecto de la dosis aguda de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X sobre la expresión de los genes investigados ya que todos los animales eran sanos sin tumores, tratados en un lapso corto de tiempo, no observándose efecto significativo sobre la expresión génica asociada al fenotipo tumoral mamario, tal como se esperaba.

Los estudios de toxicidad subaguda de Maitake PRO4X también los realizamos en un modelo experimental murino de ratones BALB/c. Para ello, administramos 5 mg/kg/día de extracto glicoproteico durante 28 días, al cabo de los cuales no observamos la muerte de ningún animal. El estudio de peso corporal sugiere que 5 mg/kg/día de extracto glicoproteico induce un descenso significativo de peso (\* $p < 0,05$  vs Control) tanto en machos como hembras, siendo este efecto regulador significativamente mayor en hembras (\* $p < 0,05$ ) que en machos tratados. A su vez, las hembras presentaron una reducción significativa de consumo alimentario durante la segunda semana de tratamiento (\* $p < 0,05$  vs semana 1). Zhang Y et al (2013) han reportado que una dieta por 6 semanas rica en  $\beta$ -1,3-glucano reduce la masa corporal, la obesidad y la absorción de grasas en ratones, mejorando la tolerancia a la glucosa [266]. Nuestras

observaciones de mayor reducción de peso en hembras, nos hace pensar en un posible efecto hormonal del extracto glicoproteico, probablemente sobre hormonas vinculadas a la saciedad y la regulación del apetito. La Leptina, hormona sintetizada en el tejido adiposo y con receptores hipotalámicos, resulta clave en el desarrollo de la obesidad al regular la ingesta y el gasto energético mediante la inhibición del Neuropéptido Y (activador de la ingesta alimentaria) [267]. Varios reportes [268- 272] correlacionan el sexo con niveles séricos de leptina, siendo el sexo femenino el de los mayores niveles de leptina, adiponectina y resistina en comparación con el masculino. Beck EJ y Col. (2009) han reportado que los  $\beta$ -glucanos mejoran la saciedad probablemente por un mecanismo vinculado con la liberación de la colecistoquinina [273], un péptido inductor de saciedad a nivel cerebral. Vitaglione P et al (2009), han publicado que los  $\beta$ -glucanos son capaces de controlar el apetito a través de la Grelina y el Neuropéptido Y [230], ambos inductores de la ingesta alimentaria. En cuanto a las manifestaciones clínicas y conductuales registradas en nuestro ensayo a dosis repetida, hemos observado que la administración de 5 mg/kg/día de Maitake PRO4X induce midriasis (solo en hembras de ambos grupos), piloerección (solo en machos Tratados) e inflamación de la glándula mamaria en una de las hembras Tratadas. El ensayo de Toxicidad aguda con 2000 mg/kg de Maitake PRO4X ya había demostrado midriasis (solo en hembras de ambos grupos) y piloerección (en machos y hembras del grupo Tratado), lo cual sugiere cierta actividad simpaticomimética por acción de los  $\beta$ -glucanos del producto. Respecto de los parámetros hematológicos, hemos observado que dosis repetidas de Maitake inducen disminución del recuento eritrocitario y aumento del volumen corpuscular medio (\* $p < 0,05$ ). La dosis aguda de 2000 mg/kg de Maitake PRO4X también había reducido el recuento eritrocitario (\* $p < 0,05$ ). Ello probablemente esté vinculado a la menor biodisponibilidad férrica por efecto de los  $\beta$ -glucanos [256- 257]. Al estudiar el aspecto macroscópico y la dimensión de los órganos internos, observamos que los animales Tratados con dosis repetidas de Maitake no exhibían diferencias significativas de peso en hígado, corazón, riñón, bazo, pulmón, glándula mamaria e intestino completo + estómago respecto del grupo Control ( $p > 0,05$ ). No obstante, el ensayo a dosis única había demostrado aumento significativo de peso cardíaco y pulmonar (\* $p < 0,05$  vs dosis repetida), no observado en la administración de dosis subagudas. Esto podría asociarse con la ingesta repentina del gran volumen de extracto glicoproteico en un corto período de tiempo (menor de 30 minutos). Macroscópicamente, el ensayo a dosis subaguda indicó un hígado Control y Tratado de textura y aspecto normales, con densidad y calibre de vasos sanguíneos similares en ambos grupos, mientras que en el ensayo a dosis aguda había demostrados palidez y menor densidad y calibre de vasos sanguíneos hepáticos. Por su parte, los tejidos cardíaco, pulmonar, mamario y esplénico no mostraron diferencias de aspecto y coloración entre los grupos Control y Tratado con dosis subaguda, como así tampoco hubo diferencias al compararlos con los del ensayo a dosis aguda, resultando todos con estructura normal. Histológicamente, los tejidos pulmonar y mamario del estudio a dosis repetida no presentaron alteraciones estructurales evidentes. En riñón no se observaron diferencias en la estructura y turgencia del órgano, como así tampoco alteraciones histológicas, siendo la arquitectura renal similar en ambos grupos. A nivel intestinal, no registramos diferencias en el aspecto y coloración de los tejidos Control y Tratado. Sin embargo, en el grupo de dosis aguda habíamos observado inflamación colónica con indicios de constipación. Las diferencias descriptas corresponden esencialmente al tratamiento con una dosis aguda de Maitake, lo cual podría asociarse a la ingesta repentina de un elevado volumen de

extracto glicoproteico (500  $\mu$ l). En coincidencia con nuestras observaciones, Túrmina JA y Col. (2012) [274] han reportado que el tratamiento subcrónico por 28 días con  $\beta$ -1,6-glucanos fúngicos, no generaba alteraciones hematológicas e histopatológicas conducentes a signos de toxicidad en ratones de ambos sexos. Respecto de los estudios de expresión génica de SPARC, PTEN, IGFBP5, ABCG2 y CUL3 en tejido mamario luego de la administración de dosis subagudas de Maitake PRO4X, observamos que SPARC se expresó débilmente en el grupo Control y Tratado (también fue tenue su expresión durante el ensayo a dosis aguda). Mientras que PTEN, IGBP5, ABCG2 y CUL3 se expresaron tanto en el grupo Control como en el Tratado con dosis repetidas y aguda de Maitake. De modo que nuestros resultados de expresión génica no son concluyentes respecto de los efectos a dosis agudas y repetidas de Maitake en la expresión de genes asociados al fenotipo tumoral mamario. Tal como imaginábamos, el tratamiento agudo o subagudo de Maitake en animales sanos no modifica la expresión génica respecto del Control.

Teniendo en cuenta este último punto, decidimos estudiar el efecto de 300 mg/kg/día de Maitake PRO4X durante dos semanas en parámetros hematológicos y bioquímicos de sangre entera de pacientes sanos. Hallamos que la dosis repetida del extracto glicoproteico no indujo cambios significativos en ninguna de las determinaciones hematológicas y bioquímicas correspondientes a los grupos Control y Tratado ( $p > 0,05$ ). Tampoco registramos diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en las poblaciones linfocitarias (granulocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos B, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y Natural Killer) analizadas por citometría de flujo. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento de individuos sanos con 300 mg/día Maitake durante dos semanas, no altera ninguno de los parámetros hematológicos y bioquímicos investigados, como así tampoco modifica las poblaciones linfocitarias analizadas.

Respecto de los procesos carcinogénicos, es bien conocido que la desregulación del crecimiento celular conduce a una proliferación desmedida de las células tumorales, lo cual resulta clave para el desarrollo tumoral. Debido a la adquisición de mutaciones por parte de las células cancerosas, ciertos genes reguladores de la proliferación o diferenciación celular se convierten en oncogenes que desencadenan el cáncer. Las células experimentan proliferación desmedida y escapan de la apoptosis, por inactivación de las vías que fisiológicamente la inducen o por activación de las vías inhibitorias del mecanismo. La interrupción de la apoptosis puede contribuir al desarrollo metastásico, puesto que le permite a las células tumorales sobrevivir en el torrente sanguíneo, invadir tejidos y evadir la apoptosis de las células en suspensión [275]. Por lo tanto, resulta de especial interés hallar compuestos que desencadenen apoptosis específicamente en células tumorales. Muchas drogas quimioterapéuticas actúan induciendo apoptosis, pero al carecer de especificidad afectan a todas las células en división activa. Como referimos anteriormente, Fracción D de Maitake posee propiedades antitumorales que se atribuyen a su efecto inmunomodulador. Sin embargo, se ha reportado también un efecto apoptótico directo del extracto glicoproteico rico en  $\beta$ -glucanos en células de cánceres prostático [276], gástrico [277], renal [278] y mamario [279]. En este último caso, pese a los avances en los tratamiento del cáncer mamario, existen muchos obstáculos por superar: muchas veces el tratamiento resulta inefectivo por la resistencia tumoral o por el desarrollo metastásico. Además, las terapias disponibles pueden generar efectos secundarios adversos debido a su inespecificidad.

Por ello, se buscan incesantemente nuevas alternativas terapéuticas más benévolas para el tratamiento de la carcinogénesis mamaria, la inhibición metastásica, el aumento de la sobrevida y el mejoramiento de la calidad de vida del paciente. En tal sentido, la presente Tesis Doctoral se dedicó exclusivamente a investigar los efectos del extracto Fracción D de Maitake en el tratamiento de la tumorigénesis mamaria en ratones hembra nulíparas cepa BALB/c. Entre la batería de ensayos antitumorales *in vivo* que realizamos, estudiamos el efecto coadyuvante del extracto glicoproteico de Maitake con quimioterapia convencional (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) en ratones con tumorigénesis mamaria. Observamos que la mayor mortalidad se produjo en el grupo Quimioterapia y la menor mortalidad en el grupo tratado con Maitake, mientras que la administración conjunta Maitake + quimioterapia previno la muerte por toxicidad que inducía la quimioterapia durante las etapas iniciales del tratamiento. Creemos que esto guarda relación con los efectos secundarios adversos de Ciclofosfamida + Doxorrubicina [280- 282], y con no utilizar la vía intravenosa de administración de drogas, reemplazandola por la vía oral. Baselga y Col. (1993) [283] habían reportado que la mortalidad de ratones BALB/c atímicos, con inducción tumoral mamaria tratados intraperitonealmente con Doxorrubicina 100 µg /20g de peso corporal había sido mayor (21%) que en el Control (13%) tras 15 días de finalizado el tratamiento, resultando una alta mortalidad por Doxorrubicina. Respecto del crecimiento tumoral, observamos que ninguno de los tratamientos que impartimos logró reducir significativamente el tamaño tumoral ( $p > 0,05$ ). Esto fue concordante con los reportes de Ottewell y Col. (2008) [284], que inocularon células humanas de cáncer de mama MDA-MB-436 en ratones nude MF1; a los 7 días administraron semanalmente por vía intravenosa 2 mg/kg de Doxorrubicina durante seis semanas, no observando diferencias significativas en el tamaño tumoral respecto del Control. Sin embargo, un estudio dirigido por Riwanto y Col. (2011) [285] sí demostró reducción del crecimiento tumoral en ratones C3H inoculados con células de cáncer mamario tratados intravenosamente con 0,013 mg Ciclofosfamida + 0,0156 mg Doxorrubicina. Por nuestra parte, hemos observado en los ensayos *in vivo*, menor agresividad de los tumores mamarios abdominales del grupo tratado con Maitake PRO4X, resultando los mismos no solo menos agresivos, sino también menos invasivos y ulcerantes que los tumores de los grupos Quimioterapia y Quimioterapia + Maitake. Además, los animales de estos dos últimos grupos presentaron necrosis y ulceraciones más tempranamente (día 9) que los del grupo Maitake, las cuales aparecieron más tardíamente y en mucho menor grado (día 15).

En la actualidad, dadas las limitaciones de las terapias convencionales para disminuir la tasa de mortalidad por cáncer, muchos esfuerzos se focalizan en prevenir la enfermedad, es decir, disminuir el riesgo de desarrollar el cáncer, lo cual conlleva el estudio de posibles factores de riesgo y protección. Es así como se investigan los efectos terapéuticos de distintas clases de compuestos naturales, como hierbas y suplementos dietarios. En ese contexto, se ha reportado que los  $\beta$ -glucanos de Maitake tienen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral tanto en administración oral como intraperitoneal [286]. Empleando una batería de ensayos *in vivo*, nos propusimos investigar los efectos preventivos del extracto purificado Maitake PRO4X en la tumorigénesis mamaria. Nanba y Kubo (1997) [287], habían reportado previamente para ratones BALB/c que el tratamiento preventivo con 0,2 mg de Fracción D de Maitake durante 15 días consecutivos y posterior inducción tumorigénica por inyección del carcinógeno 3-methylcholanthrene, producía un 69% de inhibición de carcinogénesis

hepática respecto del 7% del grupo Control. En nuestros ensayos de prevención tumoral por administración intraperitoneal de  $\beta$ -glucanos de Maitake, hallamos 64,29% de prevención para ratones tratados con Maitake PRO4X (64,29 %), 26,46% en el grupo Maitake Standard (26,46%) y 3,33% en el grupo Control. Estos resultados guardan relación con lo observado *in vitro* para las células tumorales murinas LM3, en las cuales fue menor el porcentaje de muerte celular al incubar con un envase de Maitake Standard “ya utilizado”, respecto del cultivo tratado con un envase “nuevo”. Esto implica la posibilidad de que el extracto purificado con el tiempo se degrade por oxidación o modifique su composición. En un trabajo de Wu y Col. (2013) [288], se sugirió que el peróxido de ergosterol (EPO) presente en Maitake cumple un rol importante en la actividad apoptótica del extracto. De manera que en futuras investigaciones nos dedicaremos a estudiar la posibilidad de que el EPO esté presente en el extracto Fracción D de Maitake y que la acción antitumoral del producto se atribuya más al EPO que a los  $\beta$ -glucanos; estos últimos probablemente sean responsables de la inmunoestimulación conducente al rechazo tumoral [289]. Sin embargo, no podemos descartar una acción terapéutica conjunta de los diversos componentes del extracto de Maitake ( $\beta$ -glucanos, EPO, y otras moléculas). De modo que resultará imprescindible en el futuro aislar y caracterizar química y estructuralmente al o los componentes con actividad farmacológica relevante presentes en el extracto purificado Fracción D de Maitake. En cuanto al crecimiento tumoral de los ensayos *in vivo* observado en nuestros estudios, no hallamos diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar el tamaño de los tumores mamarios de los distintos grupos experimentales. Sin embargo, encontramos diferencias anatómo-histológicas relevantes respecto del Control: mientras los tumores mamarios del Control fueron sólidos y duros, los tumores de los animales Tratados con Maitake PRO4X estaban llenos de líquido en su interior. Histológicamente, los tumores del Control correspondían a tumores de escasa diferenciación e hiperplásicos, de bordes irregulares, compatibles con tumores invasivos; mientras que los del grupo Tratado con Maitake PRO4X presentaban bordes netos y definidos, con menor número de células (grado mitótico), de apariencia encapsulada, compatibles con tumores benignos. A su vez, los tumores del grupo Maitake PRO4X presentaban menor proliferación y mayor diferenciación que los del grupo Control. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que Maitake PRO4X podría reducir la incidencia de carcinogénesis mamaria y/o prevenir la progresión tumoral. Hishida I y Col. (1988) [286], habían reportado para ratones C3H/HeN un 64% de inhibición del crecimiento tumoral al tratar preventivamente con 0,5 ml de 3,0 mg/ml de Fracción D (dosis más de diez veces superior a la empleada en nuestros ensayos) por vía oral y posterior inducción tumoral. La Fracción empleada por ellos fue directamente extraída del cuerpo fructífero de *Grifola frondosa*, mientras que la de nuestros ensayos fue una versión comercial del extracto glicoproteico. Por otra parte, la posibilidad de desarrollar metástasis hepática y pulmonar se verificó mediante el análisis macroscópico y el estudio de las dimensiones de los órganos, como así también de sus características anatómo-histológicas. En tal sentido, observamos diferencias significativas únicamente en el área pulmonar del grupo Tratado con Maitake PRO4X, que resultó significativamente mayor al del Control ( $*p < 0,05$ ). Macroscópicamente, el hígado Control resultó más blanquecino, pálido y rígido, mientras que el del grupo Tratado fue más oscuro, de textura y aspecto normales. Histológicamente, el hígado Control presentó vasos sanguíneos muy dilatados, con estructuras hepáticas diferentes a las normales y algunos cambios mitóticos, mientras que el hígado Tratado no mostró diferencias morfológicas respecto del tejido hepático

normal; no fue posible, sin embargo, establecer si las anomalías hepáticas observadas en el Control correspondían a metástasis hepática, pero definitivamente estaba involucrado un cambio histológico importante de la arquitectura hepática. Respecto de la histología pulmonar, no se observaron diferencias morfológicas entre los tejidos de ratones con tumor mamario y aquellos sin tumor. En cuanto a la angiogénesis, proceso fundamental del crecimiento tumoral y desarrollo metastásico, nuestros resultados sugieren una densidad de vasos sanguíneos significativamente menor (\*\* $p < 0,01$ ) en el grupo tratado con Maitake PRO4X ( $0,028 \pm 0,024$ ) respecto del Control ( $0,637 \pm 0,175$ ), resultando en una reducción del proceso angiogénico superior al 95% tras el tratamiento con Maitake. Estos hallazgos concuerdan con el estudio previo de Motamed K y Col. (1998) [290], quienes demostraron *in vitro* e *in vivo* que un extracto acuoso de Maitake inhibía la angiogénesis inducida por VEGF. Posteriormente, como parte de nuestros ensayos de prevención *in vivo*, investigamos la expresión génica en el tejido mamario de hembras BALB/c tratadas con y sin Maitake, a fin de establecer si su administración podía inhibir la expresión de alguno de los genes específicos del tejido tumoral mamario (SPARC, PTEN, IGFBP5, ABCG2, CUL3). El motivo de la selección se debió a que se trata de genes cuyo nivel de expresión estaba asociado al fenotipo maligno de células tumorales, y cuya expresión resultó modulada por Maitake en estudios previos de nuestro grupo. El gen SPARC tiene un papel controversial tanto en la carcinogénesis mamaria como en la metástasis. Algunos estudios han asociado la sobreexpresión de SPARC con un pobre pronóstico y una menor supervivencia en pacientes de cáncer de mama de tipo basal, HER2+ [291], y carcinoma ductal invasivo [292], como así también a menor tiempo de recurrencia en pacientes diagnosticados con carcinoma ductal *in situ* [293]. También se ha reportado ausencia de expresión de SPARC en tumores benignos [292], asociando su baja expresión con menor supervivencia y peor pronóstico en pacientes con subtipos como luminal A o triple negativo [294]. La subexpresión de SPARC podría contribuir a la invasividad de células de cáncer de mama MCF-7 [295], mientras que la alta expresión endógena en células de cáncer mamario MDA-231 reduciría la metástasis al disminuir la actividad invasiva [296]. Por nuestra parte, encontramos que SPARC no se expresó en tejido mamario normal, pero sí en tejido tumoral. Estos resultados, son coincidentes con el trabajo previo de Watkins y Col. (2005) [297], quienes reportaron mayores niveles de transcritos de SPARC en tejido tumoral mamario respecto de tejido mamario normal, sugiriendo que el nivel de expresión del gen se relaciona con la carcinogénesis mamaria. Sin embargo, nuestros resultados fueron no concluyentes respecto del efecto que podría tener el extracto de Maitake en la expresión de SPARC, dado que el nivel de expresión fue variable en el tejido tumoral de los ratones tratados. También investigamos la expresión de PTEN, un supresor tumoral que regula negativamente la vía oncogénica del Fosfatidil-Inositol-3-quinasa (PI3K/Akt). La subexpresión de PTEN se asocia con un fenotipo agresivo de cáncer mamario, metastásico y de pobre pronóstico [298-299], además de correlacionarse su expresión en forma negativa con el tamaño y estadio tumorales, como también con la expresión de receptores de estrógeno y progesterona [300]. En ensayos *in vitro*, el “knockdown” de PTEN de células tumorales MCF-7 promovió la proliferación celular [301]. Contrariamente a lo reportado en estudios previos, nuestros ensayos demostraron que PTEN no se expresó en el tejido mamario normal, pero sí en los tejidos tumorales. Por otra parte, investigamos también la expresión de IGFBP5, gen que previene el crecimiento de células mamarias de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*, genera arresto del ciclo celular en fase G2/M, e induce apoptosis asociada al aumento

de expresión del factor pro-apoptótico BAX a nivel de mRNA con disminución de la expresión BCL-2 anti-apoptótico [302]. Se reportó, además, que una reducción de la expresión del gen IGFBP5 confería resistencia a Tamoxifeno *in vitro* en células tumorales MCF7 [303]. Su menor expresión se ha asociado con una menor supervivencia total de pacientes con cáncer de mama luego del tratamiento con Tamoxifeno [303]. Asimismo, se ha reportado que IGFBP5 estimula la adhesión celular mientras inhibe la migración, lo cual podría reducir el potencial metastásico [304]. Por otro lado, la expresión IGFBP5 se ha visto up-regulada en tejidos de cáncer mamario invasivo y en tejido normal adyacente [305], asociándose su expresión con un pobre pronóstico de los pacientes [305]. Además, se ha reportado que la sobreexpresión de IGFBP5 contribuye a la invasividad y progresión tumoral de distintos cánceres [306]. En nuestros estudios, no observamos diferencias en la expresión de IGFBP5 de tejidos tumorales mamarios respecto de tejidos normales, por lo cual no podemos establecer una relación entre su expresión y el desarrollo de tumorigénesis mamaria. Tampoco observamos diferencias de su expresión en los tejidos tumorales de los animales tratados y sin tratar con Maitake PRO4X, de modo que el extracto glicoproteico no ejercería efectos en la expresión de IGFBP5. Otro de los genes investigados fue ABCG2, implicado en la resistencia tumoral mamaria a múltiples drogas [307- 310] y en el transporte de diversos agentes quimioterápicos específicos [310]. Su expresión se vio aumentada en células tumorales MCF-7 resistentes a Mitoxantrona (MCF-7/MX), respecto de la línea celular MCF-7 parental sensible a Mitoxantrona [310]. Por nuestra parte, observamos en los ensayos de expresión génica, que ABCG2 no se expresa en el tejido mamario normal, pero sí en los tejidos tumorales; no obstante, no fue posible asociar su nivel de expresión con la administración de Maitake. Finalmente, investigamos la expresión de CUL3, gen que desempeña un papel importante en la degradación proteica del protosoma [311]. Se ha detectado pérdida de su expresión en una amplia gama de cánceres hepáticos humanos asociándose la misma directamente con la dediferenciación tumoral [312]. También se ha correlacionado su nivel de expresión con el estadio tumoral de tejidos mamarios [311], siendo detectados altos niveles de esta proteína en carcinomas invasivos, y ausencia de esta en lesiones tempranas; su expresión se vio aumentada en la progresión del carcinoma ductal *in situ* a carcinomas invasivos [311]. Por otra parte, CUL3 ha sido vinculado a la ubiquitinación del "breast cancer metastasis suppressor 1" (BRMS1), un inhibidor metastásico [313]. Nuestros ensayos, no revelaron diferencias en los niveles de expresión de CUL3 en tejidos mamarios murinos con y sin tumor, como así tampoco en animales tratados y sin tratar con Maitake, de modo tal que no nos fue posible asociar su nivel de expresión con el proceso tumorigénico.

Para completar nuestros ensayos de prevención tumoral, comparamos *in vivo* los efectos preventivos de los  $\beta$ -glucanos vs los de los agentes antiestrogénicos. Con tal fin, a hembras BALB/c sanas se les administró durante 50 días dosis terapéuticas de Maitake PRO4X y Tamoxifeno, para posteriormente inducirles tumorigénesis mamaria. Nuestros resultados indicaron que la menor supervivencia se produjo en los animales de los grupos Control (75%) y Tamoxifeno (80%), mientras que la supervivencia para los ratones tratados con Maitake y Tamoxifeno + Maitake fue 100%. Tales valores nos sugieren que los  $\beta$ -glucanos del extracto glicoproteico lograron prevenir la muerte por tumorigénesis mamaria en aquellos animales tratados únicamente con el extracto y en los que recibieron el extracto junto con Tamoxifeno, a diferencia de los ratones tratados solamente con Tamoxifeno. Zhou H y Col. (2018) [314] han indicado que el tamoxifeno,

el fármaco más comúnmente usado para tratar cáncer mamario estrógeno positivo (RE+), encuentra resistencia en muchos pacientes que experimentan efectos secundarios adversos. Debido a ello, suponemos que la administración conjunta Tamoxifeno + Maitake podría reducir los efectos adversos del agente antiestrogénico (por ejemplo, la marcada ictericia intestinal registrada en la autopsia), como así también la muerte de hembras BALB/c con inducción tumoral tratadas solamente con Tamoxifeno. Respecto del peso corporal, hemos observado en el grupo Control incrementos significativos del mismo ( $*p < 0,05$ ), los cuales fueron sostenidos durante todo el ensayo (tanto en etapa de prevención tumoral como en la de desarrollo tumoral), mientras que los ratones Tratados con Maitake PRO4X mantuvieron su peso corporal, con aumentos y descensos significativos inferiores a los valores Control, evidenciando la capacidad reguladora de peso corporal del extracto glicoproteico; sorprendentemente durante la etapa de desarrollo tumorigénico, el peso del grupo Maitake tendió a incrementarse respecto de la etapa preventiva. No ocurrió lo mismo con los animales del grupo Tamoxifeno, en los cuales observamos incrementos significativos ( $*p < 0,05$ ) durante la etapa de prevención, pero descensos en el período tumorigénico, incluso por debajo de los valores del Control. Por su parte, el tratamiento Tamoxifeno + Maitake, generó aumentos significativos de peso durante todo el experimento ( $*p < 0,05$ ), pero hacia el final del ensayo, registramos caída de sus valores por debajo de los del Control (probablemente por efecto de Tamoxifeno) aunque los mismos fueron superiores a los del grupo Tratado con Tamoxifeno (suponemos por efecto de Maitake). De modo que nuestros hallazgos sugieren un efecto protector del extracto glicoproteico en la etapa de enfermedad, representado por un incremento significativo del peso y por la persistencia de los efectos benéficos de Fracción D en la administración conjunta con Tamoxifeno. En investigaciones recientes, Li HT y Col. (2018) [315] han reportado que preparaciones solas o combinadas con Tamoxifeno presentarían mejores efectos terapéuticos y menos reacciones adversas que los del Tamoxifeno solo, pudiendo recomendarse como terapia auxiliar en el tratamiento de la hiperplasia glandular mamaria. Por su parte, los parámetros hematológicos y bioquímicos de sangre periférica de nuestros ensayos, indicaron valores de creatininemia significativamente altos para los grupos Tratados (Maitake, Tamoxifeno y Maitake + Tamoxifeno) respecto del grupo Control ( $*p < 0,05$ ). A su vez, el tratamiento Tamoxifeno + Maitake indujo mayores valores de creatininemia respecto del grupo Tamoxifeno ( $*p < 0,05$ ), lo cual parece inducido por el extracto glicoproteico. Mientras que el recuento leucocitario, no mostró diferencias de valores entre los grupos Control y Tratado. Soares MP y Col. (2018) [316] han reportado que tanto los glucanos  $\beta$ -1,3 como  $\beta$ -1,6 pueden mejorar la respuesta inmune innata en peces tras una manipulación estresante, incrementando el estallido respiratorio de leucocitos y el número de neutrófilos y monocitos en sangre. Respecto del clearance de creatinina, altos valores de creatininemia sanguínea suelen asociarse a daño renal, sin embargo, Esrefoglu M y Col. (2016) [317] han reportado que los  $\beta$ -glucanos resultan eficaces para proteger los riñones del daño oxidativo inducido por la isquemia-reperusión renal en ratas jóvenes, una de las principales causas de insuficiencia renal aguda. También, Sandvik A y Col. (2007) [318] habían referido en estudios previos que el tratamiento oral con  $\beta$ -glucanos ( $\beta$ -1,3)( $\beta$ -1,6) atenúa el aumento de los niveles de creatinina plasmática inducido por lipopolisacáridos de *Escherichia coli* protegiendo contra lesiones renales y hepáticas. Respecto del crecimiento tumoral, hemos hallado que las hembras tratadas preventivamente con Tamoxifeno + Maitake fueron las primeras en desarrollar tumor mamario, aunque dicho porcentaje se mantuvo constante

hasta el final del ensayo (20% con tumor). Por su parte, los ratones Tratados solamente con Tamoxifeno fueron los que más tardíamente exhibieron tumorigénesis mamaria, respecto del Control -que tuvo 100% de desarrollo tumoral-, mientras que el grupo tratado solamente con Maitake no presentó desarrollo tumoral en ningún animal (0% de desarrollo tumoral). Estos sorprendentes hallazgos revelan que el tratamiento preventivo con 5 mg  $\beta$ -glucanos/kg/día de Maitake PRO4X en hembras BALB/c por 50 días (período equivalente a 5 años humanos) inhibe completamente el desarrollo de tumorigénesis mamaria. Dado que el tratamiento con Tamoxifeno indujo una prevención tumoral del 75% frente al 100% de Maitake, y que la administración conjunta Maitake + Tamoxifeno generó una prevención del 80%, creemos que no sería posible hablar de efecto sinérgico, sino más bien de una atenuación de los efectos adversos de Tamoxifeno por acción de Maitake. Alonso E y Col. (2017) [209] han reportado que Maitake PRO4X es capaz de reducir la carga tumoral en un modelo murino de carcinogénesis mamaria, a la vez que disminuye el número de metástasis pulmonares. Por su parte, Zhang Y y Col. (2017) [319] han promovido el potencial tratamiento antitumoral de los polisacáridos de *Grifola frondosa* al demostrar su capacidad de inducir apoptosis en células de carcinoma mamario mediante una vía apoptótica mitocondrial. Por nuestra parte, hemos observado macroscópicamente que los animales Tratados con Maitake presentaron pequeños bultos mamaros que no conformaban tumor, demostrando el posterior análisis microscópico la existencia de un completo encapsulamiento y aislamiento de las células tumorales implantadas por vía intraperitoneal. Vetchinkina E y Col. (2016) [320] han reportado cambios distróficos y necróticos en células tumorales renales de ratas tratadas con extractos miceliares del hongo *Grifola frondosa*. Mientras que Lin CH y Col. (2016) [321] informaron que *G. frondosa* inhibió significativamente el crecimiento tumoral en ratones atímicos, bloqueando el crecimiento del hepatoma al inducir autofagia y apoptosis de la línea celular humana Hep3B. Por nuestra parte, estudiando el aspecto macroscópico y peso de los órganos internos murinos, hemos hallado que la glándula mamaria de los grupos Tratados presentó un peso significativamente menor al del Control ( $*p \leq 0,05$ ). Por otra parte, la mama del grupo Tratado con Maitake + Tamoxifeno tuvo un peso significativamente más alto que el del grupo Maitake, lo cual sugiere que el agente antiestrogénico podría estar contribuyendo al mayor peso mamario. Shehata M y Col. (2014) [322] reportaron que Tamoxifeno induce aumento transitorio de la proliferación celular y del número de células basales en el epitelio mamario, hasta 7 días después de su administración, aunque en el mediano plazo genera disminución del número de células basales. Respecto del peso hepático, los animales que recibieron Tamoxifeno (grupos Tamoxifeno y Maitake + Tamoxifeno) presentaron un peso hepático significativamente menor al del grupo Control ( $*p \leq 0,05$ ), como así también mayor palidez del órgano de los animales tratados solamente con Tamoxifeno. Estos signos sugieren un hígado enfermo; en concordancia con nuestras observaciones, Gao FF y Col. (2016) [323] han indicado que 6 mg/kg/día de Tamoxifeno causarían hepatotoxicidad en la etapa temprana del tratamiento endocrino en ratones, a través de un mecanismo vinculado con apoptosis de los hepatocitos. Por su parte, Ribeiro MP y Col. (2014) [324] investigaron al Endoxifeno (un metabolito activo del Tamoxifeno) como una alternativa al tratamiento con Tamoxifeno, puesto que han destacado como una preocupación importante la hepatotoxicidad inducida por Tamoxifeno en un número significativo de pacientes. Específicamente, el agente antiestrogénico induce esteatosis hepática con posibilidad de progresión a esteatohepatitis, probablemente por la

disfunción mitocondrial que se cree podría generar. Lee MH y Col. (2010) [325] han investigado en hígado murinos, los mecanismos moleculares que desencadenan la hepatotoxicidad esteatogénica inducida por Tamoxifeno. Por nuestra parte, hemos observado en los grupos tratados con Maitake (grupo Maitake y Tamoxifeno + Maitake) que el peso cardíaco fue significativamente menor al del Control (\* $p < 0,05$ ). Wu YS y Col. (2016) [326] reportaron que las dietas hipercolesterolémicas inducen una respuesta inflamatoria en tejidos cardíacos murinos, y que los  $\beta$ -glucanos ( $\beta$ -1,3) y ( $\beta$ -1,6) son capaces de reducir dicha inflamación. Finalmente, a nivel instestinal, hemos registrado que los animales tratados con Tamoxifeno (grupos Tamoxifeno y Maitake + Tamoxifeno) presentaban macroscópicamente intestinos voluminosos, dilatados y llenos de gas, con marcada ictericia, particularmente el grupo Tamoxifeno, lo cual nos permite mantener nuestra hipótesis de una posible atenuación de los efectos adversos de Tamoxifeno por acción de Maitake. Li WJ y Col. (2018) [327] han reportado en ratones *knock out* tratados con Tamoxifeno (con delección del gen Claudin-7) defectos intestinales graves que incluían desprendimiento de células epiteliales, necrosis, inflamación e hiperplasia, con destrucción de la estructura del epitelio intestinal. Por su parte, Nie X y Col. (2018) [328] han informado que a nivel gastrointestinal Tamoxifeno podría aumentar el riesgo de adenocarcinoma gástrico.

En cuanto al sistema inmune, la regulación de su activación o supresión podría contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud. El uso de agentes que activen los mecanismos de defensa del huésped (inmunoestimuladores, inmunopotenciadores o modificadores de la respuesta biológica), podría aportar una herramienta terapéutica adicional a la quimioterapia convencional [329]. Por esta razón, un elevado número de investigaciones biomédicas se orientan a la búsqueda de nuevos compuestos capaces de estimular la respuesta inmune en pacientes inmunodeficientes, con patologías tales como VIH/SIDA, cáncer o malnutrición [330-331]. Numerosas sustancias inmunoestimuladoras han sido aisladas de plantas y hongos superiores, abriendo las puertas para el desarrollo de nuevos fármacos [330]. Se vislumbra así una alternativa eficaz para el tratamiento de afecciones que alteran el normal equilibrio de la respuesta inmune del organismo [332-333]. Dentro de este contexto, hemos investigado la capacidad inmuorestauradora de los  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X en hembras BALB/c inmunosuprimidas con Dexametasona. Paralelamente al tratamiento inmunosupresor, tratamos los ratones con el extracto glicoproteico de Maitake; es importante destacar que ningún animal pereció como resultado del tratamiento inmunosupresor, y que tampoco se observaron signos clínicos de toxicidad o enfermedad. Al analizar el peso corporal, observamos un incremento significativo para los grupos Control Sano y Control Inmunosuprimido respecto del comienzo del ensayo, siendo mayor la ganancia de masa corporal en los animales inmunosuprimidos con Dexametasona. Mientras que el grupo Dexametasona + Maitake, presentó un peso prácticamente constante durante todo el ensayo, aunque significativamente menor al del Control Inmunosuprimido. Esto indica cierta capacidad de los  $\beta$ -glucanos de atenuar el efecto glucocorticoideo de la dexametasona sobre el peso corporal. Sin embargo, cuando el tratamiento incluyó Verapamilo (inhibidor de canales cálcicos) desapareció el efecto regulador de peso de Maitake, observándose un importante descenso de los valores de peso como consecuencia del bloqueo del ión metálico. Estos resultados sugieren la participación del calcio extracelular en el mecanismo regulador de peso corporal que ejercen los  $\beta$ -glucanos de Maitake, y da cuenta de cómo su bloqueo afecta

dicha modulación, además de que el secuestro del ión afectaría el mecanismo glucocorticoideo de incremento de peso. En contraposición con nuestras observaciones, Hasona NA (2018) [334] ha reportado que el tratamiento con Dexametasona causa disminución significativa de la ganancia de peso corporal en ratas macho albinas. Mientras que Lim JM y Col. (2018) [335] han referido efectos beneficiosos de  $\beta$ -glucanos de *Aureobasidium pullulans* sobre la atrofia muscular catabólica murina inducida por Dexametasona, lo cual sugiere cierta capacidad de los  $\beta$ -glucanos de atenuar los efectos secundarios glucocorticoideos. Lida A y Col. (2015) [336] han investigado la inhibición del transporte intestinal de 1,3- $\beta$ -D-glucanos en ratas por acción del Verapamilo, sugiriendo la posibilidad de que dicha droga afecte los efectos  $\beta$ -glucánicos. Por nuestra parte, el estudio del peso de los órganos internos nos indicó que el bazo murino no mostró diferencias significativas de peso para ninguno de los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ). Mientras que, en hígado, hubo un peso significativamente menor en el grupo Dexametasona + Maitake respecto del grupo Dexametasona ( $*p < 0,05$ ); estos resultados nos sugieren que los  $\beta$ -glucanos tenderían a regular el peso hepático, probablemente como parte de su mecanismo modulador de peso corporal. Liu F y Col. (2018) [337] han investigado mediante estudios de microarrays los mecanismos de esteatosis hepática inducidos por Dexametasona. Mientras que Niu L y Col. (2018) [338] han reportado que la administración crónica de Dexametasona induce hiperglucemia por activación de la gluconeogénesis hepática. Por nuestra parte, al examinar microscópicamente los extendidos de sangre periférica de las distintas condiciones experimentales, hemos observado que el grupo Dexametasona (inmunodepletado) presentó gran cantidad de células gigantes de apariencia inmadura compatibles con megacariocitos, mientras que el grupo Maitake + Dexametasona presentó baja cantidad de células inmaduras, además de linfocitos, neutrófilos, basófilos y algunos megacariocitos. A su vez, el grupo Dexametasona + Verapamilo + Maitake, exhibió megacariocitos y mastocitos en degranulación. El grupo Control sano no presentó células inmaduras, observándose plaquetas agrupadas, linfocitos, neutrófilos y monocitos. Nuestras observaciones microscópicas sugieren que, como consecuencia de la inmunodepleción en ratones por Dexametasona, células inmaduras de gran tamaño son reclutadas a la circulación sanguínea, mientras que el tratamiento concomitantemente con  $\beta$ -glucanos de Maitake podría contribuir a la maduración celular, corroborado por la presencia de células basófilas maduras, linfocitos, granulocitos polimorfonucleares, además de escasas o aisladas células inmaduras. Estos resultados sugieren que los  $\beta$ -glucanos de Maitake podrían inducir maduración celular conducente a inmunorestauración. Sin embargo, cuando el tratamiento con Maitake involucra bloqueo cálcico, se reduciría su capacidad inmunorestauradora, poniéndose de relieve la dependencia del calcio extracelular. Estrada A y Col. (1999) [339] han reportado que los  $\beta$ -glucanos aumentan la capacidad proliferativa de linfocitos en cultivo tratados con dexametasona, revirtiendo el efecto inmunosupresor del glucocorticoide, sugiriendo la capacidad de los  $\beta$ -glucanos de restaurar significativamente parámetros inmunes específicos y no específicos tanto en cultivos celulares como en animales tratados con Dexametasona. Por su parte, Kotthoff P y Col. (2017) [340] han informado que células presentadoras de antígenos generadas en presencia de Dexametasona tienen reducida capacidad de estimular la proliferación de células T, mientras que el tratamiento con  $\beta$ -glucanos induce la expresión de marcadores de maduración de células T CD69 y promueve la fosforilación de Syk y STAT3, con mayor secreción de IL-10, mientras

reduce la producción de IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$ . Masuda Y y Col. (2013) [341] reportaron, en modelos murinos de tumorigénesis, que Fracción MD de *Grifola frondosa* podía generar respuesta inmune sistémica, induciendo directamente la maduración de células dendríticas a través de una vía Dectina-1 del receptor de lectina tipo C. La respuesta terapéutica de Fracción MD administrada oralmente se asoció a respuestas de células T específicas de antígeno tumoral sistémica inducida a través de la activación dependiente de Dectina-1 de células dendríticas, (ii) aumento de la infiltración de células T activadas en el tumor y (iii) disminución del número de células inmunosupresoras causadas por tumores, como células T reguladoras y células supresoras derivadas de mieloides [341]. Por nuestra parte, los estudios de citometría de flujo en ganglios linfáticos con marcación CD3 $\epsilon$  (LT, NK) / CD19 (LB, SC), sugirieron que el tratamiento con Maitake permite una recuperación muy significativa (\*\* $p < 0,01$ ) de la población de linfocitos T/Natural Killer de animales inmunosuprimidos con Dexametasona. A su vez, el tratamiento concomitante con Verapamilo (inhibidor de los canales de calcio voltaje-dependientes) no estaría afectando la inmunorestauración descrita, sino por el contrario contribuiría a una recuperación linfocitaria casi normal. De modo que la maduración celular inducida por Maitake podría verse afectada por el bloqueo de los canales cálcicos voltaje-dependientes según nuestros resultados microscópicos, pero la recuperación de linfocitos T/Natural Killer no se vería afectada por el bloqueo de los canales cálcicos. Respecto de la población de LB/SC, observamos que Maitake tendió a recuperar esa población linfocitaria, pero sin significancia estadística, mientras que el tratamiento conjunto con verapamilo inhibió dicha tendencia. Los resultados descriptos apoyan nuestra hipótesis de que el bloqueo de canales cálcicos afecta algunas funcionalidades de los  $\beta$ -glucanos de Maitake. En cuanto a la marcación ganglionar CD105 (Stem Cells/Macrófagos), no hallamos diferencias significativas de la población celular entre las distintas condiciones experimentales. Resultados similares se obtuvieron para la marcación ganglionar CD19 (Stem Cells/LB) en las cuales no hubo diferencias significativas entre los grupos de animales. Respecto de la marcación ganglionar Ly6G (granulocitos polimorfonucleares), observamos que el tratamiento con Maitake incrementó significativamente el porcentaje de la población celular en ratones inmunosuprimidos (\* $p < 0,05$ ) pero no en animales sanos. Estudios previos de Lin H y Col. (2009) [342] reportaron la capacidad de los  $\beta$ -glucanos de Maitake de activar la respuesta biológica en la hematopoyesis, promoviendo la recuperación de la médula ósea tras la lesión, y estimulando la activación de la unidad formadora de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CFU). Mientras que Kodama y Col. (2005) [343] han reportado que Fracción D derivada de *Grifola frondosa* es capaz de activar células inmunocompetentes como macrófagos y células T, con modulación del equilibrio entre linfocitos T-helper 1 y 2. Por otra parte, en nuestros estudios esplénicos no hallamos un efecto más significativo de inmunorestauración que el descrito en ganglios linfáticos, prevaleciendo en bazo la tendencia al recupero de poblaciones inmunes por efecto de Maitake. En la marcación esplénica CD19 (LB/SC), observamos que la población de LB/SC resultó significativamente depletada durante el tratamiento con Dexametasona respecto del grupo sano con Maitake PRO4X (\* $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento con Maitake indujo solo tendencia al recupero linfocitario ( $p > 0,05$ ). En otro sentido, Dexametasona no indujo depleción significativa de la población esplénica CD3 $\epsilon$  (LT/NK) respecto del grupo sano Tratado con Maitake, aunque tendió a reducir los LT/NK, mientras que el tratamiento concomitante con Maitake tendió a incrementar dicha

población celular. Dexametasona tampoco depletó significativamente la población esplénica Ly6G (Granulocitos PMN) ni CD105 (SC/macrófagos) respecto del grupo sano Tratado con Maitake. En la marcación esplénica CD105 (SC/macrófagos), Dexametasona tendió a incrementar dicha población respecto del grupo sano Tratado con Maitake, mientras que el tratamiento conjunto con Maitake tendió a reducirla. Estos efectos fueron similares a los observados para SC/macrófagos a nivel ganglionar. Dichos resultados sugieren mayor relevancia del efecto inmunorestaurador de Maitake e inmunosupresor de Dexametasona a nivel ganglionar más que esplénico. Kay J y Col. (1994) [344] reportaron previamente que Dexametasona estimula a los receptores  $\beta$ -glucánicos de monocitos y promueve la fagocitosis por macrófagos de partículas de  $\beta$ -glucanos.

En cuanto a nuestros estudios de parámetros farmacocinéticos en administración oral, hemos observado 3 picos de concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos con un pico máximo que se registró media hora después de su administración (seguido de un descenso abrupto). El segundo pico fue registrado entre las 2 y las 10 horas posteriores, y el último a las 34 horas luego de la administración oral de 5mg/kg de  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X. Rice PJ y col. (2005) [345] han reportado que luego de la administración oral, glucanos hidrosolubles presentaron picos plasmáticos entre 0,5 h y 12 h, persistiendo en suero hasta 24 horas después de la única administración oral, con la consecuente generación de efectos biológicos significativos. Los resultados de nuestros ensayos sugieren que la eliminación plasmática (clearance) de 1,3- $\beta$ -glucanos se corresponde con un modelo cinético de primer orden (monocompartimental), obteniéndose una primera desaparición plasmática muy rápida iniciada a la media hora de la administración oral, y una segunda eliminación más gradual a las 10 horas posteriores. Hong F y Col. (2004) [346] han reportado que los  $\beta$ -1,3-glucanos administrados oralmente son transportados por macrófagos hasta el bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea, implicando una eventual reducción plasmática del compuesto. Por nuestra parte, hemos observado que la absorción del compuesto fue superior a la eliminación del mismo, y que el volumen de distribución obtenido fue muy alto (127 ml/g). Esto indicaría extensa distribución en tejidos [347], con probable acumulación en ellos y pobre unión a proteínas plasmáticas. De modos que probablemente los 1,3- $\beta$ -glucanos podrían hallarse mayormente en su forma "libre" en circulación, siendo capaces de difundir a los compartimientos extravasculares, para interactuar con sus receptores y desencadenar una respuesta biológica. Miura T y col. (1997) [348] han reportado que la unión de  $\beta$ -glucanos a proteínas séricas o plasmáticas resultaría en la inactivación de los mismos con reducción significativa de sus actividades biológicas debido a la unión a proteínas.

Respecto de nuestros estudios farmacocinéticos en administración intravenosa, hemos observado 2 picos de concentración plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos, el primero a las dos horas de la administración (seguido de un descenso gradual) y el segundo a las 10 horas. También hemos observado que el clearance o la desaparición plasmática de 1,3- $\beta$ -glucanos se correspondió con un modelo cinético de primer orden (monocompartimental), obteniéndose una primera eliminación plasmática muy rápida iniciada media hora después de la administración intravenosa; y una segunda eliminación de mayor gradualidad a las 10 horas. El volumen de distribución obtenido

fue muy alto (1418,5 ml/g), superior al de la administración oral, lo cual indica una extensa distribución en tejidos [347], con probable acumulación tisular y escasa unión a proteínas plasmáticas. Estos resultados sugieren que los 1,3- $\beta$ -glucanos administrados intravenosamente, se hallarían mayormente en su forma "libre" en circulación, como sucedió en la administración oral, siendo capaces de difundir a los compartimientos extravasculares para interactuar con sus receptores y desencadenar una respuesta biológica. Nuestros resultados sugieren que la vía endovenosa presenta menor área bajo la curva Cp vs t que la vía oral, pero mayor volumen de distribución (Vd). Esto nos hace pensar que, tras la administración intravenosa, la unión a proteínas plasmáticas sería menor que en la administración oral, generando mayor proporción de compuesto libre, aumentando así su aumento del volumen de distribución. No obstante, ambas rutas de administración presentarían valores similares de velocidad de eliminación, tiempo de concentración plasmática máxima (T máx), tiempo de vida media (T1/2) y aclaramiento sistémico total.

En cuanto a nuestros estudios de biodistribución de 1,3- $\beta$ -glucanos en administración oral e intravenosa, hemos observado una mayor captación (absorción) del compuesto a nivel gastrointestinal, con predominio de la captación gástrica, aunque también registramos importante captación a nivel duodenal y colónico (del orden de los millones de picogramos/h/ml). Estos datos nos sugieren que la mayor biodistribución en estómago para ambas rutas de administración, guarda relación con la naturaleza ácida del extracto glicoproteico de Maitake. Suponemos que el pH ácido del estómago permitiría un mayor porcentaje de moléculas de 1,3- $\beta$ -glucanos no ionizadas, de mayor facilidad para absorberse e ingresar a la circulación. Vetvicka V y col. (2007) [349] han reportado en ratas mayor detección de  $\beta$ -glucanos en estómago y duodeno 5 minutos después de la administración, cantidad que disminuyó drásticamente en los primeros 30 minutos. Una concentración significativa entró al intestino proximal poco después de la alimentación forzada; a medida que el tránsito intestinal proximal disminuía con el tiempo, aumentaba en el íleon. Tomita M y col. (2009) [350], concluyeron que el transporte intestinal de 1,3- $\beta$ -glucanos involucra un transportador especializado en ambas direcciones de absorción y secreción; la absorción intestinal no lineal está asociada con un mecanismo de transporte múltiple. Por su parte, Rice PJ y Col. (2005) [345] han reportado que luego de la administración oral, los glucanos son internalizados por células epiteliales intestinales y células del tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Para Vetvicka V. y Col. (2007) [349], la mayoría de los  $\beta$ -glucanos administrados oralmente ingresan al intestino delgado proximal y son capturados por macrófagos gastrointestinales, que los internalizan y fragmentan en su interior. Posteriormente, son transportados por macrófagos hacia la médula ósea y el sistema reticulo-endotelial. Los pequeños fragmentos de  $\beta$ -glucanos son finalmente liberados por macrófagos y absorbidos por otras células inmunes generando diversas respuestas inmunes. En coincidencia con ello, Hong F y Col. (2004) [346] han informado que los  $\beta$ -1,3-glucanos administrados oralmente son transportados por macrófagos hasta bazo, ganglios linfáticos y médula ósea; dentro de ésta última, los grandes fragmentos del compuesto son degradados a fragmentos solubles más pequeños por acción de los macrófagos. Para Li B y col. (2006) [351] los macrófagos degradan las moléculas de  $\beta$ -glucano (administrado oralmente) a fragmentos más bioactivos. Ganda Mall JP y col (2017) [352], por su parte, reportaron a nivel intestinal una co-localización de  $\beta$ -glucanos en macrófagos y células dendríticas,

resaltando la importancia de ambos en la translocación  $\beta$ -glucánica. Posiblemente suceda liberación de partículas procesadas y fragmentadas con propiedades diferentes a las originales que ejerzan efectos potentes sobre los mastocitos. Se sugiere que los  $\beta$ -glucanos terminan yuxtapuestos a los mastocitos inhibiendo su degranulación con la consecuente disminución de reacciones alérgicas. Kimura Y y col. (2014) [353] destacaron la presencia del receptor Dectina-1 en mastocitos humanos y murinos, cuya señalización estimulaba la expresión génica del factor de transcripción Nfkbiz y de citoquinas inflamatorias, como la proteína 1 quimiotáctica de monocitos, IL-3, IL-4, IL-13 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Por su parte, Pinke KH y col (2016) [354] reportaron que los mastocitos son capaces de fagocitar y producir NO (óxido nítrico) contra *Candida albicans* a través de los receptores TLR2 / Dectina-1. Prosiguiendo con nuestros estudios de biodistribución de 1,3- $\beta$ -glucanos, hemos observado también un importante nivel de captación a nivel cerebral (del orden de los miles de picogramos/h/ml), lo cual revela la capacidad del extracto glicoproteico de Maitake para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en cerebro. Sohet F y col. (2013) [355] indicaron que la BHE es una estructura fisiológica del SNC que regula estrechamente el intercambio de moléculas, iones y células entre la sangre y cerebro, resultando fundamental para el mantenimiento homeostático del tejido nervioso. Está formada por células endoteliales –constituyentes de las paredes de los vasos sanguíneos del SNC– que se unen estrechamente formando una barrera paracelular que presenta muy baja tasa de transcitosis (transporte transcelular de macromoléculas mediado por vesículas), limitando en gran medida movimientos transcelulares de moléculas hidrofílicas entre sangre y cerebro, a diferencia de lo que ocurre en el endotelio de tejidos no neurales. Las propiedades de la BHE son reguladas tanto por células neurales como por células inmunes. En ese sentido, las células endoteliales interactúan con las células inmunitarias de la sangre, y con células del parénquima nervioso como microglia, neuronas, macrófagos, pericitos y astrocitos. Sin embargo, el SNC sano tiene un nivel extremadamente bajo de inmuno-vigilancia con ausencia casi total de leucocitos, incluyendo neutrófilos, linfocitos T y B. Nuestros resultados sugieren que los  $\beta$ -glucanos de Maitake PRO4X sorprendentemente son capaces de atravesar la BHE pese a su estructura voluminosa y alto peso molecular. Teniendo en cuenta que los compuestos unidos a proteínas plasmáticas no pueden atravesar la BHE, la pobre unión proteica de 1,3- $\beta$ -glucanos resultaría en un alto volumen de distribución, justificando en parte la distribución al SNC. Shah VH y col. (2008, 2009) [356-357] han descrito la presencia de receptores Dectina-1 en la superficie de células de la microglia –las principales células inmunes fagocíticas del SNC–. La activación del receptor Dectina-1 microglial por  $\beta$ -glucanos indujo aumento de la fosforilación de Tirosin kinasa, pero a diferencia de macrófagos y células dendríticas, no aumentó significativamente los niveles de citoquinas o quimiocinas. En consecuencia, la interacción Dectina-1 microglial con  $\beta$ -glucanos provoca una respuesta única, pudiendo jugar un papel importante en la inmunidad antifúngica en SNC. Por su parte, Bao H y col. (2016) [358] reportaron un efecto antidepresivo de los  $\beta$ -glucanos de Maitake a través de un mecanismo regulador de la señalización del receptor prefrontal Dectina-1 / AMPA. En las sinapsis de la corteza prefrontal, el tratamiento con  $\beta$ -glucanos aumentó significativamente los niveles de p-GluA1 (S845), GluA1, GluA2 y GluA3. El aumento de p-GluA1 (S845) / GluA1 y los efectos antidepresivos de  $\beta$ -glucanos de Maitake persistieron por tres días luego de suspender el tratamiento. A su vez, Laminarina -inhibidor específico de Dectina-1, y un

antagonista específico de AMPA fueron capaces de bloquear los efectos antidepresivos de los  $\beta$ -glucanos. Por lo tanto, la presencia de receptores Dectina-1 en células microgliales que integran la BHE, nos lleva a pensar que los 1,3- $\beta$ -glucanos podrían ser internalizados por células de la BHE que expresan receptores Dectina-1, y de ese modo alcanzarían el SNC. También hemos registrado una captación pulmonar importante de  $\beta$ -glucanos de Maitake. Faro-Trindade I y col. (2012) [359] han reportado que el reconocimiento innato de hongos es mediado por receptores como Dectina-1, no opsónicos, presentes en la superficie celular. El reconocimiento ocurre en fagolisosomas acidificados, un nuevo compartimento intracelular involucrado en la detección innata de patógenos extracelulares en pulmón. Volviendo a nuestros ensayos de biodistribución, hemos registrado que la menor captación de 1,3- $\beta$ -glucanos se produjo a nivel hepato-renal, esto es en órganos mayormente asociados a la metabolización y eliminación de drogas del organismo, permitiéndonos suponer menor tasa de inactivación y excreción del compuesto, lo cual podría justificar en parte su prolongada presencia en la circulación. Respecto de la menor captación hepática, Rice PJ y col. (2005) [345] han reportado previamente que el hígado no contribuye de manera significativa a la eliminación del glucano en plasma, mientras que en estudios anteriores Suda M y col (1996) [360] habían observado tras la administración intraperitoneal de 1,3- $\beta$ -D-glucano, una lenta degradación de la fracción distribuida en el hígado. Esto nos permite suponer que los 1,3- $\beta$ -glucanos no sufrirían un proceso significativo de inactivación por efecto del 1° paso hepático. En coincidencia con nuestros resultados, Nakao A y Col (1997) [361] habían estudiado previamente la presencia de 1,3- $\beta$ -D-glucano en órganos de rata a través de la prueba G, hallando la presencia de grandes cantidades del compuesto en intestino delgado y pulmón, y pequeñas cantidades en riñón e hígado. Mientras que Zhang Y y col. (2018) [362] reportaron que los  $\beta$ -glucanos de Lentinan administrados intravenosamente, se incorporaban predominantemente en hígado y bazo, con una pequeña cantidad de agregación en riñones, pulmones y estómago. Aproximadamente el 40% de la radioactividad del marcaje isotópico con Tecnecio 99 se detectó en orina y heces dentro de las 24 h posteriores a la dosificación. Los resultados obtenidos en nuestros ensayos de biodistribución por vía oral e intravenosa nos estaría sugiriendo una potencial captación de los  $\beta$ -glucanos por parte de macrófagos o mastocitos, que no solo activan, sino que multiplican y distribuyen 1,3- $\beta$ -glucanos por todo el organismo en condiciones normales. Frente a este punto nos preguntamos: ¿Cuánto mayor será dicha acción en condiciones donde hay aumento de la proliferación celular por efecto de la tumorigénesis? Enfocándonos en el desarrollo tumoral, los macrófagos y mastocitos generalmente están presentes en el microambiente tumoral y juegan un papel importante como reguladores de la inflamación, la respuesta inmunológica y la angiogénesis de dicho microambiente. Tamma R y Col (2017) [363], han evaluado la densidad de macrófagos, mastocitos y microvasos en un grupo seleccionado de diferentes tipos de tumores invasivos de carcinoma de mama. Además, han investigado el patrón de distribución de los macrófagos CD68 positivos y los mastocitos positivos para triptasa alrededor de las glándulas tumorales. Los resultados de este estudio confirman el importante papel de los macrófagos y los mastocitos en la progresión tumoral y en la angiogénesis del cáncer de mama ductal humano, y señalan la relación espacial entre los macrófagos y las glándulas tumorales, así como su correlación con la densidad microvascular.

Si bien en este trabajo no hemos podido demostrar que Maitake reduzca el tamaño tumoral murino, sí hemos hallado que sus  $\beta$ -glucanos bloquean el desarrollo tumoral mamario en el 100% de los animales tratados, lo cual es sorprendente ya que hasta el momento no existe ningún producto farmacológico que sea capaz de bloquear en su totalidad el desarrollo tumoral mamario y aniquilar la capacidad tumorigenica de 200000 células potencialmente invasivas, dispuestas a migrar no solo a un tejido blanco sino a los tejidos adyacentes. Y más relevante es el hecho de el efecto de muerte celular sea específico en células malignas sin afectar células normales. Frente a estos resultados, surge el interrogante respecto de *qué clase de mecanismo molecular poseen los  $\beta$ -glucanos para ejercer su acción antitumorigenica de una forma tan específica*. Basándonos en estudios previos y reportes de la literatura científica actual ya referidos, podemos inferir que los  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos derivados de Maitake PRO4X que ingresan a la circulación son captados por macrófagos a través de la activación de sus receptores Dectina 1, y luego distribuidos por todo el organismo en un corto período de tiempo, con acción residual, liberados como fragmentos mas pequeños activos en células tisulares, como mastocitos o histiocitos. De este modo, los  $\beta$ -glucanos ejercen sus efectos antitumorales mediante la inducción de apoptosis a través de la activación de caspasas en células tumorales, capacitando la primera línea de defensa del organismo, incrementando el nivel de leucocitos PMN neutrófilos y basófilos, promoviendo la generación de una nueva población linfocitaria de células T y Natural Killer con capacidad de reconocer e inducir muerte en células potencialmente tumorigenicas que pasen a la circulación sistémica. Finalmente, generan una barrera inmune celular esencialmente accionada por PMN Neutrófilos activados a través de la acción de mastocitos e histiocitos tisulares que circunscriben el tumor maligno a uno benigno completamente controlado por el nuevo sistema inmune activado, que resulta modulado bajo la acción de los  $\beta$ -glucanos.

Por último, considerando los principales puntos hasta aquí discutidos podemos sugerir que los  $\beta$ -glucanos de Maitake son capaces de inducir muerte apoptótica en células tumorales sin afectar células sanas, presentan baja toxicidad -incluso a dosis 400 veces superior a la considerada terapéutica-, y pueden atravesar la barrera hematoencefalica sangre-cerebro para llegar al sistema nervioso, abriendo la puerta para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Por otra parte, Maitake es capaz de modificar la expresión génica de muchas funciones biológicas (metabolismo, transporte, síntesis, ciclo celular, fosforilación, etc.), por lo cual sus efectos terapéuticos no se limitan solo a la actividad antitumoral. Sin embargo, su alta especificidad de acción sobre células tumorales lo vuelve especialmente ventajoso respecto de las drogas quimioterapéuticas que afectan a todas las células en división activa. En ese sentido, Maitake es capaz de reducir la mortalidad en comparación con la quimioterapia (Ciclofosfamida + Doxorubicina), inducir menor agresividad y necrosis tumorales, reducir la malignidad del tumor tendiendo a benignizarlo y disminuir la angiogénesis tumoral, esencial para la metástasis. Además, la asociación Maitake + quimioterapia o Maitake + Tamoxifeno puede reducir los efectos adversos de las drogas que acompaña. Estudios de citometría de flujo, demostraron un efecto inmunorestaurador significativo de Maitake a nivel ganglionar, con recupero de granulocitos polimorfonucleares y LT/NK, representando una alternativa terapéutica particularmente útil en el tratamiento de pacientes inmunosuprimidos.

## **VI- CONCLUSIONES**



En la presente tesis doctoral, hemos comprobado los efectos benéficos de Fracción D de Maitake PRO4X en la prevención de la tumorigénesis mamaria y en la capacidad inmunorestauradora de poblaciones específicas de células inmunes. Hemos comprobado la habilidad del extracto glicoproteico rico en  $\beta$ -glucanos para inducir muerte apoptótica en células tumorales sin afectar células sanas, y su baja toxicidad incluso a dosis 400 veces superior a la considerada terapéutica. Sus  $\beta$ -glucanos, además, son capaces de atravesar la barrera hematoencefalica sangre-cerebro y llegar al sistema nervioso.

Mediante ensayos fisicoquímicos, comprobamos la naturaleza ácida e hidrosoluble del extracto glicoproteico, y su capacidad de inducir muerte apoptótica *in vitro* en contacto directo con células tumorales mamarias, sin requerir activación previa del sistema inmune. La muerte tumoral fue dosis-dependiente, existiendo un umbral de activación a partir de 367  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -glucanos de Maitake. La dosis umbral, estimula la expresión de genes apoptóticos específicos, pero también modifica la expresión génica de diversidad de funciones biológicas (metabolismo, transporte, síntesis, ciclo celular, fosforilación, etc.), concluyendo que los efectos terapéuticos de Maitake implican mucho más que su actividad antitumoral.

Estudios en cultivos tumorales empleando el ligando Laminarina (inhibidor específico del receptor Dectina-1 de  $\beta$ -glucanos), demostraron menor muerte celular, concluyéndose que la unión Laminarina-Dectina bloquea la acción apoptótica de los  $\beta$ -glucanos. Por otra parte, existe mayor afinidad de los receptores Dectina por Laminarina que por los  $\beta$ -glucanos. La presencia del ligando Verapamilo a dosis de 734  $\mu\text{g/ml}$  (inhibidor de los canales cálcicos voltaje-dependientes), induce destrucción celular masiva, concluyéndose un efecto celular tóxico a dicha concentración.

En cultivos de células mamarias normales, Maitake PRO4X no produjo muerte celular, de modo que la apoptosis la indujo específicamente sobre células tumorales. Concluimos que su alta especificidad de acción representa una ventaja respecto de las drogas quimioterapéuticas que suelen afectar a todas las células en división activa, sanas y enfermas.

Mediante cultivos de células tumorales murinas, demostramos que la muerte celular inducida por Maitake en esta especie animal es independiente de la dosis y de los tiempos de incubación. Por otra parte, la quimioterapia (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) induce un efecto antitumoral más rápido (necrótico) que el de Maitake (apoptótico).

Estudios de toxicidad aguda *in vivo* en modelos murinos, demostraron que la DL50 de Maitake se halla por encima de 2000 mg/kg y que esta sobredosis no induce efectos tóxicos o letales. La misma regula el peso corporal en machos, pero como efectos secundarios presenta midriasis, piloerección, leucopenia y disminución del número de glóbulos rojos. A su vez, induce aumento del peso cardíaco, esplénico, mamario e Intestinal, con inflamación colónica. En tejido hepático reduce la densidad de vasos sanguíneos/unidad de área, así como su calibre.

Estudios en modelos murinos de toxicidad subaguda *in vivo*, demostraron que Maitake indujo descensos de peso. También redujo el consumo alimentario en hembras. Como efectos secundarios se registró caída del número de glóbulos rojos, midriasis y piloerección, concluyendo una actividad simpaticomimética del extracto glicoproteico.

Estudios de administración terapéutica en humanos, demostraron que Maitake 300 mg/kg/día no modifica parámetros hematológicos y bioquímicos, ni poblaciones linfocitarias específicas (granulocitos polimorfonucleares, monocitos, linfocitos B, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y Natural Killer), concluyendo que los efectos terapéuticos se manifiestan solo en estado de enfermedad.

Estudios *in vivo* en modelos murinos de tumorigénesis mamaria, demostraron que Maitake redujo la mortalidad comparado con la quimioterapia (Ciclofosfamida + Doxorubicina), disminuyó la agresividad y la necrosis tumorales. La coadyuvancia Maitake + Quimioterapia previno la muerte por toxicidad asociada a quimioterapia.

Estudios *in vivo* de prevención tumoral en modelos murinos, demostraron que la administración intraperitoneal de Maitake previno la enfermedad carcinogénica en un 43%, e indujo un 83% de sobrevida. Histológicamente, Maitake tendió a benignizar el tumor mamario, reduciendo su agresividad, y disminuyendo su angiogénesis.

Estudios comparativos *in vivo* de prevención tumoral en modelos murinos, demostraron que Maitake retrasó el inicio de la enfermedad, redujo la mortalidad y previno la tumorigénesis mamaria en el 100% de los casos, frente a Tamoxifeno (75%). Por otra parte, la coadyuvancia Maitake + Tamoxifeno generó un 80% de prevención tumoral. Además, Maitake tendió a aumentar el peso corporal durante la etapa de enfermedad, y atenuó las alteraciones hepáticas e intestinales (como ictericia e inflamación) inducidas por Tamoxifeno.

Estudios *in vivo* en modelos murinos de inmunosupresión, demostraron que Dexametasona (inmunosupresor) promueve la presencia de abundantes células inmunes inmaduras en circulación, mientras que el tratamiento concomitante con Maitake estimula la maduración y diferenciación celular (con presencia de granulocitos polimorfonucleares, linfocitos y células basófilas). El bloqueo de calcio extracelular (coadyuvancia Maitake + Verapamilo) afecta parcialmente el efecto inmunorestaurador para ciertas poblaciones linfocitarias. Estudios de citometría de flujo, demostraron un efecto inmunorestaurador significativo de Maitake a nivel ganglionar, con recupero de granulocitos polimorfonucleares y LT/NK, mientras que el tratamiento concomitante con Verapamilo incrementó aún más el recupero de LT/NK.

Estudios farmacocinéticos *in vivo* en modelos murinos, permiten concluir que la administración oral e intravenosa presentó valores similares de velocidad de eliminación, tiempo de concentración plasmática máxima (T máx), tiempo de vida media (T1/2), aclaramiento sistémico total y biodisponibilidad. En ambas rutas se observó más un pico de C<sub>máx</sub> y un alto volumen de distribución, concluyendo una baja unión a proteínas plasmáticas.

De los estudios de biodistribución *in vivo* en modelos murinos, hemos concluido que luego de la administración oral e intravenosa hubo mayor captación del compuesto a nivel gastrointestinal con predominio de captación gástrica, pero también importante captación en duodeno y colon (del orden de los millones de pg.h/ml). La presencia de  $\beta$ -glucanos en cerebro permite concluir la capacidad de Maitake de atravesar la BHE sangre-cerebro. La menor captación relativa registrada a nivel hepato-renal, nos permite concluir una menor tasa de inactivación y excreción del compuesto, evidenciado por el mayor tiempo de circulación del compuesto en el organismo tras una única administración.



## **VII- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**



- 1- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010.
- 2- Bray F, McCarron P, Parkin DM. *The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality*. Breast Cancer Res, 6(6):229-39, 2004.
- 3- Torres-Sánchez L, Galván-Portillo M, Lewis S, Gómez-Dantés H, López-Carrillo L. *Diet and breast cancer in latin-america*. Salud pública Méx vol.51, supl.2, 2009.
- 4- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. *Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer*. Breast Dis, 32(1-2):35-48, 2010.
- 5- Viniegra M, Paolino M, Arrossi S. *Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Informe final julio 2010: diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales, 1a ed. - Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud - OPS, 2010.*
- 6- Sierra MS, Soerjomataram I, Antoni S, Laversanne M, Piñeros M, De Vries E, et al. *Cancer patterns and trends in Central and South America*. Cancer Epidemiol., 44 Suppl 1: s23-s42, 2016.
- 7- National Cancer Institute (NCI). *Cancers Trends Progress Report*. Disponible en: <http://progressreport.cancer.gov/highlights.asp>.
- 8- Ministério da Saúde (BR). Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA. Available from: [http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativasde-incidencia-de-cancer-2012/estimativas\\_incidencia\\_cancer\\_2012.pdf](http://portal.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/estimativasde-incidencia-de-cancer-2012/estimativas_incidencia_cancer_2012.pdf).
- 9- Tiezzi DG. *Epidemiologia do câncer de mama*. Rev Bras Ginecol Obstet.;31(5):213-5. 2009.
- 10- Cnattingius S, Torrång A, Ekblom A, Granath F, Petersson G, Lambe M. *Pregnancy characteristics and maternal risk of breast cancer*. JAMA;294:2474-80, 2005.
- 11- Pisarev MA, Calandra RS, Juvenal GJ. *Fisiopatología endócrina: Bioquímica y Métodos diagnósticos*. Separata Montpellier. Fascículo XVI, vol 18 N°6, 2010.
- 12- Rodríguez S, Carpuso M. *Epidemiología del cáncer de mama*. Ginecol Obstet Max; 74(11):585-93, 2006.
- 13- Torres-Arreola L, Vladislavovna-Dubova S. *Cáncer de mama, detección oportuna en el primer nivel de atención*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc , 45(2):157-66, 2007.
- 14- Narod SA, Rodríguez AA. *Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2*. Salud Publica Mex; 53:420-429, 2011.
- 15- Salazar-Esquivel E, Paredes-López A, Calzada-Sánchez L. *Factores de riesgo hormonal durante la promoción, progresión y pronóstico tumoral mamario*. Ginecol Obstet Méx ;72:545-9, 2004.

- 16- Romero Figueroa MS, Santillán Arreygue L, Olvera Hernández PC, Morales Sánchez MA, Ramírez Mendiola VL. *Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama*. Ginecol Obstet Mex., 76(11):667-72, 2008.
- 17- Stuart K, Boyages J, Brennan M, Ung O. *Ductal carcinoma in situ--management update*. Aust Fam Physician, 34(11):949-54, 2005.
- 18- Compendio de Patología Mamaria. Sec Salud, Dir. Gral. *Salud reproductiva de México*. 1° Ed., ISBN 970-721-091-5, 2002.
- 19- Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. *Ductal carcinoma in situ of the breast*. N Engl J Med., 350(14):1430-41, 2004.
- 20- Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. *Histological and biological evolution of human premalignant breast disease*. Endocr Relat Cancer, 8(1):47-61, 2001.
- 21- Lanari C, Wargon V, Rojas P, Molinolo AA. *Antiprogesterins in breast cancer treatment: are we ready?* Endocr Relat Cancer, 19(3): R35-50, 2012.
- 22- Rakha EA, Green AR. *Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know*. Pathology, 49(2):111-119, 2017.
- 23- Carlson RW, Allred DC, Anderson BO, Burstein HJ, Carter WB, Edge SB, et al. *Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology*. J Natl Compr Canc Netw., 7(2):122-92, 2009.
- 24- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(19):10869-74, 2001.
- 25- Imigo GF, Mansilla SE, Delama G I, Poblete SMT, Fonfach ZC. *Molecular Classification of breast cancer*. Cuad. Cir., 25: 67-74, 2011.
- 26- Perou CM. *Molecular stratification of triple-negative breast cancers*. Oncologist., 15 Suppl 5:39-48, 2010.
- 27- Nounou MI, ElAmrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. *Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies*. Breast Cancer (Auckl) ,9 (Suppl 2):17-34, 2015.
- 28- Zaharia M, Gómez H. *Triple negative breast cancer: a difficult disease to diagnose and treat*. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 30(4):649-56, 2013.
- 29- Zaharia M, Prado A, Cárdenas N, Morante Z, Gómez H, Sarria G, et al. *Epidemiology of triple negative breast cancer in Peru*. Carcinomas Vol 5, Número 1, 2015.
- 30- Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, et al. *The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma*. Pharmacogenomics 14(5): p. 515-29, 2013.
- 31- Cole SP. *Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter*. J Biol Chem., 289(45):30880-8, 2014.

- 32- Yip CH, Smith RA, Anderson BO, Miller AB, Thomas DB, Ang ES, et al. *Guideline implementation for breast healthcare in low- and middle-income countries: early detection resource allocation*. Cancer, 113(8 Suppl):2244-56, 2008.
- 33- Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. *Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer*. N Engl J Med.,353(17):1784-92, 2005.
- 34- *Guía Técnica de Prevención y Control del Cáncer de Mama*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, El Salvador, 2006.
- 35- Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, et al. *Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189*. J Clin Oncol., 18(10):2059-69, 2000.
- 36- Alonso EN, Orozco M, Nieto A, Le Moglie MG, Obiol DJ, Joos G y col. *Primer estudio molecular y análisis de polimorfismos en gen BRCA 1 en pacientes con cáncer de mama en Argentina*, in Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética (ALAG): Viña del mar, Chile, 2010.
- 37- *Breast cancer treatment - An overview from the US National Cancer Institute (NCI) - Patient version*.
- 38- Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. *Breast cancer metastasis*. Cancer Genomics Proteomics, 9(5): p. 311-20, 2012.
- 39- Nicolini A, Giardino R, Carpi A, Ferrari P, Anselmi L, Colosimo S. *Metastatic breast cancer: an updating*. Biomed Pharmacother, 60(9): p.548-56, 2006.
- 40- Ingle J.N. *Pharmacogenomics of endocrine therapy in breast cancer*. J Hum Genet, 2013.
- 41- Lohmann AE, Chia S. *Patients with metastatic breast cancer using bevacizumab as a treatment is there still a role for it?* Curr Treat Options Oncol, 13(2): p. 249-62, 2012.
- 42- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 3(5): p. 391-400, 2004.
- 43- *Debate sobre el uso de tamoxifeno en mujeres en riesgo de cáncer de mama*. Rev. Panam. Salud Publica, vol.6 nro.2, Washington, 1999.
- 44- American Cancer Society. *Detailed Guide: Breast Cancer*. 2014. Accessed at [www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/index](http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/index) on September 3, 2015.
- 45- Jaure O, Alonso EN, Braico DA, Nieto A, Orozco M, Morelli C. *BRCA1 polymorphism in breast cancer patients from Argentina*. Oncol Lett., 9(2):845-850, 2015.
- 46- Mittendorf EA, Hunt KK. *Breast Cancer Immunotherapy: Is It Ready for Prime Time?* The american journal of hematology/oncology, vol. 11, nro. 9, 2015.

- 47- McArthur HL, Page DB. *Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Checkpoint Blockade, Cancer Vaccines, and Future Directions in Combination Immunotherapy*. Clinical Advances in Hematology and Oncology, vol. 14, Issue 11, 2016.
- 48- Malvicini M, Puchulo G, Matar P, Mazzolini G. *Inmunoterapia del cáncer. Importancia de controlar la inmunosupresión*. Medicina (B. Aires) vol.70 no.6, Ciudad Autónoma. Bs As, 2010.
- 49- Inogés S, Rodríguez Calvillo M, López Díaz de Cerio A, Zabalegui N, Melero I, Sánchez Ibarrola A, et al. *Active immunotherapy in the treatment of haematological neoplasias*. An. Sist. Sanit. Navar., 27 (1): 45-62, 2004.
- 50-Soliman H. *Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer*. Cancer Control, 20(1):17-21, 2013.
- 51- Valdespino-Gómez VM, Rocha-Zavaleta L. *Inmunoterapia mediada por linfocitos T en pacientes con cancer*. Vol 71, nro. 3, Cir Ciruj: 235-244, 2003.
- 52- Juang CM, Hung CF, Yeh JY, Horng HC, Twu NF, Cheng MH, et al. *Regulatory T cells: potential target in anticancer immunotherapy*. Taiwan J Obstet Gynecol., 46(3):215-21, 2007.
- 53- Creus N, Massó J, Codina C, Ribas J. *Anticuerpos monoclonales en Oncología*. Farmacia Hosp. (Madrid), vol. 26. Nro. 1, pp. 28-43, 2002.
- 54- Ocio EM, Mateos MV. *Immunotherapy and Immune Checkpoints in the Treatment of Multiple Myeloma*. Hematología, vol 19 nro. 2: 155-158, 2015.
- 55- Lin-Yu Yu, Jie Tang, Cong-Min Zhang, Wen-Jing Zeng, Han Yan, Mu-Peng Li, et al. *New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 14, 68; 2017.
- 56- Llauradó Maury G, Morris Quevedo CHJ, Albear JM, Leniher Castán Chibás, Bermúdez Savón CRS. *Eatable plants and mushroom in the immune system modulation*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 30(4):511-527, 2011.
- 57- Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. *Drug discovery from natural sources*. AAPS J, 8(2):239-53, 2006.
- 58- Roggo S. *Natural products in drug discovery*. Chimia, 61(6):312, 2007.
- 59- Paolini M. *Brussels sprouts: an exceptionally rich source of ambiguity for anticancer strategies*. Toxicol Appl Pharmacol, 152(2):293-4, 1998.
- 60- Cragg GM, Nexman DJ. *Natural product drug discovery and development. In: Phytochemicals in human health protection, nutrition, and plant defense*. New York: Ed. Romeo. Kluwer Academic, Plenum Pub;1999.
- 61- Abdullaev FI. *Plant-derived agents against cancer*. In: Gupta SK, Ed. Pharmacology and Therapeutics in the New Millennium. New Delhi: Narosa Publishing House, pp. 345–354, 2001.
- 62- Vega-Avila E, Velasco-Lezama R, Jiménez-Estrada M. *Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos*. Bioquímica. Vol. 31 No. 3, p. 97-111, 2006.

- 63- Barquero, A. *Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro*. Revista Química Viva- Número 2, año 6, 2007.
- 64- Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. *Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico*. Rev. Mexicana de Ciencias farmacéuticas, Vol 41, Nro 4, 2010.
- 65- Laza Loaces D, Rodríguez Luis I, Sardiña Cabrera G. *Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales*. Rev. Cubana Plant Med, Vol.8, Nro.3, 2003.
- 66- OMS. *Cuidados primarios de Salud*. Relatorio de la Conferencia Internacional sobre cuidados primarios de la salud, Alma. Ata, URSS, 1978.
- 67- Salim AA, Chin YW, Kinghorn AD. *Chapter 1, Drug Discovery from Plants. In: Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. Chapter DOI: 10.1007 / 978-3-540-74603-4\_1, 2008.
- 68- Chatterjee S, Biswas G, Kumar Basu S, Acharya K. *Antineoplastic effect of mushrooms: a review*. AJCS 5(7):904-911, 2011.
- 69- Brizuela MAG L, Pérez L., Mansur M. *Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios*. Revista iberoamericana de micología,15(2): p. 69-74, 1998.
- 70- Soumya Chatterjee GB, Saikat Kumar Basu, Krishnendu Acharya. *Antineoplastic effect of mushrooms: a review*. AJCS, 5(7): p. 904-911, 2011.
- 71- Moretti A, Susca A, Mulé G, Logrieco AF, Proctor RH. *Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety*. Int J Food Microbiol, 2013.
- 72- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. *Relationship between secondary metabolism and fungal development*. Microbiol Mol Biol Rev, 66(3): p. 447-59, 2002.
- 73- Illana-Esteban C. *The fungus maitake (Grifola frondosa) and its therapeutic potential*. Rev Iberoam Micol.,25(3):141-4, 2008.
- 74- Curvetto N. *Grifola frondosa (Maitake): su valor nutracéutico, nutricéutico, farmacéutico y cosmeceútico*. Tecnología de producción. 2009.
- 75- Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. *Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites*. Mediators of Inflammation, (2): p. 63-80, 2005.
- 76- George P, Hegde N. *Muscarinic toxicity among family members after consumption of mushrooms*. Toxicol Int, 20(1): p. 113-5, 2013.
- 77- Saviuc P, Danel V. *New syndromes in mushroom poisoning*. Toxicol Rev, 25(3): p. 199-209, 2006.
- 78- Medicinal Mushrooms (PDQ®): Health Professional Version. *PDQ Integrative, Alternative and Complementary Therapies*. Editorial Board. 2016
- 79- Jiang J, Sliva D. *Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells*. International journal of oncology, 37:1529-1536, 2010.

- 80- Pizarro SC, Ronco AMM, Gotteland MR.  *$\beta$ -glucans: what types exist and what are their health benefits?* Rev Chil Nutr, 41(3): 439-446, 2014.
- 81- Volman, JJ. *Immune modulation by dietary glucans from oat and mushrooms; results from in vitro, animal and human studies (Thesis)*. University Pers Maastricht, ISBN 978-90-5278-911-8, 2009.
- 82- Tzianabos AO. *Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function*. Clin Micro Rev., 13:523-533, 2000.
- 83- Demir G, Klein HO, Mandel-Molinas N, Tuzuner N. *Beta glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer*. Int Immunopharmacol, 7(1): p. 113-6, 2007.
- 84- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. *Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans*. J Exp Med, 197(9): p. 1119-24, 2003.
- 85- Mizuno T. *The Extraction and Development of Antitumor-Active Polysaccharides from Medicinal Mushrooms in Japan (Review)*. International Journal of Medicinal Mushrooms 1: 9-29, 1999.
- 86- Mao GH, Ren Y, Feng WW, Li Q, Wu HY, Jin D, et al. *Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from Grifola frondosa*. Carbohydr Polym.,134:406-12, 2015.
- 87- Kodama N, Murata Y, Nanba H. *Administration of a polysaccharide from Grifola frondosa stimulates immune function of normal mice*. J Med Food, 7(2):141-5, 2004.
- 88- Kodama N, Asakawa A, Inui A, Masuda Y, Nanba H. *Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from Grifola frondosa*. Oncol Rep.,13(3):497-502, 2005.
- 89- Hishida I, Nanba H, Kuroda H. *Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of Grifola frondosa (maitake)*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 36(5): p. 1819-27, 1988.
- 90- Mayell, M. *Maitake extracts and their therapeutic potential*. Altern Med Rev, 6(1): p. 48-60, 2001.
- 91- Kodama N, Komuta K, Nanba H. *Effect of Maitake (Grifola frondosa) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients*. Journal of Medicinal Food. 6 (4): 371–7, 2003.
- 92- Kodama N, Komuta K, Sakai N, Nanba H. *Effects of D-Fraction, a polysaccharide from Grifola frondosa on tumor growth involve activation of NK cells*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 25 (12): 1647–50, 2002.
- 93- Kodama N, Komuta K, Nanba H. *Can maitake MD-fraction aid cancer patients?* Alternative Medicine Review. 7 (3): 236–9, 2002.
- 94- Nanba H, Kubo K. *Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention*. Annals of the New York Academy of Sciences. 833 (1 Cancer): 204–7, 1997.

- 95- Giavasis I. *Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals*. Curr Opin Biotechnol. 26:162-73. 2014.
- 96- Ferreira IC, Vaz JA, Vasconcelos MH, Martins A. *Compounds from wild mushrooms with antitumor potential*. Anticancer Agents Med Chem, 10(5): 424-436, 2010.
- 97- De Silva DD, Rapior S, Fons F, Bahkali AH, Hyde KD. *Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action*. Fungal Diversity, 55, 1-35, 2012.
- 98- Balogh GA, Obiol DJ, Alonso EN. *Maitake-Fraction D y sus efectos terapéuticos en cáncer de mama*. Editorial Académica Española, 2012.
- 99- Murray M, Birdsall T, Pizzorno J, Reilly P. *How to Prevent and Treat Cancer with Natural Medicine*. ISBN: 84-7927-658-4. Ed. Robinbook, Barcelona, 2004.
- 100- CAA Cap. XVI. *Correctivos y coadyuvantes*. De [www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_XVI.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVI.pdf)
- 101- Nanba H. *El hongo Maitake, potente anticancerígeno y adaptógeno*. Natura Medicatrix. 43: p. 1-4, 1996.
- 102- Wasser SP, Weis AL. *Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective*. Crit Rev Immunol, 19(1): p. 65-96, 1999.
- 103- Zhuang C, Wasser SP. *Medicinal Value of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom Grifola frondosa (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Aphyllphoromycetideae)*. Review. 6(4): p. 28, 2004.
- 104- Zhuang C, Mizuno T. *Biological Responses from Grifola frondosa (Dick.: Fr.) S. F. Gray-Maitake (Aphyllphoromycetideae)*, 1(4): p. 317-324, 1999.
- 105- Kodama N, Komuta K, Sakai N, Namba H. *Effects of D-Fraction, a polysaccharide from Grifola frondosa on tumor growth involve activation of NK cells*. Biol Pharm Bull, 25(12): p. 1647-1650, 2002.
- 106- Postemsky PD, Curvetto NR. *In Vitro Studies of Secondary Metabolite-Related Responses in Some Species of Genus Grifola (Agaricomycetes) from Argentina*. Int J Med Mushrooms., 18(4):355-63, 2016.
- 107- De Bruijn J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz M, France A. *Antioxidant properties of extracts obtained from Grifola gargal mushrooms*. Micologia Aplicada International, 21(1), pp. 11-18, 2009.
- 108- Pozzi C, Lorenzo L, Rajchenberg M. *Un hospedaje exótico del hongo comestible Grifola gargal (Basidiomycota, Fungi)*. Bol. Soc. Argent. Bot. Vol 44. Nro. 1-2, Córdoba, 2009.
- 109- Postemsky PD, Palermo AM, Curvetto NR. *Protective effects of new medicinal mushroom, Grifola gargal singer (higher Basidiomycetes), on induced DNA damage in somatic cells of Drosophila melanogaster*. Int J Med Mushrooms.,13(6):583-94, 2011.

- 110- Harada E, Morizono T, Sumiya T, Kawagishi H. *Effect of the Medicinal Mushroom, Grifola gargal (Agaricomycetes), on Bone Turnover Markers and Serum Lipids in Middle-Aged and Elderly Japanese Women*. Int J Med Mushrooms,18(1):1-7, 2016.
- 111- Harada E, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Morizono T, Chelakkot-Govindalayathil AL, Roegen Z, et al. *Amelioration of Atherosclerosis by the New Medicinal Mushroom Grifola gargal Singer*. J Med Food.,18(8):872-81, 2015.
- 112- Lull C, Wichers H, Savelkoul HF. *Antiinflammatory and immunomodulating Properties of fungal metabolites*. Rev Mediators of inflammation, (2): p.63-68, 2005.
- 113- Chen J, Seviour R. *Medicinal Importance of fungal  $\beta$ -(1,3), (1,6)-glucans*. Rev Mycological Research, 111(Pt 6):635-52, 2007.
- 114- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 6 ed.: Elsevier Science Publishers
- 115- Chi-Fung Chan G, Keung Chan W, Man-Yuen Sze D. *The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells*. Journal of Hematology & Oncology, 2:25, 2009.
- 116- Masuda Y, Togo T, Mizuno S, Konishi M, Nanba H. *Soluble beta-glucan from Grifola frondosa induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway*. J Leukoc Biol, 91(4): p. 547-56, 2012.
- 117- Kodama N, Yamada M, Nanba H. *Addition of Maitake D-fraction reduces the effective dosage of vancomycin for the treatment of Listeria-infected mice*. Jpn J Pharmacol, 87(4): 327-332, 2001.
- 118- Kodama N, Asakawa A, Inui A, Masuda Y, Nanba H. *Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from Grifola frondosa*. Oncol Rep, 13(3): 497-502, 2005.
- 119- Inoue A, Kodama N, Nanba H. *Effect of maitake (Grifola frondosa) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion*. Biol Pharm Bull, 25(4): 536-540, 2002.
- 120- Sanzen I, Imanishi N, Takamatsu N, Konosu S, Mantani N, Terasawa K, et al. *Nitric oxidemediated antitumor activity induced by the extract from Grifola frondosa (Maitake mushroom) in a macrophage cell line, RAW264.7*. J Exp Clin Cancer Res, 20(4): 591-597, 2001.
- 121- Svagelj M, Berovic M, Gregori A, Wraber B, Simcic S, Boh B. *Immunomodulating activities of cultivated maitake medicinal mushroom grifola frondosa (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (higher basidiomycetes) on peripheral Blood Mononuclear Cells*. Int J Med Mushrooms, 14(4): p. 377-83, 2012.
- 122- Masuda Y, Murata Y, Hayashi M, Nanba H. *Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells*. Biol Pharm Bull, 2008. 31(6): p. 1104-8.
- 123- Kodama N, Komuta K, Nanba H. *Effect of Maitake (Grifola frondosa) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients*. J Med Food, 6(4): p. 371-7, 2003.

- 124- Harada N, Kodama N, Nanba H. *Relationship between dendritic cells and the D-fraction-induced Th-1 dominant response in BALB/c tumor-bearing mice*. Cancer Letters 192, 181–187, 2003.
- 125- Baran J, Allendorf DJ, Hong F, Ross GD. *Oral  $\beta$ -glucan adjuvant therapy converts nonprotective Th2 response to protective Th1 cell mediated immune response in mammary tumor-bearing mice*. Folia Histochem Cytobiol., 45(2):107-14, 2007.
- 126- Nanba H. *Maitake D-fraction: Healing and Preventive Potential for Cancer*. The Journal of Orthomolecular Medicine, 12: p. 43-49, 1997.
- 127- Kodama N, Murata Y, Asakawa A, Inui A, Hayashi M, Sakai N, Nanba H. *Maitake D-Fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumorbearing mice*. Nutrition, 21(5): p. 624-9, 2005.
- 128- Lin H, She YH, Cassileth BR, Sirotiak F, Cunningham Rundles S. *Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro*. Int Immunopharmacol, 4(1): p. 91-9, 2004.
- 129- Masuda Y, Inoue M, Miyata A, Mizuno S, Nanba H. *Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice*. Int Immunopharmacol, 9(5): p. 620-6, 2009.
- 130- Soares R, Alonso EN, Balogh GA. *Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation*. J Med Food, 14(6): p. 563-72, 2011.
- 131- Alexander B, Fishman AI, Eshghi M, Choudhury M, Konno S. *Induction of Cell Death in Renal Cell Carcinoma with Combination of D-Fraction and Vitamin C*. Integr Cancer Ther, 2013.
- 132- Shomori K, Yamamoto M, Arifuku I, Teramachi K, Ito H. *Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (Grifola frondosa) on human gastric cancer cell lines*. Oncol Rep, 22(3): p. 615-20, 2009.
- 133- Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S. *Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide)*. Mol Urol, 4(1): p. 7-13, 2000.
- 134- Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. *CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases*. Adv Cancer Res, 106: p. 91-111, 2010.
- 135- Lee JS, Park BC, Ko YJ, Choi MK, Choi HG, Yong CS, et al. *Grifola frondosa (maitake mushroom) water extract inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis through inhibition of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation*. J Med Food, 11(4): p. 643-51, 2008.
- 136- Nanba H. *Activity of maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis*. Ann N Y Acad Sci, 768: p. 243-5, 1995.
- 137- Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F. *Effects of Lentinus edodes, Grifola frondosa and Pleurotus ostreatus administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-Nbutanolnitrosoamine*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 19(2): p. 175-83, 1997.

- 138- Leonard RC, Williams S, Tulpule A, Levine AM, Oliveros S. *Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet)*. Breast, 18: 218-24, 2009.
- 139- Abdullaev Jafarova F, Caballero Ortega H, Riverón Negrete L, Pereda Miranda R, Rivera Luna R, Hernández JM, et al. *Evaluación in vitro del potencial quimiopreventivo del azafrán*. Revista de investigación clínica, ISSN 0034-8376, Vol. 54, N° 5, págs. 430-436, 2002.
- 140- Wang J, Li Y, Dong X, Wang Y, Chong X, Yu T, Zhang F, et al. *A Micelle Self-Assembled from Doxorubicin-Arabinoside Conjugates with pH-Cleavable Bond for Synergistic Antitumor Therapy*. Nanoscale Res Lett, 12(1):73, 2017.
- 141- Skeel RT, Khleif SN. *Handbook of cancer chemotherapy*. 8 ed.: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- 142- Dy GK, Adjei AA. *Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies*. CA Cancer J Clin, 63(4):249-79, 2013.
- 143- Navarrete Hurtado S, Castellanos Mejía AM, Chaparro Sanabria A. *Cardiotoxicidad por quimioterapia, Un enfoque práctico para el clínico*. Insuf. card. vol.6 no.3, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2011.
- 144- Leonard RC, Williams S, Tulpule A, Levine AM, Oliveros S. *Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet)*. Breast, 18(4):218-24, 2009.
- 145- Chen ZI, Ai DI. *Cardiotoxicity associated with targeted cancer therapies*. Mol Clin Oncol., 4(5):675-681, 2016.
- 146- Makker PG, Duffy SS, Lees JG, Perera CJ, Tonkin RS, Butovsky O, et al. *Characterisation of Immune and Neuroinflammatory Changes Associated with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy*. PLoS One, 26;12(1): e0170814, 2017.
- 147- Deng G, Cassileth BR. *Integrative oncology: complementary therapies for pain, anxiety, and mood disturbance*. CA Cancer J Clin., 55(2):109-16, 2005.
- 148- Galiano-Castillo N, Arroyo-Morales M, Ariza-Garcia A, Fernández-Lao C, Fernández-Fernández AJ, Cantarero-Villanueva I. *Factors that Explain the Cancer-Related Insomnia*. Breast J., 2017.
- 149- Deprez S, Amant F, Yigit R, Porke K, Verhoeven J, Van den Stock J, et al. *Chemotherapy-induced structural changes in cerebral white matter and its correlation with impaired cognitive functioning in breast cancer patients*. Hum Brain Mapp, 32(3):480-93, 2011.
- 150- Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo VE. *Terapias moleculares dirigidas en los pacientes con cáncer: logros y perspectivas*. Gac Méd Méx Vol. 144 No. 4, 2008.
- 151- Krajewski KM, Braschi-Amirfarzan M, DiPiro PJ, Jagannathan JP, Shinagare AB. *Molecular Targeted Therapy in Modern Oncology: Imaging Assessment of Treatment Response and Toxicities*. Korean J Radiol., 18(1):28-41, 2017.

- 152- Yang JC, Rosenberg SA. Adoptive T-Cell Therapy for Cancer. *Adv Immunol.*, 130:279-94, 2016.
- 153- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.* *Nat Rev Immunol.*, 12(4):269-81, 2012.
- 154- Panthong S, Boonsathorn N, Chuchawankul S. *Antioxidant activity, anti-proliferative activity, and amino acid profiles of ethanolic extracts of edible mushrooms.* *Genet Mol Res.*, 15(4), 2016.
- 155- Vetchinkina E, Shirokov A, Bucharskaya A, Navolokin N, Prilepskii A, Burov A, et al. *Antitumor Activity of Extracts from Medicinal Basidiomycetes Mushrooms.* *Int J Med Mushrooms*, 18(11): 955-964, 2016.
- 156- Lu CC, Hsu YJ, Chang CJ, Lin CS, Martel J, Ojcius DM, et al. *Immunomodulatory properties of medicinal mushrooms: differential effects of water and ethanol extracts on NK cell-mediated cytotoxicity.* *Innate Immun.*, 22(7):522-33, 2016.
- 157- Jiang J, Sliva D. *Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells.* *Int J Oncol.*, 37(6):1529-36, 2010.
- 158- Ma XL, Meng M, Han LR, Li Z, Cao XH, Wang CL. *Immunomodulatory activity of macromolecular polysaccharide isolated from Grifola frondosa.* *Chin J Nat Med.*, 13(12):906-14, 2015.
- 159- Masuda Y, Nawa D, Nakayama Y, Konishi M, Nanba H. *Soluble  $\beta$ -glucan from Grifola frondosa induces tumor regression in synergy with TLR9 agonist via dendritic cell-mediated immunity.* *J Leukoc Biol.*, 98(6):1015-25, 2015.
- 160- Roldan-Deamicis A, Alonso E, Brie B, Braico DA, Balogh GA. *Maitake Pro4X has anti-cancer activity and prevents oncogenesis in BALBc mice.* *Cancer Med.*, 5(9):2427-41, 2016.
- 161- Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer.* *Cell*, 100(1): 57-70, 2000.
- 162-Levenson AS, Jordan VC. *MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line.* *Cancer Res*, 57(15): 3071-3078, 1997.
- 163-Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.* *Methods*;30(3):256-68, 2003.
- 164- Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP, et al. *Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways.* *Mol Endocrinol*, 21(6): p. 1335-58, 2007.
- 165- Park, H.K., Kim I.H., Kim, J., Nam, T.J. *Induction of apoptosis by laminarin, regulating the insulin-like growth factor-IR signaling pathways in HT-29 human colon cells.* *Int. J. Mol. Med.* 30, 734–738, 2012.
- 166- Park, H.K., Kim, J., Nam, T.J. *Induction of apoptosis and regulation of ErbB signaling by laminarin in HT-29 human colon cancer cells.* *Int. J. Mol. Med.* 32, 291–295, 2013.

- 167- Ujita M, Nagayama H, Kanie S, Koike S, Ikeyama Y, Ozaki T, et al. *Carbohydrate Binding Specificity of Recombinant Human Macrophage-Glucan Receptor Dectin-1*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (1), 237–240, 2009.
- 168- Frei M. *Cell Viability and Proliferation*. *BioFiles*, vol 6, N°5, 17–21.
- 169- Soares R, Joos G, Obiol D, Alonso E, Balogh G. *Apoptosis and cell-death induction in breast cancer epithelial cells induced by beta glucans compound*. *Journal of Medicinal Food*, 20 (2): p. 1-10. 2011.
- 170-[http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Verapamilo%20tabs.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Verapamilo%20tabs.htm)
- 171- Wallace H. *Principles and methods of toxicology*. 2 ed. New York: Raven, 169-88, 1989.
- 172- Cory AH, Owen TC, Bartrop JA, Cory JG. *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. *Cancer Commun* 3(7), 207–212, 1991.
- 173- Riss T.L., Moravec, R.A. *Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays*. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)* 3, 184a, 1992.
- 174- Conaghan J, Chen A.A, Willman SP, Ivani K, Chenette PE., Boostanfar R, Baker VL, et. al. *Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial*. *Fertility and Sterility*, 100(2): 412-419, 2013.
- 175- Wong C, Chen A, Behr B, Shen S. *Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research*. *Reproductive BioMedicine Online*, 26: 120-129, 2013.
- 176- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. *J Cell Biol.*; 119(3):493-501, 1992.
- 177- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. *In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations*. *J Histochem Cytochem.*;44(9):959-68, 1996.
- 178- Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. *Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay*. *Methods*; 44(3): 250–254, 2008.
- 179- Loo YM, Gale M Jr. *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. *Immunity*;34(5):680-92, 2011.
- 180- Pérez Machín M, Monteagudo Jiménez EE, Boffill Cárdenas MA, Méndez Triana R, Verdecía Machado B. *Evaluation of the acute toxicity of the method fixed dose procedure of an extract of *Boldea prurpurascens* Cav.* *Rev electrónica de Veterinaria* 1695-7504, vol IX, Nro 3, 2008.
- 181- Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Wiley, 2011.

- 182- Geran RI, Greenberg HM, McDonald M, Abbott BJ. *Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems*. Cancer Chemoth Rep.,33:1–17, 1972.
- 183- Del Coco VF, Córdoba MA, Sparo MD, Basualdo JA. *Persistencia intestinal y efecto inmunomodulador de Enterococcus faecalis CECT7121 en ratones inmunosuprimidos con dexametasona*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Médicas, 2(2):1-2, 2010.
- 184- Sánchez AL, Barrios EE, Sardiña AA, Araque W, Delgado V. *Experimental Infection using Human Isolates of Blastocystis sp. in Dexamethasone Immunosuppressed Mice*. Kasmera 40(1): 67 - 77, 2012.
- 185- Gorriti A, Arroyo J, Quispe F, Cisneros B, Condorhuamán M, Almora Y, et al. *Toxicidad oral a 60 días del aceite de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) y linaza (Linum usitatissimum L.) y determinación de la dosis letal 50 en roedores*. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 27(3): 352-60, 2010.
- 186- EPA. U.S. *Integrated Risk Information System*. Glossary of IRIS terms, 1999. Disponible en: [www.epa.gov/iris/gloss8.htm](http://www.epa.gov/iris/gloss8.htm).
- 187- Goodman J.L. *The traditional toxicologic paradigm is correct: Dose influences mechanism*. Environ. Health Persp; 106(1):285-288. 1998.
- 188- Pérez Machín M., Monteagudo Giménez E., Boffill Cárdenas M, Méndez Triana R., Verdecía Machado B. *Evaluation of the acute toxicity of the method fixed dose procedure of an extract of Boldoa prurpurascens Cav*. REDVET, VOL IX, N°3, 1695-7504. 2008.
- 189- OECD. *Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental*. Francia: Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Inc.; 2007.
- 190- Vaclav Vetvicka PhD, Jana Vetvickova MS. *A Comparison of Injected and Orally Administered  $\beta$ -glucans*. Jana Vol. 11, No.1, 2008.
- 191- Srinivas Rajamahanty, Brandon Louie, Cormac O'Neill, Muhammad Choudhury, Sensuke Konno. *Possible disease remission in patient with invasive bladder cancer with D-fraction regimen*. International Journal of General Medicine :2 15–17. 2009.
- 192- *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. The National Academies Press, 2011.
- 193- *Paraffin Processing of Tissue*; Available from: <http://protocolsonline.com/histology/sample-preparation/paraffn-processing-of-tissue/>. 2012.
- 194- Simms D. *Trizol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA*. Focus, 15(4): p99, 1993.
- 195- Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 162(1): 156-159, 1987.
- 196- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

- 197- Benavides A, Calvo S, Tornero D, González-García C, Ceña V. *Adrenal medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture*. *Neuroscience*;128(1):99-109, 2004.
- 198- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. *Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer*. *Nat Genet*, 14(4): p 457-60, 1996.
- 199- Wallace RW. *DNA on a chip: serving up the genome for diagnostics and research*. *Mol Med Today*, 3(9): p. 384-9, 1997.
- 200- Alonso EN, Orozco M, Eloy Nieto A, Balogh GA. *Genes related to suppression of malignant phenotype induced by Maitake D-Fraction in breast cancer cells*. *J Med Food*. 16(7):602-17, 2013.
- 201- Bao H, Ran P, Zhu M, Sun L, Li B, Hou Y, et al. *The Prefrontal Dectin-1/AMPA Receptor Signaling Pathway Mediates the Robust and Prolonged Antidepressant Effect of Proteo- $\beta$ -Glucan from Maitake*. *Sci Rep.*; 6:28395. 2016.
- 202- Directiva 2010/63/UE del Parlamento europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la *Protección de los animales utilizados para fines científicos*. Diario Oficial de la Unión Europea. 2010.
- 203- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. *Krestin (PSK)*. *Cancer Treat Rev*.11(2):131-55. 1984.
- 204- Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, et al.  *$\beta$ -Glucan in Foods and Its Physiological Functions*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* ;64(1):8-17. 2018.
- 205- Brown GD, Gordon S. *Immune recognition. A new receptor for beta-glucans*. *Nature*; 413 (6851):36-7. 2001.
- 206- Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. *Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages*. *J Exp Med.*; 196(3):407-12. 2002.
- 207- Konno S. *Effect of various natural products on growth of bladder cancer cells: two promising mushroom extracts*. *Altern Med Rev*. 12(1):63-8. 2007.
- 208- Shomori K, Yamamoto M, Arifuku I, Teramachi K, Ito H. *Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (*Grifola frondosa*) on human gastric cancer cell lines*. *Oncol Rep.*; 22(3):615-20. 2009.
- 209- Alonso EN, Ferronato MJ, Gandini NA, Fermento ME, Obiol DJ, López Romero A, et al. *Antitumoral Effects of D-Fraction from Grifola Frondosa (Maitake) Mushroom in Breast Cancer*. *Nutr Cancer.*; 69(1):29-43. 2017.
- 210- Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, et al. *Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide)*. *Mol Urol.*;4(1):7-13. 2000.

- 211- Degen M, Alexander B, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. *Alternative therapeutic approach to renal-cell carcinoma: induction of apoptosis with combination of vitamin K3 and D-fraction*. J Endourol.; 27(12):1499-503. 2013.
- 212- Li ZD, Yi W, Qi YP, Li Y. *Induction of Apoptosis in Tumor Cells by a Recombinant Adenovirus with bak Gene*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai); 32(4):383-386. 2000.
- 213- Choromanska A, Kulbacka J, Harasym J, Oledzki R, Szewczyk A, Saczko J. *High- and low-Molecular Weight oat Beta-Glucan Reveals Antitumor Activity in Human Epithelial Lung Cancer*. Pathol Oncol Res.; 24(3):583-592. 2018.
- 214- Zhu W, Zhu N, Bai D, Miao J, Zou S. *The crosstalk between Dectin1 and TLR4 via NF- $\kappa$ B subunits p65/RelB in mammary epithelial cells*. Int Immunopharmacol.; 23(2):417-25. 2014.
- 215- Xia Y, Liu L, Bai Q, Wang J, Xi W, Qu Y, et al. *Dectin-1 predicts adverse postoperative prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma*. Sci Rep.;6:32657. 2016.
- 216- Ujita M, Nagayama H, Kanie S, Koike S, Ikeyama Y, Ozaki T, et al. *Carbohydrate binding specificity of recombinant human macrophage beta-glucan receptor dectin-1*. Biosci Biotechnol Biochem.;73(1):237-40. 2009.
- 217- Cui FJ, Li Y, Xu YY, Liu ZQ, Huang DM, Zhang ZC, et al. *Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of Grifola frondosa GF9801*. Toxicol In Vitro; 21(3):417-27. 2007.
- 218- Louie B, Rajamahanty S, Won J, Choudhury M, Konno S. *Synergistic potentiation of interferon activity with maitake mushroom d-fraction on bladder cancer cells*. BJU Int.;105(7):1011-5. 2010.
- 219- Pyo P, Louie B, Rajamahanty S, Choudhury M, Konno S. *Possible immunotherapeutic potentiation with D-fraction in prostate cancer cells*. J Hematol Oncol.; 1:25. 2008.
- 220- Yakisich JS, Kulkarni Y, Azad N, Iyer AKV. *Selective and Irreversible Induction of Necroptotic Cell Death in Lung Tumorspheres by Short-Term Exposure to Verapamil in Combination with Sorafenib*. Stem Cells Int. ; 2017:5987015. 2017.
- 221- Pająk B, Kania E, Gajkowska B, Orzechowski A. *Verapamil-induced autophagy-like process in colon adenocarcinoma COLO 205 cells; the ultrastructural studies*. Pharmacol Rep.; 64(4):991-6. 2012.
- 222- Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. *The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines*. Breast Cancer (Auckl).;4:35-41. 2010.
- 223- Kugawa F, Ueno A, Kawasaki M, Aoki M. *Evaluation of cell death caused by CDF (cyclophosphamide, doxorubicin, 5-fluorouracil) multi-drug administration in the human breast cancer cell line MCF-7*. Biol Pharm Bull.; 27(3):392-8. 2004.

- 224- Pérez Machín M., Monteagudo Giménez E., Boffill Cárdenas M, Méndez Triana R, Verdecía Machado B. *Evaluation of the acute toxicity of the method fixed dose procedure of an extract of *Boldoa prurpurascens* Cav.* REDVET, VOL IX, N°3, 1695-7504. 2008.
- 225- Saleem U, Amin S, Ahmad B, Azeem H, Anwar F, Mary S. *Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG.* Toxicol Rep.; 4:580-585. 2017.
- 226- Kubo K, Nanba H. *The effect of maitake mushrooms on liver and serum lipids.* Altern Ther Health Med.; 2(5):62-6. 1996.
- 227- Kubo K, Nanba H. *Anti-hyperliposis effect of maitake fruit body (*Grifola frondosa*).* I. Biol Pharm Bull.; 20:781-785. 1997.
- 228- Minamino K, Nagasawa Y, Ohtsuru M. *A water-soluble extract from *Grifola frondosa*, Maitake mushroom, decreases lipid droplets in brown adipocyte tissue cells.* J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).; 54(6):497-500. 2008.
- 229- Huang XF, Yu Y, Beck EJ, South T, Li Y, Batterham MJ, et al. *Diet high in oat  $\beta$ -glucan activates the gut-hypothalamic (*PYY*<sub>3-36</sub>-*NPY*) axis and increases satiety in diet-induced obesity in mice.* Mol Nutr Food Res.; 55(7):1118-21. 2011.
- 230- Vitaglione P, Lumaga RB, Stanzione A, Scalfi L, Fogliano V. *Beta-Glucan-enriched bread reduces energy intake and modifies plasma ghrelin and peptide YY concentrations in the short term.* Appetite.; 53(3):338-44. 2009.
- 231- Volman JJ, Mensink RP, Ramakers JD, de Winther MP, Carlsen H, Blomhoff R, et al. *Dietary (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4) Beta-D-glucans from oat activate nuclear factor-kappaB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice.* Nutr Res.; 30(1): 40-8. 2010.
- 232- Cui W, Wood PJ, Blackwell B, Nikiforuk J. *Physicochemical properties and structural characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of wheat Beta-D-glucan-comparison with other cereal Beta-D-glucans.* Carbohydr Polym.; 41(3): 249-58. 2000.
- 233- Miller SS, Fulcher RG, Sen A, Arnason JT. *Oat endosperm cell walls. Isolation, composition and comparison with other tissues.* Cereal Chem.; 72: 421-7. 1995.
- 234- Othman RA, Moghadasian MH, Jones PJ. *Cholesterol-lowering effects of oat  $\beta$ -glucan.* Nutr Rev.;69(6):299-309. 2011.
- 235- Miller SS, Wood PJ, Pietrzak LN, Flucher RG. *Mixed linkage  $\beta$ -glucan, protein content, and kernel weight in *Avena* species.* Cereal Chem.; 70(2): 231-3. 1993.
- 236- Ajithkumar A, Andersson R, Aman P. *Content and molecular weight of extractable beta-glucan in American and Swedish oat samples.* J Agric Food Chem.; 53(4): 1205-9. 2005.
- 237- Peterson DM, Wesenberg DM, Burrup DE.  *$\beta$ -Glucan Content and Its Relationship to Agronomic Characteristics in Elite Oat Germplasm.* Crop Sci.; 35(4): 965-70. 1995.
- 238- Stuart IM, Loi L, Fincher GB. *Immunological comparison of (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-*b*-glucan endohydrolases in germinating cereals.* J Cereal Sci.; 6(1): 45-52. 1987.

- 239- Áman P, Rimsten L, Andersson R. *Molecular weight distribution of beta-glucan in oat-based foods*. Cereal Chem.; 81(3): 356-60. 2004.
- 240- Decker EA, Rose DJ, Stewart D. *Processing of oats and the impact of processing operations on nutrition and health benefits*. Br J Nutr.; 112 (Suppl 2): S58-64. 2014.
- 241- Saastamiunen M, Hietaniemi V, Pihlava JM.  *$\beta$ -Glucan contents of groats of different oat cultivars in official variety, in organic cultivation, and in nitrogen fertilization trials in Finland*. Agr Food Sci.;13(1-2): 68-79. 2004.
- 242- Dvončová D, Havrlentová M, Hlinková A, Hozlár P. *Effect of fertilization and variety on the  $\beta$ -glucan content in the grain of oats*. Food Sci Tech Quality.; 17(70): 108-16. 2010
- 243- Wood PJ. *Cereal  $\beta$ -glucans in diet and health*. J Cereal Sci.; 46(3): 230-8. 2007.
- 244- Erkkila AT, Lichtenstein AH. *Fiber and cardiovascular disease risk: how strong is the evidence?* J Cardiovasc Nurs.; 21(1): 3-8. 2006.
- 245-Tiwari U, Cummins E. *Meta-analysis of the effect of beta-glucan intake on blood cholesterol and glucose levels*. Nutrition.; 27(10): 1008-16. 2011.
- 246- Kim HJ, White PJ. *Interactional effects of beta-glucan, starch, and protein in heated oat slurries on viscosity and in vitro bile acid binding*. J Agric Food Chem.; 60(24): 6217-22. 2012.
- 247- Andersson M, Ellegard L, Andersson H. *Oat bran stimulates bile acid synthesis within 8 h as measured by 7 $\alpha$ -hydroxy- 4-cholesten-3-one*. Am J Clin Nutr.; 76(5): 1111-6. 2002.
- 248- Food and Drug Administration (FDA). *Soluble fibre from whole oats and coronary heart disease health claim*. Fed Regist.; 62: 3583-601. 1997.
- 249- European Food Safety Agency (EFSA). *Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to oat beta glucan and lowering blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006*. EFSA J. 2010: 1885-99.
- 250- Wolever TM, Tosh SM, Gibbs AL, Brand-Miller J, Duncan A M, Hart V, et al. *Physicochemical properties of oat beta-glucan influence its ability to reduce serum LDL cholesterol in humans: a randomized clinical trial*. Am J Clin Nutr.; 92(4): 723-32. 2010.
- 251- Kim SY, Song HJ, Lee YY, Cho KH, Roh YK. *Biomedical issues of dietary fiber beta-glucan*. J Korean Med Sci.; 21(5): 781-9. 2006.
- 252- Wang Q, Ellis PR, Ross-Murphy SB. *Dissolution kinetics of guar gum powders-II. Effects of concentration and molecular weight*. Carbohydr Polym.; 53(1): 75-83. 2003.
- 253- Whitehead A, Beck EJ, Tosh S, Wolever TM. *Cholesterol-lowering effects of oat beta-glucan: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Am J Clin Nutr.; 100(6): 1413-21. 2014.
- 254- Boulard G, Marguinaud E, Sesay M. *Osmotic cerebral oedema: the role of plasma osmolarity and blood brain barrier*. Ann Fr Anesth Reanim.; 22(3):215-9. 2003.
- 255- Vetvicka V, Vetvickova J. *Immune-enhancing effects of Maitake (Grifola frondosa) and Shiitake (Lentinula edodes) extracts*. Ann Transl Med.;2(2):14. 2014.

- 256- Faure AM, Koppenol WH, Nyström L. *Iron(II) binding by cereal beta-glucan*. Carbohydr Polym.; 115:739-43. 2015
- 257- Javadi S, Pandey SS, Mishra A, Pradhan BB, Chatterjee S. *Bacterial cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans sequester iron to protect against iron-induced toxicity*. EMBO Rep.;19(1):172-186. 2018.
- 258- Aarsaether E, Rydningen M, Einar Engstad R, Busund R. *Cardioprotective effect of pretreatment with beta-glucan in coronary artery bypass grafting*. Scand Cardiovasc J.; 40(5):298-304. 2006.
- 259- Chen J, Raymond K. *Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks*. Vasc Health Risk Manag.; 4(6):1265-72. 2008.
- 260- Briones G, Iñón de Iannino N, Roset M, Vigliocco A, Paulo PS, Ugalde RA. *Brucella abortus cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells*. Infect Immun.; 69(7):4528-35. 2001.
- 261- Torello CO, de Souza Queiroz J, Oliveira SC, Queiroz ML. *Immuno-hematopoietic modulation by oral  $\beta$ -1,3-glucan in mice infected with Listeria monocytogenes*. Int Immunopharmacol.; 10(12):1573-9. 2010.
- 262- Zhu W, Gu B, Miao J, Lu J, Zou S. *Dectin1 activation of  $\beta$ -(1-3)/(1-6)-D-glucan produces an anti-mastitis effect in rats*. Inflamm Res.; 60(10):937-45. 2011.
- 263- Liu B, Lin Q, Yang T, Zeng L, Shi L, Chen Y, et al. *Oat  $\beta$ -glucan ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in mice*. Food Funct.; 6(11):3454-63. 2015.
- 264- Chen P, Wang Z, Zeng L, Yang X, Wang S, Dong W, et al. *A novel soluble beta-glucan salean protects against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice*. Biosci Biotechnol Biochem.; 75(10):1990-3. 2011.
- 265- Karaduman D, Eren B, Keles ON. *The protective effect of beta-1,3-D-glucan on taxol-induced hepatotoxicity: a histopathological and stereological study*. Drug Chem Toxicol.; 33(1):8-16. 2010.
- 266- Zhang Y, Xia L, Pang W, Wang T, Chen P, Zhu B, et al. *A novel soluble  $\beta$ -1,3-D-glucan salean reduces adiposity and improves glucose tolerance in high-fat diet-fed mice*. Br J Nutr.; 109(2):254-62. 2013.
- 267- Rosado EL, Monteiro JB, Chaia V, do Lago MF. *Efecto de la leptina en el tratamiento de la obesidad e influencia de la dieta en la secreción y acción de la hormona*. Nutr Hosp.; 21(6): 686-693. 2006.
- 268- Considine RV. *Weight regulation, leptin and growth hormone*. Horm Res.; 48 Suppl 5:116-21. 1997.
- 269- Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS. *Relationship of plasma insulin and adiposity in normal weight and over-weight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss*. J Clin Endocrinol Metab; 81 (12): 4406-13. 1996.

- 270- Ho SC, Tai ES, Eng PHK, Ramli A, Tan CE, Fok ACK. *A study in the relationships between leptin, insulin, and body fat in Asian subjects*. Int J Obes; 23(3): 246-52. 1999.
- 271- Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R. *Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, e metabolic covariates*. J Clin Endocrinol Metab; 81(11): 3909-13. 1996.
- 272- Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. *Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans*. J Clin Endocrinol Metab; 88 (4):1730-1736. 2003.
- 273- Beck EJ, Tosh SM, Batterham MJ, Tapsell LC, Huang XF. *Oat beta-glucan increases postprandial cholecystokinin levels, decreases insulinresponse and extends subjective satiety in overweight subjects*. Mol Nutr Food Res.; 53(10):1343-51. 2009.
- 274- Túrmina JA, Carraro E, Alves da Cunha MA, Dekker RF, Barbosa AM, Dos Santos FS, et al. *Toxicological assessment of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan (lasiodiplodan) in mice during a 28-day feeding study by gavage*. Molecules.;17(12):14298-309. 2012.
- 275- Pardo Andreu, G., P. Hernández Casaña, and R. Delgado Hernández. *La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores*. Revista Cubana de Medicina, 2005. 44: p. 0-0.
- 276- Fullerton, S.A., et al. *Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide)*. Mol Urol, 2000. 4(1): p. 7-13.
- 277- Shomori, K., et al. *Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (Grifola frondosa) on human gastric cancer cell lines*. Oncol Rep, 2009. 22(3): p. 615-20.
- 278- Alexander, B., et al. *Induction of Cell Death in Renal Cell Carcinoma With Combination of D-Fraction and Vitamin C*. Integr Cancer Ther, 2013.
- 279- Soares, R., et al. *Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation*. J Med Food, 2011. 14(6): p. 563-72.
- 280- Aubel-Sadron G. Londos-Gagliardi D. *Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review*. Biochimie. 66(5): p. 333-52. 1984.
- 281- Moura, L.R., Martins AC, Da Rocha Vaz LA, Trevisan Orpinelli SR, Lopes da Silva T, Batista Rodríguez M, et. al. *Extrato hidroalcoólico da casca do pequi (Caryocar brasiliense) em ratos submetidos à aplicação de doxorubicina*. Ciência Rural. 43: p. 100-106. 2013.
- 282- Ahmed AR, Hombal SM. *Cyclophosphamide (Cytoxan). A review on relevant pharmacology and clinical uses*. J Am Acad Dermatol. 11(6): p. 1115-26. 1984.
- 283- Baselga J, Norton L, Masui H, Pandiella A, Coplan K, Miller WH Jr, et al. *Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies*. J Natl Cancer Inst. 85(16): p. 1327-33. 1993.

- 284- Ottewell PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. *Antitumor Effects of Doxorubicin Followed by Zoledronic Acid in a Mouse Model of Breast Cancer*. Journal of the National Cancer Institute. 100(16): p. 1167-1178. 2008.
- 285- Riwanto I, Budijitno S, Dharmana E, Handojo D, Prasetyo SA, Eko A, et al. *Effect of phaleria macrocarpa supplementation on apoptosis and tumor growth of C3H mice with breast cancer under treatment with adriamycin-cyclophosphamide*. Int Surg. 96(2): p. 164-70. 2011.
- 286- Hishida, I, Nanba H, Kuroda H. *Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of Grifola frondosa (maitake)*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 36(5): p. 1819-27. 1988.
- 287- Nanba H, Kubo K. *Effect of Maitake D-Fraction on Cancer Prevention*. Annals of the New York Academy of Sciences. 833(1): p. 204-207. 1997.
- 288- Wu SJ, Lu TM, Lai MN, Ng LT. *Immunomodulatory activities of medicinal mushroom Grifola frondosa extract and its bioactive constituent*. Am J Chin Med.;41(1):131-44. 2013.
- 289- Chan, G.C., W.K. Chan, and D.M. Sze. *The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells*. J Hematol Oncol. 2: p. 25. 2009.
- 290- Motamed K, Sage EH. *SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway*. J Cell Biochem, 70(4): p. 543-52. 1998.
- 291- Azim HA Jr, Singhal S, Ignatiadis M, Desmedt C, Fumagalli D, Veys I, et al. *Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis*. PLoS One, 8(4): p.e62451. 2013.
- 292- Hsiao YH, Lien HC, Hwa HL, Kuo WH, Chang KJ, Hsieh FJ. *SPARC (osteonectin) in breast tumors of different histologic types and its role in the outcome of invasive ductal carcinoma*. Breast J. 16(3): p. 305-8. 2010.
- 293- Witkiewicz AK, Freydin B, Chervoneva I, Potoczek M, Rizzo W, Rui H, et al. *Stromal CD10 and SPARC expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) patients predicts disease recurrence*. Cancer Biol Ther. 10(4): p. 391-6. 2010.
- 294- Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JH, Nonogaki S, Rierger RB, Netto MM, et al. *Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat. 126(1): p. 1-14. 2011.
- 295- Wang C, Gao C, Zhuang JL, Ding C, Wang Y. *A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7*. J Cancer Res Clin Oncol. 138(12): p. 2127-36. 2012.
- 296- Koblinski JE, Kaplan-Singer BR, VanOsdol SJ, Wu M, Engbring JA, Wang S, et al. *Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis*. Cancer Res. 65(16): p. 7370-7. 2005.

- 297- Watkins G, Douglas-Jones A, Bryce R, Mansel RE, Jiang WG. *Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 72(4): p. 267-72. 2005.
- 298- Georgescu MM. *PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control*. Genes Cancer, 1(12): p. 1170-7. 2010.
- 299- Heikkinen T, Greco D, Peltari LM, Tommiska J, Vahteristo P, Heikkilä P, et al. *Variants on the promoter region of PTEN affect breast cancer progression and patient survival*. Breast Cancer Res, 13(6): p. R130. 2011.
- 300- Zhang HY, Liang F, Jia ZL, Song ST, Jiang ZF. *Mutation, methylation and expression in breast cancer patients*. Oncol Lett, 6(1): p. 161-168. 2013.
- 301- Yang C, Li S, Wang M, Chang AK, Liu Y, Zhao F, et al. *PTEN suppresses the oncogenic function of AIB1 through decreasing its protein stability via mechanism involving Fbw7 alpha*. Mol Cancer. 12: p. 21. 2013.
- 302- Butt AJ, Dickson KA, McDougall F, Baxter RC. *Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo*. J Biol Chem. 278(32): p. 29676-85. 2003.
- 303- Ahn BY, Elwi AN, Lee B, Trinh DL, Klimowicz AC, Yau A, et al. *Genetic screen identifies insulin-like growth factor binding protein 5 as a modulator of tamoxifen resistance in breast cancer*. Cancer Res. 70(8): p. 3013-9. 2010.
- 304- Sureshbabu A, Okajima H, Yamanaka D, Tonner E, Shastri S, Maycock J, et al. *IGFBP5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells*. J Cell Sci. 125(Pt 7): p. 1693-705. 2012.
- 305- Becker MA, Hou X, Harrington SC, Weroha SJ, Gonzalez SE, Jacob KA, et al. *IGFBP ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors*. Clin Cancer Res. 18(6): p. 1808-17. 2012.
- 306- Wang H, Arun BK, Wang H, Fuller GN, Zhang W, Middleton LP, et al. *IGFBP2 and IGFBP5 overexpression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas*. Breast J. 14(3): p. 261-7. 2008.
- 307- Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. *ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance*. Cancer Metastasis Rev. 26(1): p. 39-57. 2007.
- 308- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 95(26): p. 15665-70. 1998.
- 309- Jiao X, Zhao L, Ma M, Bai X, He M, Yan Y, et al. *MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Breast Cancer Res Treat. 139(3): p. 717-30. 2013.
- 310- Ma MT, He M, Wang Y, Jiao XY, Zhao L, Bai XF, et al. *MiR-487a resensitizes mitoxantrone (MX)-resistant breast cancer cells (MCF-7/MX) to MX by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Cancer Lett. 339(1): p. 107-15. 2013.

- 311- Haagensohn KK, Tait L, Wang J, Shekhar MP, Polin L, Chen W, et al. *Cullin-3 protein expression levels correlate with breast cancer progression*. *Cancer Biol Ther*. 13(11): p. 1042-6. 2012.
- 312- Kossatz U, Breuhahn K, Wolf B, Hardtke-Wolenski M, Wilkens L, Steinemann D, et al. *The cyclin E regulator cullin 3 prevents mouse hepatic progenitor cells from becoming tumor-initiating cells*. *J Clin Invest*. 120(11): p. 3820-33. 2010.
- 313- Kim B, Nam HJ, Pyo KE, Jang MJ, Kim IS, Kim D, et al. *Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex*. *Biochem Biophys Res Commun*. 415(4): p. 720-6. 2011.
- 314- Zhou H, Lv Q, Guo Z. *Transcriptomic signature predicts the distant relapse in patients with ER+ breast cancer treated with tamoxifen for five years*. *Mol Med Rep*.;17(2):3152-3157. 2018.
- 315- Li HT, Liu HH, Yang YX, Wang T, Zhou XL, Yu Y, et al. *Therapeutic Effects of Traditional Chinese Medicine Formula Plus Tamoxifen vs. Tamoxifen for the Treatment of Mammary Hyperplasia: A Meta-Analysis of Randomized Trials*. *Front Pharmacol*. 9:45. 2018.
- 316- Soares MP, Oliveira FC, Cardoso IL, Urbinati EC, Meldau de Campos C, Hisano H. *Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila**. *Fish Shellfish Immunol*.;73:133-140. 2018
- 317- Esrefoglu M, Tok OE, Aydin MS, Iraz M, Ozer OF, Selek S, et al. *Effects of beta-glucan on protection of young and aged rats from renal ischemia and reperfusion injury*. *Bratisl Lek Listy*;117(9):530-538. 2016.
- 318- Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen FE. *Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats*. *Clin Exp Immunol*.;148(1):168-77. 2007.
- 319- Zhang Y, Sun D, Meng Q, Guo W, Chen Q, Zhang Y. *Grifola frondosa polysaccharides induce breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial-dependent apoptotic pathway*. *Int J Mol Med*.;40(4):1089-1095. 2017.
- 320- Vetchinkina E, Shirokov A, Bucharskaya A, Navolokin N, Prilepskii A, Burov A, et al. *Antitumor Activity of Extracts from Medicinal Basidiomycetes Mushrooms*. *Int J Med Mushrooms*.; 18(11):955-964. 2016.
- 321- Lin CH, Chang CY, Lee KR, Lin HJ, Lin WC, Chen TH, et al. *Cold-water extracts of *Grifola frondosa* and its purified active fraction inhibit hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. *Exp Biol Med (Maywood)*.; 241(13):1374-85. 2016.
- 322- Shehata M, van Amerongen R, Zeeman AL, Giraddi RR, Stingl J. *The influence of tamoxifen on normal mouse mammary gland homeostasis*. *Breast Cancer Res*.; 16(4):411. 2014.
- 323- Gao FF, Lv JW, Wang Y, Fan R, Li Q, Zhang Z, et al. *Tamoxifen induces hepatotoxicity and changes to hepatocyte morphology at the early stage of endocrinotherapy in mice*. *Biomed Rep*.; 4(1):102-106. 2016.

- 324- Ribeiro MP, Santos AE, Custódio JB. *Mitochondria: the gateway for tamoxifen-induced liver injury*. Toxicology.; 323:10-8. 2014.
- 325- Lee MH, Kim JW, Kim JH, Kang KS, Kong G, Lee MO. *Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen*. Toxicol Lett.;199(3):416-24. 2010.
- 326- Wu YS, Ho SY, Nan FH, Chen SN. *Ganoderma lucidum beta 1,3/1,6 glucan as an immunomodulator in inflammation induced by a high-cholesterol diet*. BMC Complement Altern Med.; 16(1):500. 2016.
- 327- Li WJ, Xu C, Wang K, Li TY, Wang XN, Yang H, et al. *Severe Intestinal Inflammation in the Small Intestine of Mice Induced by Controllable Deletion of Claudin-7*. Dig Dis Sci.; 63(5):1200-1209. 2018.
- 328- Nie X, Xie R, Tuo B. *Effects of Estrogen on the Gastrointestinal Tract*. Dig Dis Sci.; 63(3):583-596. 2018.
- 329- Yang TY, Yi W, Wen J, Gan CY, Yang YC, Dai M. *Therapeutic effect of Jin Long capsule combined with neoadjuvant chemotherapy on invasive breast cancer and the expression change of multidrug resistance proteins*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 41(2):118-123. 2019.
- 330- Wasser SP. *Medicinal mushrooms Science: History, current status, future trends and unsolved problems*. Inter J Med Mushrooms.;12(1):1-16. 2010.
- 331- Pérez JE, Isaza G, Bueno JG, Arango MC. *Efecto de los extractos de Phenax rugosus, Tabebuia chrysantha, Althernantera williamsii y Solanum dolichosepalum sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas*. Rev Med Risaralda.;10(2):13-21. 2004
- 332- Kayser O, Masihi KN, Kiderlen AF. *Natural products and synthetic compounds as immunomodulators*. Exp Rev Anti-infective Therap.; 1(2):319-35. 2003.
- 333- Wasser SP, Didukh M, Nevo E. *Antitumor and immunomodulatory activities of medicinal mushroom polysaccharide and polysaccharide-protein complexes in animals and humans (Review)*. Mycol Balcan.; 2:221-50. 2005.
- 334- Hasona NA. *Grape seed extract attenuates dexamethasone-induced testicular and thyroid dysfunction in male albino rats*. Andrologia. 2018. [En prensa].
- 335- Lim JM, Lee YJ, Cho HR, Park DC, Jung GW, Ku SK. *Extracellular polysaccharides purified from Aureobasidium pullulans SM-2001 (Polycan) inhibit dexamethasone-induced muscle atrophy in mice*. Int J Mol Med.; 41(3):1245-1264. 2018.
- 336- Iida A, Ouchi S, Oda T, Aketagawa J, Ito Y, Takizawa Y, et al. *Changes of Absorptive and Secretory Transporting System of (1 → 3) β-D-glucan Based on Efflux Transporter in Indomethacin-induced Rat*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet.; 40(1):29-38. 2015.
- 337- Liu F, Gong R, Lv X, Li H. *The expression profiling and ontology analysis of non-coding RNAs in dexamethasone induced steatosis in hepatoma cell*. Gene; 650:19-26. 2018.

- 338- Niu L, Chen Q, Hua C, Geng Y, Cai L, Tao S, et al. *Effects of chronic dexamethasone administration on hyperglycemia and insulin release in goats*. J Anim Sci Biotechnol.; 9:26. 2018.
- 339- Estrada A, van Kessel A, Laarveld B. *Effect of administration of oat beta-glucan on immune parameters of healthy and immunosuppressed beef steers*. Can J Vet Res.; 63(4):261-8. 1999.
- 340- Kotthoff P, Heine A, Held SAE, Brossart P. *Dexamethasone induced inhibition of Dectin-1 activation of antigen presenting cells is mediated via STAT-3 and NF- $\kappa$ B signaling pathways*. Sci Rep.; 7(1):4522. 2017.
- 341- Masuda Y, Inoue H, Ohta H, Miyake A, Konishi M, Nanba H. *Oral administration of soluble  $\beta$ -glucans extracted from Grifola frondosa induces systemic antitumor immune response and decreases immunosuppression in tumor-bearing mice*. Int J Cancer.; 133(1):108-19. 2013.
- 342- Lin H, De Stanchina E, Zhou XK, She Y, Hoang D, Cheung SW, et al. *Maitake Beta-Glucan Enhances Umbilical Cord Blood Stem Cell Transplantation in the NOD/SCID Mouse*. Exp Biol Med (Maywood).; 234(3):342-53. 2009.
- 343- Kodama N, Murata Y, Asakawa A, Inui A, Hayashi M, Sakai N, et al. *Maitake D-Fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumor-bearing mice*. Nutrition.; 21(5):624-9. 2005.
- 344- Kay J, Czop JK. *Enhancement of human monocyte beta-glucan receptors by glucocorticoids*. Immunology.; 81(1):96-102. 1994.
- 345- Rice PJ, Adams EL, Ozment-Skelton T, Gonzalez AJ, Goldman MP, Lockhart BE, et al. *Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge*. J Pharmacol Exp Ther.; 314(3): 1079-86. 2005.
- 346- Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, et al. *Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models*. J Immunol.; 173(2):797-806. 2004.
- 347- Procedimientos en microbiología clínica. *Análisis farmacocinético-farmacodinámico en microbiología: herramienta para evaluar el tratamiento antimicrobiano*. 2013.
- 348- Miura T, Ohno N, Miura NN, Shimada S, Yadomae T. *Inactivation of a particle beta-glucan by proteins in plasma and serum*. Biol Pharm Bull.; 20(10):1103-7. 1997.
- 349- Vetvicka V, Dvorak B, Vetvickova J, Richter J, Krizan J, Sima P. *Orally administered marine (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D- glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity*. Int J Biol Macromol.;40(4):291-8. 2007.
- 350- Tomita M, Miwa M, Ouchi S, Oda T, Aketagawa J, Goto Y, et al. *Nonlinear intestinal absorption of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan caused by absorptive and secretory transporting system*. Biol Pharm Bull.; 32(7):1295-7. 2009.

- 351- Li B, Allendorf DJ, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, et al. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b- opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol.*; 177(3): 1661-9. 2006.
- 352- Ganda Mall JP, Casado-Bedmar M, Winberg ME, Brummer RJ, Schoultz I, Keita ÅV. *A  $\beta$ -Glucan-Based Dietary Fiber Reduces Mast Cell- Induced Hyperpermeability in Ileum From Patients With Crohn's Disease and Control Subjects.* *Inflamm Bowel Dis.*; 24(1):166-178. 2017.
- 353- Kimura Y, Chihara K, Honjoh C, Takeuchi K, Yamauchi S, Yoshiki H, et al. *Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine secretion via spleen tyrosine kinase (Syk) in rat mast cells.* *J Biol Chem.*; 289(45):31565-75. 2014.
- 354- Pinke KH, Lima HG, Cunha FQ, Lara VS. *Mast cells phagocyte *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1.* *Immunobiology.*; 221(2):220-7. 2016.
- 355- Sohet F, Daneman R. *Genetic mouse models to study blood-brain barrier development and function.* *Fluids Barriers CNS.*; 10(1):3. 2013.
- 356- Shah VB, Huang Y, Keshwara R, Ozment-Skelton T, Williams DL, Keshwara L. *Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner.* *J Immunol.*; 180(5):2777-85. 2008.
- 357- Shah VB, Williams DL, Keshwara L. *Beta-Glucan attenuates TLR2- and TLR4-mediated cytokine production by microglia.* *Neurosci Lett.*;c458(3):111-5. 2009.
- 358- Bao H, Ran P, Zhu M, Sun L, Li B, Hou Y, et al. *The Prefrontal Dectin-1/AMPA Receptor Signaling Pathway Mediates the Robust and Prolonged Antidepressant Effect of Proteo- $\beta$ -Glucan from Maitake.* *Sci Rep.*; 6: 28395. 2016.
- 359- Faro-Trindade I, Willment JA, Kerrigan AM, Redelinguys P, Hadebe S, Reid DM, et al. *Characterisation of innate fungal recognition in the lung.* *PLoS One.* ;7(4): e35675. 2012.
- 360- Suda M, Ohno N, Hashimoto T, Koizumi K, Adachi Y, Yadomae T. *Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan, SSG, in mice.* *FEMS Immunol Med Microbiol.*; 15(2-3):93-100. 1996.
- 361- Nakao A, Tamura H, Tanaka S, Kawagoe T, Takagi H. *(1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan determination in rat organs with limulus coagulation factor G.* *Res Exp Med (Berl).*; 196(6):339-43. 1997.
- 362- Zhang Y, Zheng Z, Yang X, Pan X, Yin L, Huang X, et al. *A sensitive and rapid radiolabelling method for the in vivo pharmacokinetic study of lentinan.* *Food Funct.* 2018.
- 363- Tamma R, Guidolin D, Annese T, Tortorella C, Ruggieri S, Rega S, et al. *Spatial distribution of mast cells and macrophages around tumor glands in human breast ductal carcinoma.* *Exp Cell Res.*;359(1):179-184. 2017.



## **VIII- PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES**



Los resultados de esta Tesis doctoral han sido publicados en revistas científicas, y presentados en diversos congresos según el siguiente detalle.

## I – PUBLICACIONES CIENTIFICAS CON REFERATO.

- **2017. Aguilera Braico DM**, Roldan-Deamicis A, Brie B and Balogh GA. *Comparative effect of Maitake Pro4X with chemotherapy on breast cancer treatment*. BIOL. MED (ALIGARH) Vol 9:3, Feb 2017.
- **2016.** Agustina Roldan-Deamicis, Belén Brie, **Diego Aguilera Braico** and Gabriela Andrea Balogh. *Maitake Pro4X has anti-cancer activity and prevents oncogenesis in BALBc mice*. Cancer Medicine. 2016 Sep; 5(9):2427-41.
- **2014.** Jaure O, Alonso EN, **Aguilera Braico DM**, Nieto A, Orozco M, Morelli C, Ferro AM, Barutta E, Vincent E, Martínez D, Martínez I, Maegli MI, Frizza A, Kowalyzyn R, Salvadori M, Ginestet P, Gonzalez Donna ML, Balogh GA. *BRCA1 polymorphism in breast cancer patients from Argentina*. Oncology Letters. 2015 Feb;9(2):845-850.

## II – LIBROS Y CAPITULOS DE LIBROS.

- **2019. D.M. Aguilera Braico**, and G.A. Balogh. Chapter title: *Molecular mechanism induces by beta glucans from Maitake to recover T cell lymphocytes population from immunosuppression*. Book title: "An Introduction to Mushroom". ISBN 978-1-78985-956-0. 2019.
- **2017. D.M. Aguilera Braico**, and G.A. Balogh. Chapter 22: *Immunotherapeutic and preventive role of purified extract rich in beta-glucans derived from D-Fraction of Grifola frondosa mushroom in experimental-mice biomodel of mammary carcinogenesis*. Book: "Breast Cancer – From Biology to Medicine", book edited by Phuc Van Pham. ISBN 978-953-51-3000-0. Print ISBN 978-953-51-2999-8. Published: April 5, 2017.
- **2012.** D. Obiol, E.N Alonso, O. Jaure, **D. Aguilera Braico**, G. Balogh. *Maitake-Fracción D y sus efectos terapéuticos en cáncer de mama*. Editorial Académica Española EAE, Ed. AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG, Heinrich-Böcking-Str. 68 66121, Saarbrücken, Germany. ISBN: 978-3-659-05372-6. Año-Tomo-Volumen: 2012. Página inicial: 01-Página final: 121. Published: August 2012.

## IV – PRESENTACIONES A CONGRESOS.

- **2018. D.M. Aguilera Braico** y G.A. Balogh. INMUNORESTAURACION DE LA POBLACION LINFOCITARIA T MEDIANTE LA ADMINISTRACION ORAL DEL EXTRACTO GLICOPROTEICO DE GRIFOLA FRONDOSA (MAITAKE PRO4X) RICO EN  $\beta$ -GLUCANOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE INMUNOSUPRESION. (CCT-CONICET). Reunión Anual Becarios Doctorales, Dpto de Biología Bioquímica y Farmacia-UNS-Bahía Blanca, Argentina, Agosto 2018.

- **2017. D.M. Aguilera Braico** and G.A. Balogh. ORAL ADMINISTRATION OF SOLUBLE  $\beta$ -GLUCANS EXTRACTED FROM GRIFOLA FRONDOSA MUSHROOM (MAITAKE D-FRACTION PRO4X) INDUCES IMMUNE T CELLS RECOVERY AND REVERTS IMMUNOSUPPRESSION IN BALBC MICE. Annual Meeting for Research Society. Buenos Aires, Argentina, Noviembre 2017.
- **2016. D.M. Aguilera Braico**, A. Roldan Deamicis, B. Brie and G.A. Balogh. PREVENTIVE AND IMMUNOTHERAPEUTIC ROLE OF PURIFIED EXTRACT RICH IN BETA-GLUCANS DERIVED FROM GRIFOLA FRONDOSA MUSHROOM (D-FRACTION) IN A BIOMODEL OF BREAST CARCINOGENESIS. Congreso: GANANDO LA GUERRA CONTRA EL CANCER (Mincyt-Raíces). Lugar: UBA- CABA. 12 y 13 de mayo de 2016.
- **2015. Diego M. Aguilera Braico**, T.A Santa Coloma y G.A. Balogh. CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DEL EXTRACTO COMERCIAL FRACCIÓN D DE MAITAKE (GRIFOLA FRONDOSA) ADMINISTRADO POR VÍA ORAL EN BIOMODELOS ANIMALES. Congreso: SAIC-SAFIS. Lugar: Mar del Plata. 18 al 21 de noviembre de 2015.
- **2015. Diego M. Aguilera Braico**, V. Torralba Agu, T.A Santa Coloma y G.A. Balogh. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE MAITAKE PRO4X Y TAMOXIFENO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA EN RATONES. Congreso: SAIC-SAFIS. Lugar: Mar del Plata. 18 al 21 de noviembre de 2015.
- **2015. Diego M. Aguilera Braico**, A. Roldan Deamicis, B. Brie, V. Torralba Agu, T.A Santa Coloma y G.A. Balogh. EFECTO TERAPEUTICO EN CÁNCER DE MAMA DE FRACCIÓN D -RICA EN BETA GLUCANOS- DERIVADA DEL HONGO GRIFOLA FRONDOSA. Congreso: *II Jornadas Argentinas sobre Biología y Cultivo de Hongos Comestibles y Medicinales*. Lugar: Ministerio de Agricultura-Tecnópolis- CABA. 25 y 26 de septiembre de 2015.
- **2014. B. Brie, A. Roldan Deamicis, D.M. Aguilera Braico**, T.A Santa Coloma y G.A. Balogh. EL EXTRACTO PRO4X DEL HONGO JAPONES MAITAKE INHIBE LA EXPRESION DE LOS GENES PTEN, SPARC Y ABCG2, CARACTERISTICOS DEL FENOTIPO TUMORAL MAMARIO EN RATONES BALBC. Congreso: SAIC-SAFIS. Lugar: Mar del Plata. 19 al 21 de noviembre de 2014.

## V – DISERTACIONES.

- **2016.** Presentación sobre los efectos terapéuticos de Maitake en *V JORNADA DE ONCOLOGIA INTEGRATIVA – GOIN, UNS. OCTUBRE 2016*.
- **2014.** Presentación del tema: “*Caracterización farmacocinética, farmacodinámica y toxicológica del extracto comercial Fracción D de Maitake (Grifola frondosa) administrado por vía oral e intravenosa en biomodelos animales*”. Lugar: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, BIOMED, UCA-CONICET. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. JULIO 2014.