

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



“Determinación del potencial antitumoral del extracto de polisacáridos solubles en agua de *Pleurotus pulmonarius* en carcinomas con escasas opciones terapéuticas”

Estudiante Luz María Haag

Directora Dra. Eliana Noelia Alonso

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER- INIBIBB-CONICET-UNS

Bahía Blanca

6 de diciembre de 2024

**“Determinación del potencial antitumoral del extracto
de polisacáridos solubles en agua de *Pleurotus pulmonarius*
en carcinomas con escasas opciones terapéuticas”**

Tesis de grado para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas



.....

Luz María Haag

Estudiante



.....

Dra. Eliana Noelia Alonso

Directora

Título abreviado: “Potencial antitumoral de polisacáridos de *Pleurotus pulmonarius* en carcinomas”.

“Evaluation of antitumor potential of water-soluble polysaccharide extract from *Pleurotus pulmonarius* in carcinomas with few therapeutic options”

Bachelor’s thesis in biological sciences

Short title: “Antitumor potential of polysaccharides from *Pleurotus pulmonarius* in carcinomas”.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNS por ser mi casa durante todos estos años, por verme crecer y por ser lugar de aprendizaje, encuentro, momentos, mates, frustraciones, miles de alegrías. A los profesores excelentes que me brindó, en especial a aquellos que me transmitieron la pasión por la Biología y que me hicieron sorprender con las cosas increíbles que tienen la vida y la naturaleza.

Al INIBIBB y en especial al Laboratorio de Biología del Cáncer que me permitió realizar esta tesis. Gracias Alejandro, María Marta, Georgina, Ju, Euge, Valen, Agus, Exe, Karen, Lu y Guille por los momentos vividos y por la ayuda cuando la necesité.

A mi directora de tesis, Dra. Eliana Alonso quien estuvo a cada paso a mi lado, enseñándome y compartiendo todos sus conocimientos. Pero más importante, por haberme escuchado, acompañado y apoyado todo este tiempo y siempre tener las palabras justas, convirtiéndose en una amiga a la que quiero mucho.

A la Dra. María Constanza Díaz Andrade, a quien elegí hace ya varios años como docente consejera y que siempre estuvo ahí para ayudarme, guiarme y darme palabras de aliento.

A mis papás, que me dieron la gran oportunidad de estudiar mi segunda carrera y bancarme todos estos años en Bahía. Fueron soporte, aliento, motivación y mucho más. Deseo que el esfuerzo hecho por ustedes todos estos años lo puedan ver reflejado en mí y en este título. Gracias por todos los valores que me inculcaron y que fueron parte de llegar hasta acá. ¡Los quiero mucho!

A mis hermanos, que siempre fueron mi casa en Bahía y a los que adoro con todo mi corazón. Por todas las risas, charlas y anécdotas juntos. Vivir con ustedes fuera de Suárez fue de las etapas más lindas de mi vida y que siempre la llevaré en mi corazón.

A mi novio, Joaquín, a quien estoy eternamente agradecida por estar en todos los momentos de mi vida de estos últimos años. Gracias por cada abrazo, cada palabra de aliento, cada risa y cada mimo. Sos mi hogar, mi lugar seguro, mi mayor amor. Hiciste el triple de hermosos los grandes momentos y alivianaste los no tan buenos. Siempre confiaste en mí, más que yo misma. ¡Te amo!

A mis familiares que me apoyaron y estuvieron presentes en este camino. A mis tíos, primos, cuñas, padrinas, padrino, ahijados, a mi hermoso sobrino Simón, a la familia de Joa y a los que ya no están acá. A Grey que con su gran compañía alegra todos mis días y es cómplice de todos mis momentos.

A mis amigos de toda la vida que siempre estuvieron para mí, en especial por la complicidad y la compañía pura en los primeros años viviendo lejos de casa. Por cada salida, risa, abrazo, llanto y momentos compartidos. Soy una afortunada de tenerlos a todos y cada uno de ustedes, los quiero.

A los amigos que me dio la universidad a los que quiero muchísimo y agradezco cada mate, cada tarde de estudio, cada laboratorio, cada tentada, cada salida. El camino con ustedes fue mucho más lindo y fácil, gracias por estar a cada paso a mi lado y alentarme en cada momento.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad mundial del siglo XXI. Frente a la necesidad de contar con nuevos compuestos de potente actividad antitumoral, baja toxicidad y capaces de actuar como complemento de la terapia convencional, los compuestos naturales se presentan como una valiosa fuente para el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas antineoplásicas. En las últimas décadas, los polisacáridos fúngicos han recibido una considerable atención dada su actividad biológica antitumoral descubierta, capaz de ser desplegada mediante dos vías potenciales de acción: una vía directa sobre la célula tumoral y otra vía indirecta tras la potenciación del sistema inmune (mediada por su capacidad inmuno-estimuladora).

Pleurotus pulmonarius es una de las especies de hongo mejor adaptada al cultivo intensivo en nuestro país, es reconocida como especie comestible de cultivo por el Código Alimentario Argentino y pertenece al segundo género de hongo más cultivado comercialmente a nivel local. El potencial antitumoral de sus polisacáridos, especialmente solubles en agua, ha sido demostrado en distintos tipos tumorales: en ellos, el efecto antitumoral ha sido desplegado y/o evaluado principalmente solo por una de las dos vías potenciales de acción y en muchos otros no ha sido investigado aún. Entre estos últimos, se ubican dos carcinomas que actualmente cuentan con escasas opciones terapéuticas disponibles: el carcinoma mamario triple negativo (CMTN) y el carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (CCECC).

Bajo este contexto, en el presente trabajo de Tesis nos proponemos determinar mediante ensayos *in vitro* el potencial antitumoral directo de la Fracción I: extracto enriquecido en polisacáridos solubles en agua obtenido a partir de *P. pulmonarius*, en CMTN y CCECC.

Mediante el conjunto de resultados obtenidos, demostramos que, con distinto grado de magnitud, la Fracción I actúa directamente sobre las células MDA-MB-231 (representante de CMTN) y HN13 (representante de CCECC), afectando ciertas capacidades celulares cuya desregulación conduce al desarrollo y progresión del cáncer. Específicamente, demostramos que la Fracción I reduce la viabilidad de dichas células tumorales, ejerciendo un efecto citostático mediante la inducción de arresto celular en fase S. Sumado a ello, demostramos que el extracto disminuye la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 y HN13, reduciendo así su fenotipo metastásico. Finalmente, demostramos también que la Fracción I ejerce un efecto diferencial sobre la viabilidad de células epiteliales mamarias no malignas HC11.

Con la realización del presente trabajo, y la continuidad de la línea de investigación en la cual se enmarca, aspiramos al desarrollo de nuevos agentes antitumorales naturales de baja toxicidad, capaces de actuar como complemento de la terapia convencional, fortaleciendo incluso al sistema inmune y mejorando la calidad de vida de los pacientes. Aspiramos con ello también, a continuar con la cadena de valorización del cultivo de hongos comestibles en nuestro país.

Palabras clave: cáncer, hongos, compuestos naturales, antineoplásico, terapias complementarias.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide in the 21st century. Given the necessity for new compounds with potent antitumor activity, low toxicity and the ability to complement conventional therapy, natural compounds emerge as a valuable source for the discovery and development of new antineoplastic drugs. In recent decades, mushrooms polysaccharides have received considerable attention due to their demonstrated antitumor biological activity, which can be deployed through two potential mechanisms of action: a direct pathway targeting tumor cells and an indirect pathway by enhancing the immune system (mediated by their immunostimulatory capacity).

Pleurotus pulmonarius is one of the best-adapted mushroom species for intensive cultivation in our country. It is recognized as an edible cultivated species by the Argentine Food Code (Código Alimentario Argentino, in Spanish) and belongs to the second most commercially cultivated mushroom genus locally. The antitumor potential of its polysaccharides, particularly water-soluble, has been demonstrated in different tumor types. In these, the antitumor effect has been deployed and/or assessed mainly through only one of the two potential mechanisms, while in many others, it remains unexplored. Among the latter are two carcinomas that currently have limited therapeutic options available: triple-negative breast carcinoma (TNBC) and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

In this context, the present thesis aims to determine, through *in vitro* assays, the direct antitumor potential of I-Fraction: an extract enriched of water-soluble polysaccharide obtained from *P. pulmonarius*, in TNBC and HNSCC.

Based on the set of results obtained, we demonstrated that, with different degrees of magnitude, I-Fraction acts directly on MDA-MB-231 cells (representative of TNBC) and HN13 cells (representative of HNSCC), affecting certain cellular capabilities whose deregulation leads to cancer development and progression. Specifically, we showed that I-Fraction reduces the viability of these tumor cells, exerting a cytostatic effect through the induction of cell cycle arrest in the S phase. Furthermore, we demonstrated that the extract decreases the migratory capacity of MDA-MB-231 and HN13 cells, thus reducing their metastatic phenotype. Finally, we also showed that I-Fraction exerts a differential effect on the viability of non-malignant mammary epithelial cells (HC11).

Through this work, and the continuation of the research line it supports, we aspire to develop new low-toxicity natural antitumor agents that can complement conventional therapy, strengthen the immune system, and improve patients' quality of life. Additionally, we aim to contribute to the value chain of edible mushroom cultivation in our country.

Keywords: cancer, mushrooms, natural compounds, antineoplastic, complementary therapies.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	5
ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN	10
○ Cáncer.....	10
○ Carcinoma mamario.....	11
○ Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello.....	12
○ Compuestos naturales como terapia antitumoral complementaria.....	14
○ <i>Pleurotus pulmonarius</i>	15
○ Polisacáridos de <i>Pleurotus spp.</i> y su potencial terapéutico en cáncer.....	15
○ Polisacáridos solubles en agua de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en CMTN y CCECC.....	17
○ Resultados previos obtenidos en el Laboratorio de Biología del Cáncer.....	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
○ Obtención de la Fracción I de <i>Pleurotus pulmonarius</i>	20
○ Vehículo de la Fracción I de <i>Pleurotus pulmonarius</i>	21
○ Líneas celulares	21
○ Cultivo celular y repique.....	21
○ Ensayos de viabilidad.....	22
A. Ensayo colorimétrico con cristal violeta.....	22
B. Conteo celular manual en cámara de Neubauer.....	23
○ Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	23
○ Ensayo de migración celular.....	24
○ Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	25
○ Efecto de la Fracción I de <i>Pleurotus pulmonarius</i> sobre la viabilidad de células tumorales....	25
• Efecto sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 de CMTN.....	25
• Efecto sobre la viabilidad de células HN13 de CCECC.....	27
○ Efecto de la Fracción I de <i>Pleurotus pulmonarius</i> sobre la progresión del ciclo celular.....	29
• Efecto sobre la progresión del ciclo de células MDA-MB-231 de CMTN.....	30
• Efecto sobre la progresión del ciclo de células HN13 de CCECC.....	31
○ Efecto de la Fracción I de <i>Pleurotus pulmonarius</i> sobre la capacidad migratoria.....	32
• Efecto sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 de CMTN.....	32
• Efecto sobre la capacidad migratoria de células HN13 de CCECC.....	33

○ Efecto de la Fracción I de <i>Pleurotus pulmonarius</i> sobre células no malignas.....	34
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	42

ABREVIATURAS

APM	Alto peso molecular
BPM	Bajo peso molecular
CCECC	Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello
CMTN	Carcinoma mamario triple negativo
CV	Cristal violeta
h	Horas
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
IP	Ioduro de propidio
LBC	Laboratorio de Biología del Cáncer
LBHCyM	Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales
Min	Minutos
ns	No significativo
PBS	Buffer fosfato salino
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RS	Residuo sólido
T ₂	Tiempo de duplicación
vs	<i>Versus</i>

INTRODUCCIÓN

Cáncer

Cáncer es un término genérico utilizado para designar un amplio y complejo grupo de enfermedades que pueden originarse en prácticamente cualquier parte del organismo debido a la interacción de múltiples factores: genéticos, físicos, químicos y ambientales. A grandes rasgos, se puede decir que el cáncer se produce cuando células normales se transforman en células tumorales a través de un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno (*National Cancer Institute- on line; World Health Organization- on line*).

A pesar de la diversidad y complejidad de la enfermedad, se han logrado establecer ciertos principios que gobiernan el proceso de transformación de una célula normal en una maligna. Durante dicho proceso, la célula va adquiriendo capacidades biológicas distintivas y complementarias, conocidas como sellos o *hallmarks* del cáncer (Figura 1), que le permiten establecer un tumor y diseminarse metastásicamente (Hanahan & Weinberg, 2000; 2011). Originalmente, en el año 2000 se describieron seis capacidades adquiridas: activación y mantenimiento de señales proliferativas, evasión de señales supresoras del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y activación de mecanismos de invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000).

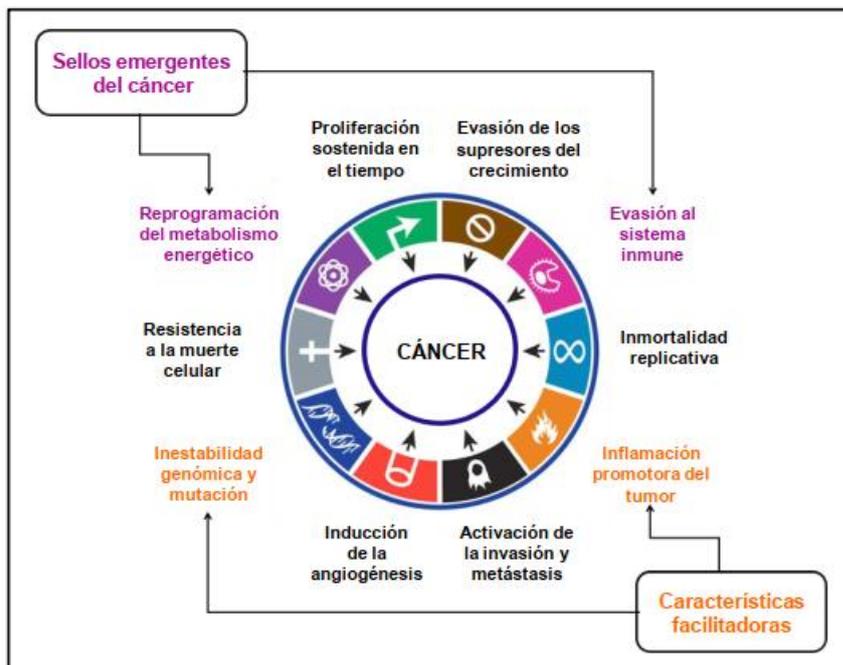


Figura 1. Sellos o *hallmarks* del cáncer. Seis capacidades distintivas adquiridas por las células neoplásicas, dos capacidades emergentes y dos características facilitadoras. Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Posteriormente, en el año 2011, se propusieron dos sellos emergentes del cáncer: reprogramación del metabolismo energético y evasión del ataque y destrucción por parte del sistema inmune. Es de notar que, al día de hoy, éstos se suman a las seis capacidades adquiridas descritas anteriormente; quedando conformados así los ocho sellos o *hallmarks* del cáncer (Hanahan, 2022). Sumado a ello, la inestabilidad genómica y mutación de las células neoplásicas junto a la inflamación se presentan como características facilitadoras para favorecer la adquisición de dichos *hallmarks* (Hanahan & Weinberg, 2011).

Si bien las ocho capacidades mencionadas anteriormente son adquiridas durante el proceso tumorigénico de prácticamente todo tipo de tumor, la diversidad y complejidad de la enfermedad se presenta en relación al mecanismo molecular que promueve la capacidad adquirida y al momento en que ocurre dicha adquisición (Hanahan & Weinberg, 2011). Esto lleva a la necesidad de una revisión y actualización constante de las capacidades adquiridas, emergentes y facilitadoras propuestas (Hanahan, 2022).

Carcinoma mamario

El cáncer de mama es la neoplasia maligna de mayor incidencia y mortalidad en las mujeres, tanto a nivel mundial como en nuestro país. Puntualmente, en la población femenina de Argentina, el cáncer de mama representa el 31,6 % de los cánceres diagnosticados y es responsable del 19,1 % de las muertes por cáncer (Figura 2) (IARC, GLOBOCAN 2022).

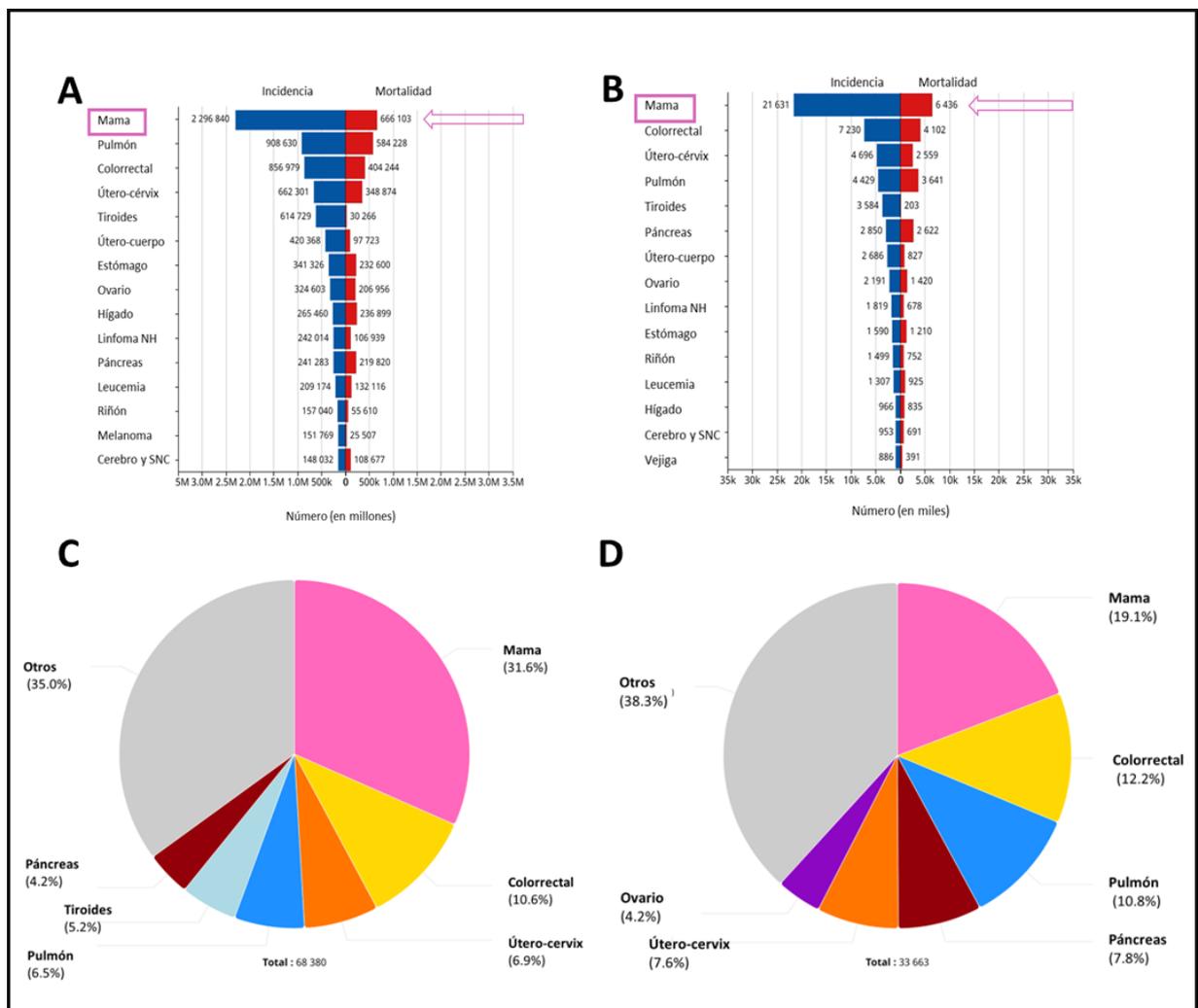


Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial (A) y en Argentina (B). Porcentajes de incidencia (C) y de mortalidad (D) de los distintos tipos de cáncer en mujeres de Argentina. La incidencia es el número de casos nuevos de cáncer en la población mundial (185 países) o Argentina que surgieron en el año 2022. La mortalidad es el número de muertes por cáncer registrados en la misma población y durante el mismo período de tiempo. Proyecto GLOBOCAN 2022. Tomado y adaptado de <https://gco.iarc.fr/en>.

La mayoría de los cánceres mamarios son carcinomas: tipo de cáncer desarrollado a partir de células epiteliales de la unidad ducto-lobulillar de la glándula mamaria (Figura 3). Estos carcinomas mamarios tradicionalmente son clasificados por el sistema TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) y por características histopatológicas y moleculares para establecer el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad (Liefers & Tollenaar, 2002).

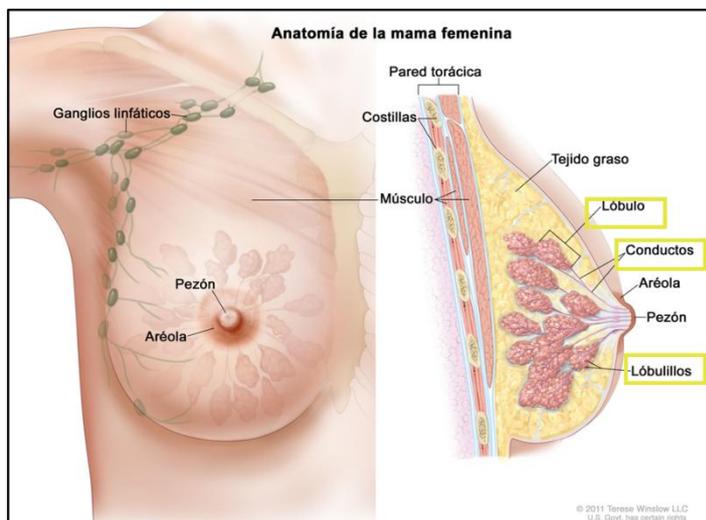


Figura 3. Anatomía de la mama femenina.

Se resaltan los lóbulos, lobulillos y conductos de la glándula. Imagen extraída de NHI, Instituto Nacional del Cáncer, <https://www.cancer.gov/espanol>.

En cuanto a la clasificación molecular, los marcadores comúnmente evaluados son: el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/Neu/ErbB2) (Rakha et al, 2010). Frente a ellos, los carcinomas mamarios se clasifican en: carcinoma mamario hormono dependiente, si expresa RE y RP y sobreexpresa generalmente HER2; carcinoma mamario hormono independiente, si no expresa RE y RP, pero sobreexpresa generalmente HER2; y carcinoma mamario triple-negativo (CMTN), si no expresa RE, RP ni sobreexpresa HER2 (Foulkes et al, 2010; Li et al, 2022).

Entre estos subtipos tumorales, es el CMTN el que se asocia a un peor pronóstico y menor tasa de supervivencia, presentando una mayor tasa de proliferación, de recurrencia local y de desarrollo de metástasis (Amos et al, 2012; Yadav et al, 2015). Además de estas características agresivas, el CMTN carece de una terapia dirigida, siendo tratado únicamente con radioterapia y quimioterapia citotóxica estándar (Jamdade et al, 2015; NouNou et al, 2015). Recientemente la inmunoterapia ha logrado incursionar en este subtipo tumoral (Li et al, 2022).

Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello

El carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello (CCECC) se desarrolla a partir de células epiteliales de la cavidad oral y nasal, de los senos paranasales, la faringe y la laringe (Figura 4). Son las neoplasias malignas más comunes que surgen a nivel de la cabeza y el cuello, específicamente en el tracto respiratorio y digestivo superior (Liebertz et al, 2010).

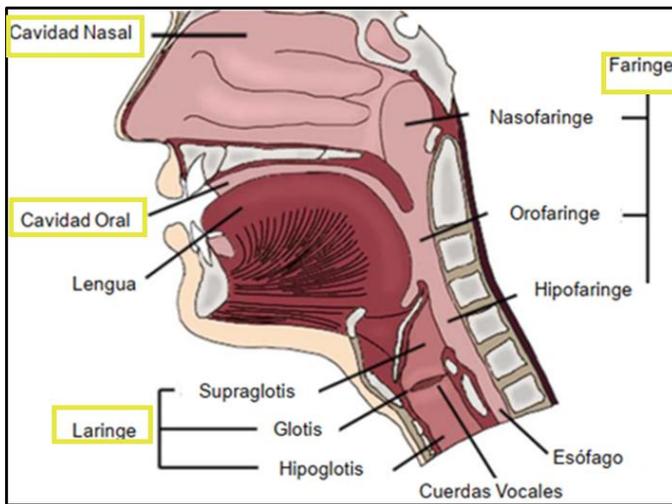


Figura 4. Anatomía del tracto aerodigestivo superior. Se resaltan las diferentes locaciones del CCECC. Tomado y adaptado de Liebertz et al, 2010.

El CCECC es el sexto tipo de cáncer más común (junto con el cáncer de estómago) en la población mundial. Puntualmente en nuestro país, presenta una incidencia de 5,26 x 100.000 habitantes y una mortalidad de 2,63 x 100.000 habitantes (Figura 5) (IARC, GLOBOCAN 2022).

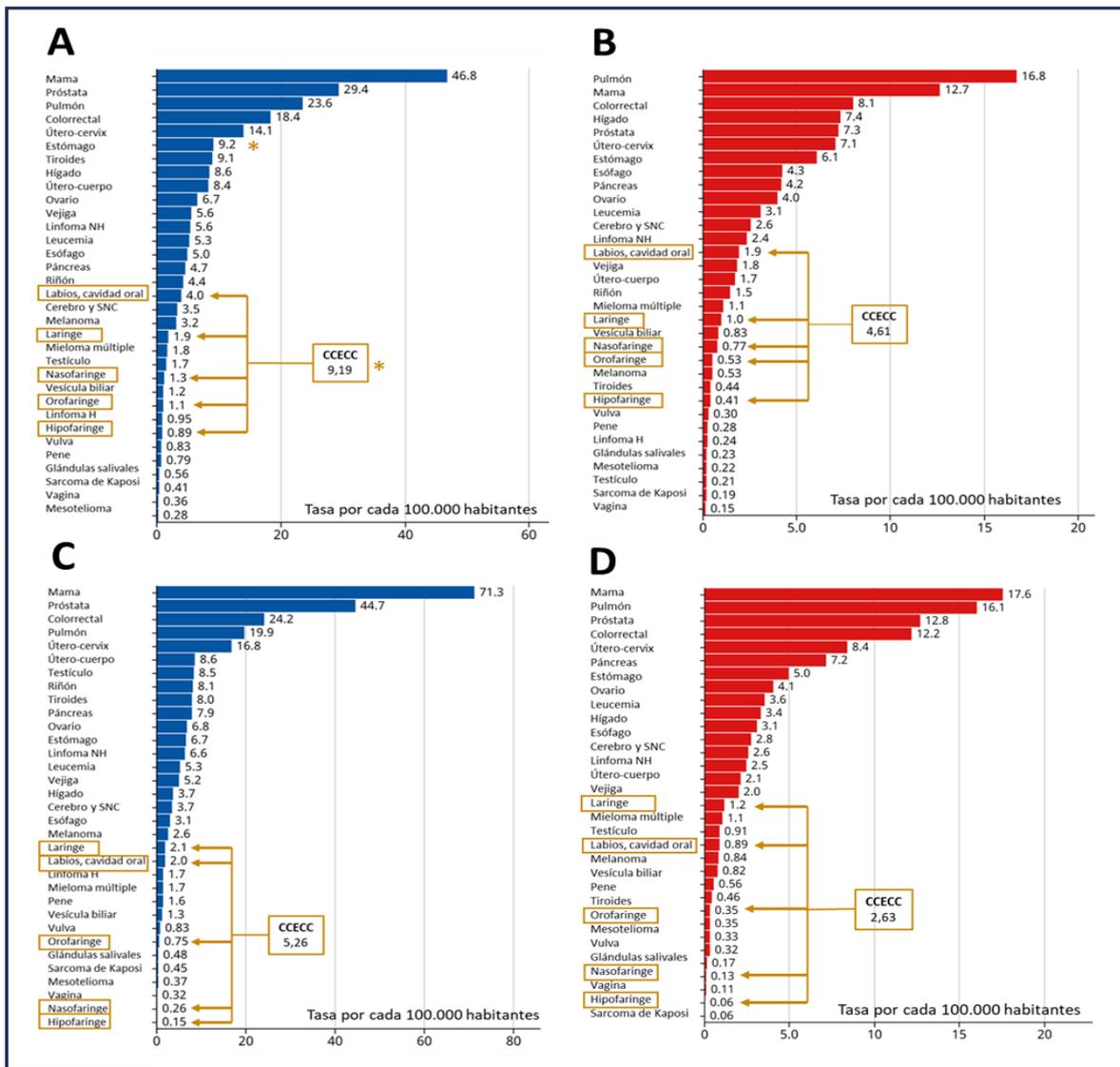


Figura 5. Tasa de incidencia (A) y mortalidad (B) de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial, estandarizada

por edad por cada 100.000 habitantes en ambos sexos. En (C) y (D) se muestran respectivamente las mismas tasas para la población argentina. Las tasas correspondientes al CCECC resultan de la sumatoria de las tasas reportadas para los distintos tipos de cáncer que se engloban en él: laringe, labios y cavidad oral, naso/oro/hipo-faringe. El asterisco indica la posición del CCECC en el listado de los cánceres más comunes a nivel mundial. Proyecto GLOBOCAN 2022. Tomado y adaptado de <https://gco.iarc.fr/en>.

Las principales modalidades de tratamiento del CCECC son la cirugía seguida de quimioterapia más radioterapia (quimiorradiación) o quimiorradiación primaria; modalidades asociadas a toxicidades sistémicas muy elevadas (Liebertz et al, 2010; Martin et al, 2014; Johnson et al, 2020). Recientemente se ha comenzado a aplicar también la inmunoterapia (en combinación con la radioterapia) para el tratamiento de determinados tipos de CCECC (Johnson et al, 2020). Sin embargo, a pesar de estos tratamientos, las altas tasas de recurrencia en el sitio primario y el frecuente desarrollo de metástasis en los ganglios linfáticos locoregionales, son responsables del pronóstico desfavorable asociado al CCECC (Liebertz et al, 2010). Más de la mitad de los pacientes diagnosticados con enfermedad no localizada sobreviven menos de cinco años (Doçi et al, 2015). Sumado a ello la mayoría de los casos son detectados en etapas avanzadas y prácticamente no ha habido avances en el tratamiento de este estadio en los últimos 30 años (Martín et al, 2014).

De esta manera, teniendo presente el contexto del CMTN y del CCECC surge la necesidad de contar con nuevos compuestos terapéuticos que presenten potente actividad antitumoral, baja toxicidad y sean incluso capaces de actuar como complemento de la terapia convencional, disminuyendo las reacciones adversas, fortaleciendo el sistema inmune de los pacientes y mejorando su calidad de vida.

Compuestos naturales como terapia antitumoral complementaria

Los compuestos naturales han tenido y tienen un importante rol en el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas antineoplásicas (Newman et al, 2012). En este aspecto, diversas especies de hongos se presentan como pequeñas “fábricas farmacéuticas” productoras de diversos metabolitos bioactivos con potencial terapéutico (Patel et al, 2012).

Los metabolitos fúngicos se clasifican en función a su peso molecular en metabolitos de bajo peso molecular (BPM) tales como quinonas, isoflavonas, terpenoides, aminas, esteroides y selenio; y metabolitos de alto peso molecular (APM) tales como polisacáridos (principalmente β -glucanos) libres o unidos a proteínas, glicopéptidos, glicoproteínas y proteínas, entre otros (Ferreira et al, 2010). Particularmente, los polisacáridos fúngicos han recibido una considerable atención dada su actividad biológica antitumoral descubierta, capaz de ser desplegada mediante dos vías de acción: indirecta y directa. Mediante la primera de ellas, la actividad antitumoral se lleva a cabo tras la potenciación/estimulación de distintos efectores inmunes (Zaidman et al, 2005; Petrova et al, 2008; Ferreira et al, 2010; Chatterjee et al, 2011). Mediante la vía directa, ciertos polisacáridos tienen la capacidad de actuar sobre la célula tumoral afectando distintas capacidades celulares que frecuentemente se encuentran desreguladas en ella y promueven el desarrollo/progresión del tumor (Lavi et al, 2006;

Zhang et al, 2007; Xu et al, 2017). Un ejemplo puntual, es la Fracción D, un extracto estandarizado de polisacáridos solubles en agua unidos a proteínas, obtenido del hongo *Grifola frondosa* (Maitake), cuyo efecto antitumoral directo fue reportado en distintos subtipos tumorales de cáncer de mama (Soares et al, 2011; Alonso et al, 2013; 2017; 2018). De esta manera, los polisacáridos fúngicos se presentan como agentes antitumorales con dos vías potenciales de acción: una vía directa y otra indirecta tras la potenciación de distintos efectores inmunes.

Pleurotus pulmonarius

Reconociendo la necesidad e importancia de que la especie natural considerada como fuente de compuestos bioactivos presente una utilización sustentable (a nivel local), se advierte el desarrollo alcanzado por nuestro país en “la producción de hongos por la ciencia”. En Argentina, a partir de la década de 1980, distintos institutos de investigación abordaron el tema de la producción de hongos desde un enfoque científico-tecnológico, generando nuevas propuestas productivas que permitieron adaptar al cultivo intensivo a diversas especies silvestres de hongos comestibles (Albertó et al, 2010), tales como: especies de *Pleurotus* (Darjania et al, 1997; Curvetto et al, 2002a), *Lentinula* (Curvetto et al, 2002b; 2005), *Ganoderma* (Albertó et al, 2010) y *Hericium* (Figlas et al, 2007).

En este contexto, *P. pulmonarius* basidiomiceto del orden Agaricales conocido como hongo ostra pulmón (Figura 6), es actualmente una de las especies más versátiles de cultivar en nuestro país, utilizando incluso distintos desechos agroindustriales lignocelulósicos como sustrato de cultivo (Darja-



Figura 6. *Pleurotus pulmonarius*, también conocido como hongo ostra pulmón, creciendo en su ambiente natural de bosques templados, sobre árboles, tocones, troncos en descomposición y plantas leñosas. Foto extraída de <https://mexico.inaturalist.org/>.

nia et al, 1997; Curvetto et al, 2002a). Sumado a ello, *P. pulmonarius* se encuentra reconocido como hongo comestible de cultivo por el Código Alimentario Argentino (CAA: Cap. XVI, Art. 1249), siendo el segundo género más cultivado en nuestro país (Albertó et al, 2010).

Polisacáridos de *Pleurotus spp.* y su potencial terapéutico en cáncer

Los polisacáridos, libres o unidos a proteínas, obtenidos a partir de distintas especies de *Pleurotus* han demostrado ejercer actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer, y como se mencionó anteriormente evidencian también un accionar antitumoral directo e indirecto/mediado por el sistema inmune. Tales investigaciones han comenzado a realizarse recientemente en *P. pulmonarius* mientras que, por ejemplo, sobre *P. ostreatus* existe una mayor cantidad de reportes; los cuales serán tenidos en cuenta como marco de referencia introductorio y para la posterior discusión de resultados. Los trabajos citados a continuación dan cuenta de ello.

Específicamente, los polisacáridos solubles en agua obtenidos a partir de *P. ostreatus* demostraron ejercer actividad antitumoral *in vivo* sobre modelos murinos de sarcoma (células S-180) (Yoshioka et al, 1972; 1975; 1985), carcinoma de Ehrlich (Facchini et al, 2014), linfoma de Dalton (Devi et al, 2015) y melanoma (células B16) (Shamtsyan et al, 2004), aumentando la tasa de inhibición tumoral (Yoshioka et al, 1972; 1975; 1985; Facchini et al, 2014) y/o aumentando la sobrevivencia de los ratones (Shamtsyan et al, 2004; Devi et al, 2015). En tales trabajos el efecto antitumoral fue adjudicado a la capacidad inmuno-estimuladora de los metabolitos. Mediante este accionar indirecto, los polisacáridos solubles en agua aumentaron la actividad de macrófagos (Devi et al, 2013) contra células de melanoma B16 y potenciaron la citotoxicidad de NK contra células de linfoma (YAC-1) (Sarangi et al, 2006; Devi et al, 2015), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de pulmón (A549), pero no así contra células de hepatoma (HepG2) (El-Deeb et al, 2019). En cuanto a la actividad antitumoral directa, estos polisacáridos demostraron disminuir la viabilidad de las células tumorales HeLa (adenocarcinoma de cérvix) (Tong et al 2009; Chen et al, 2015), MCF-7 (cáncer de mama) (Chen et al, 2015), células de carcinoma de Ehrlich (Uddin et al, 2019), RL95 (cáncer de endometrio), HT-15, HCT-116, SW-480 (Silva et al, 2012) y HT29 (cáncer de colon). Específicamente sobre estas últimas, se evidenció la inducción de apoptosis y un aumento de la expresión de Bax y citocromo-c (Lavi et al, 2006). Los polisacáridos solubles en agua de *P. ostreatus* disminuyeron también la viabilidad, migración y formación de colonias de células tumorales BGC-823 (cáncer gástrico) (Cao et al, 2015), disminuyeron la viabilidad de las células de sarcoma S-180 (Sarangi et al, 2006), pero no presentaron efecto directo sobre las células de linfoma de Dalton (Devi et al, 2015). Particularmente, polisacáridos álcali-solubles no ejercieron efecto sobre las células S-180 (Devi et al, 2013).

A diferencia de lo antes expuesto, pocas son las investigaciones que se han centrado en la evaluación de los polisacáridos insolubles en agua obtenidos a partir de *P. ostreatus*; demostrando ellos disminuir el número de lesiones precancerosas en un modelo murino de inducción química con dimetilhidrasina (Bobek et al, 2001) y aumentar la tasa de inhibición tumoral en un modelo murino de sarcoma (Facchini et al, 2014; Wisbeck et al 2017).

Como mencionamos previamente, pocos son los reportes que describen y caracterizan la actividad antitumoral de los polisacáridos obtenidos a partir de *P. pulmonarius*. Específicamente, los polisacáridos solubles en agua obtenidos a partir de él demostraron *in vivo* inhibir la carcinogénesis colorrectal asociada a colitis en un modelo murino AOM/DSS (Lavi et al 2012) y sobre modelos de

xenotrasplante con células de cáncer de hígado (Huh7) demostraron suprimir/disminuir el crecimiento tumoral (Xu et al 2012), actuar como quimioprolifáctico y desplegar una actividad sinérgica con el cisplatino (Xu et al 2014). En estos trabajos, el efecto antitumoral de los polisacáridos fue vinculado a la capacidad de los metabolitos de alterar la expresión de ciertas proteínas en el intestino grueso de los ratones (Lavi et al 2012) o en los tumores desarrollados bajo tratamiento (Xu et al 2012 y 2014). En cuanto a la actividad antitumoral directa, estos polisacáridos demostraron disminuir *in vitro* la viabilidad de distintas líneas celulares de cáncer de colon (HT-29, HCT-116, Caco2, LS174T, HM-7, RSB) y su adhesión a fibronectina (Lavi et al 2010); registrándose un efecto dependiente de la línea celular. Más aún, particularmente sobre las células HT-29 y HCT-116 los polisacáridos demostraron inducir apoptosis modulando la expresión de Bcl-2, Bax y citocromo c (Lavi et al 2012). Sobre celulares de cáncer de hígado (Huh7, Hep3B, HepG2 and SMMC-7721) tales metabolitos desplegaron un efecto antiproliferativo y disminuyeron el potencial invasivo; reportándose aquí la inactivación de la vía de PI3K/ATK (Xu et al 2012).

A la fecha, y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, no hay reportes que evalúen la actividad antitumoral de polisacáridos insolubles en agua de *P. pulmonarius*.

Como la bibliografía lo demuestra, son los polisacáridos solubles en agua obtenidos a partir de *Pleurotus spp.* los que mayor evidencia presentan en cuanto a su potencial antitumoral. Se evidencia también, que tal potencial ha sido demostrado en distintos tipos tumorales: sobre algunos de ellos, ambos accionares han sido evaluados y demostrados; en otros, el efecto antitumoral ha sido desplegado y/o evaluado solo por una de las dos vías potenciales de acción. Sumado a ello, se advierte un amplio campo sin explorar aún, encontrándose en el mismo dos carcinomas que actualmente cuentan con escasas opciones terapéuticas disponibles: el CMTN y CCECC.

Polisacáridos solubles en agua de *Pleurotus pulmonarius* en CMTN y CCECC

Como se evidenció en la sección anterior, el potencial antitumoral de los polisacáridos solubles en agua obtenidos de *P. pulmonarius* no ha sido evaluado aún en CMTN. En el caso de tales metabolitos obtenidos de *P. ostreatus* se advierte que su potencial antitumoral ha sido evaluado recientemente en carcinoma mamario, específica y únicamente sobre el subtipo tumoral hormono dependiente. Puntualmente, en el año 2015 Chen et al reportaron por primera vez el efecto de estos metabolitos sobre células tumorales MCF-7, demostrando un accionar directo y una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración de tratamiento. Posteriormente, en el año 2019 El-Deeb et al reportaron su estudio centrado en la actividad inmuno-estimulante (accionar indirecto) de un extracto crudo de polisacáridos solubles en agua y tres fracciones parcialmente purificadas de él. En dicho trabajo se observó que tanto el extracto crudo como las fracciones potencian la actividad citotóxica de las células NK contra las tumorales MCF-7.

De esta manera, se advierte que resta mucho por dilucidar en relación al potencial de los polisacáridos solubles en agua de *Pleurotus spp* en cáncer de mama y que incluso el potencial de tales metabolitos obtenidos a partir de *P. pulmonarius* no ha sido evaluado aún en CMTN: el subtipo tumoral mamario más agresivo y con menos opciones terapéuticas. En situación semejante se encuentran las investigaciones vinculantes en CCECC. Sobre este tipo tumoral, el potencial antitumoral de los polisacáridos solubles en agua de *P. pulmonarius* no ha sido investigado aún.

Resultados previos obtenidos en el Laboratorio de Biología del Cáncer

Gracias al trabajo interdisciplinario entre el Laboratorio de Biología del Cáncer (LBC - INIBIBB - CONICET - UNS) y el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles y Medicinales (LBHCyM - CERZOS - CONICET - UNS), se ha logrado obtener un extracto enriquecido en polisacáridos solubles en agua, denominado Fracción I, partiendo del cuerpo fructífero de *P. pulmonarius*. El protocolo de extracción empleado se encuentra estandarizado y es factible de ser trasladable a gran escala. Actualmente, en el LBC se investiga, entre otros aspectos, la caracterización fisicoquímica de dicha Fracción.

Resultados previos obtenidos en el LBC, demuestran que la Fracción I de *P. pulmonarius* presenta actividad antitumoral directa sobre células de CMTN 4T1 (murinas). Específicamente, se observó que la Fracción I disminuye la viabilidad de las células 4T1 de manera dosis-tiempo dependiente, ejerciendo tal efecto a partir de 2,5 mg/mL a 24 h y de 1 mg/mL a 48 h. En relación a esto, se demostró que es el accionar citotóxico del extracto (inducción de muerte celular) el responsable, al menos en parte, de tal disminución. Sumado a ello, se observó que la Fracción I reduce la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales 4T1 en comparación con el vehículo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis de trabajo** que se desea contrastar es que el extracto enriquecido en polisacáridos solubles en agua (Fracción I) obtenido del cuerpo fructífero de *P. pulmonarius* presenta actividad antitumoral en CMTN y CCECC. Proponemos a su vez, que dicha actividad antitumoral del extracto resulta de un accionar directo sobre las células tumorales y de un accionar indirecto mediado por su capacidad inmuno-estimuladora. En el marco de esta Tesis, comenzaremos contrastando la participación del accionar directo de la Fracción I en su actividad antitumoral sobre CMTN y CCECC.

El **objetivo general** de este trabajo de Tesis es determinar mediante ensayos *in vitro* el potencial antitumoral directo del extracto de polisacáridos solubles en agua (Fracción I) obtenido del hongo *P. pulmonarius* en CMTN y CCECC; dos carcinomas que disponen de escasas opciones terapéuticas. En función a ello, nos proponemos los siguientes **objetivos específicos**:

- evaluar el efecto de la Fracción I de *P. pulmonarius* sobre la viabilidad de células tumorales de CMTN y CCECC,
- determinar el accionar citostático y/o citotóxico de la Fracción I sobre las células tumorales,
- evaluar el efecto de la Fracción I sobre la capacidad migratoria de las células tumorales,
- determinar el accionar diferencial de la Fracción I sobre células no malignas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius*

El cultivo de *P. pulmonarius* y la obtención de la Fracción I fue realizado en colaboración con el LBHCyM trabajando bajo condiciones estandarizadas y aplicando el protocolo de extracción y fraccionamiento propuesto por Mizuno (1999) con ciertas modificaciones. Como se esquematiza en la Figura 7, se partió de basidiomas secos de *P. pulmonarius* cultivados en cáscara de girasol y alperujo de olivo. Los mismos fueron molidos utilizando una procesadora de cocina (Figura 7, A) y un molinillo de café, hasta obtener partículas capaces de pasar a través de un tamiz de 0,5 mm (Figura 7, B). La molienda obtenida fue rehidratada con cuatro partes de agua destilada en base a su peso seco (Figura 7, C). La molienda obtenida fue rehidratada con cuatro partes de agua destilada en base a su peso seco (Figura 7, C).

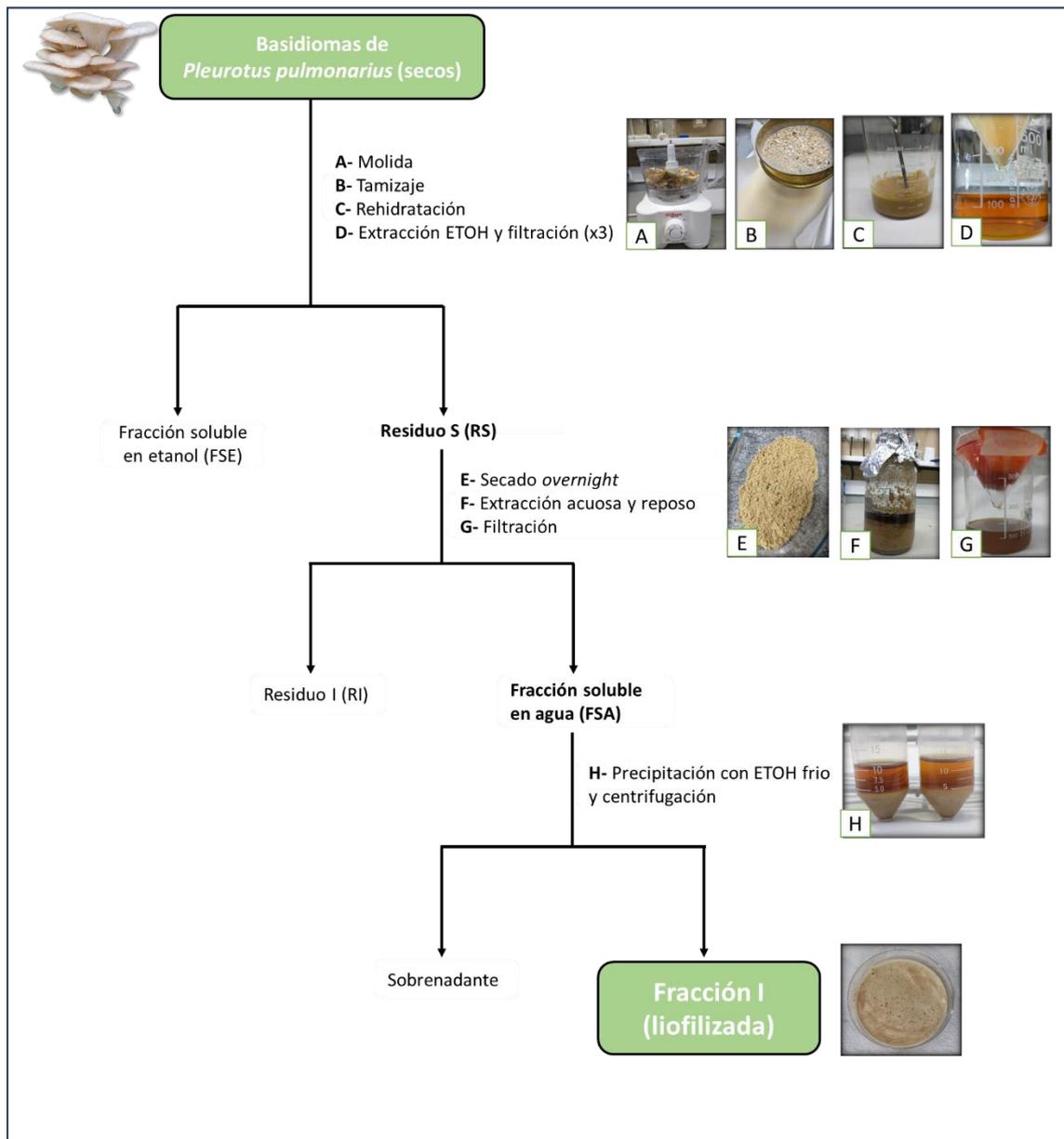


Figura 7. Obtención de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius*. Esquematización del protocolo de extracción y fraccionamiento empleado, mostrando los principales pasos del mismo junto a fotos representativas de ellos (A-H).

Posteriormente, se realizaron tres extracciones etanólicas (empleando en cada una de ellas dos volúmenes de alcohol etílico 96 % v/v por volumen de material hidratado) seguidas de filtraciones sucesivas (Figura 7, D). Como resultante de ello se obtuvo: una Fracción Soluble en Etanol (FSE), contenedora de metabolitos fúngicos de BPM (no estudiados en este trabajo) y un Residuo Sólido (RS) el cual fue secado a temperatura ambiente durante toda la noche (Figura 7, E).

Al día siguiente, el RS seco se sometió a una extracción acuosa con dos volúmenes de agua por volumen de material hidratado, en autoclave, a 121°C, durante 2 horas (h). El material resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante toda la noche (Figura 7, F) y posteriormente fue filtrado (Figura 7, G) para separar la Fracción Soluble en Agua (FSA), contenedora de los polisacáridos de nuestro interés, del Residuo I (RI).

Los polisacáridos solubles en agua fueron precipitados adicionando etanol frío en una relación 4:1 v/v y manteniendo la suspensión durante toda la noche a -20°C. Finalmente, mediante centrifugación (Figura 7, H) y recuperación de los precipitados, se obtuvo la Fracción I: extracto enriquecido en polisacáridos solubles en agua. La Fracción I así obtenida fue liofilizada para su correcto almacenamiento.

Vehículo de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius*

La Fracción I liofilizada se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS 1X) estéril; convirtiéndose este en el vehículo del extracto y condición control de los ensayos. Se partió de una concentración stock de Fracción I de 50 mg/mL, la cual fue autoclavada y almacenada a -20°C en tubos Eppendorf de 1,5 mL, cerrados con Parafilm®. Al momento de utilizarla en los ensayos correspondientes, fue descongelada mediante agitación y llevada a la concentración final deseada mediante al agregado del medio de cultivo correspondiente.

Líneas celulares

Se emplearon las siguientes líneas celulares tumorales:

- MDA-MB-231(humana), como representante de CMTN. Línea celular derivada de un tumor ductal humano triple negativo, cedida por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.
- HN13 (humana), como representante de CCECC. Línea celular cedida por el Dr. Silvio Gutkind de la Universidad de California en San Diego, EE. UU.

Se empleó también la línea celular no maligna:

- HC11 (murina), derivada del epitelio glandular mamario normal de un ratón hembra BALB/c que se encontraba en la mitad del período gestacional (Williams et al, 2009).

Cultivo celular y repique

Las células tumorales MDA-MB-231 y HN13 fueron cultivadas en medio DMEM-F12 y DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Engle's Medium*, Sigma) respectivamente. Las células no malignas HC11 fueron cultivadas en medio RPMI (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma). En todos los casos, el medio fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco), 1 % de penicilina (Gibco, 100 U/mL) y estreptomina (Gibco, 100 µg/mL). Sumado a ello, particularmente el medio correspondiente a las células HC11 fue suplementado con insulina (5 µg/mL, Gibco). Las células se mantuvieron en incubador a 37°C y en atmósfera húmeda de 5 % de CO₂.

El repique celular se llevó a cabo en fase exponencial de crecimiento. Para esto, se retiró el medio de cultivo de la placa, se realizó un lavado con PBS 1X y se agregaron 500 µL de tripsina, cuya función es liberar a las células de su adhesión a la placa de cultivo. El efecto de la tripsina fue frenado con 2 mL de medio de cultivo correspondiente a la línea celular con la que se estaba trabajando. Luego, se homogeneizó con micropipeta la suspensión celular y se cargaron 10 µL de ella por duplicado en cámara de Neubauer. Bajo microscopio se determinó el número de células presentes por mL de suspensión; dato fundamental para poder continuar el cultivo y/o dar comienzo a un ensayo con precisión.

Ensayos de viabilidad

Para evaluar el efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de las células tumorales y no malignas se realizaron ensayos tiempo- dosis- respuesta. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos, en las cuales las células fueron sembradas en una densidad de 1.000 a 9.000 por pocillo en 100 µL del medio completo correspondiente. La densidad fue determinada dependiendo de la línea celular utilizada y el tiempo de tratamiento a evaluar. Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Fracción I (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 5 mg/mL) o su vehículo (PBS 1X; control) durante distintos tiempos (24 y 48 h). Es importante mencionar que tales concentraciones y tiempos empleados surgieron a partir de bibliografía pertinente y de resultados previos obtenidos en el LBC tras emplear a la Fracción I sobre células de CMTN 4T1 (descriptos en la sección: Introducción).

Finalizado el tiempo de tratamiento, la viabilidad celular fue determinada mediante:

A. Ensayo colorimétrico con cristal violeta

Para este ensayo, se descartó el medio de cultivo de la placa de tratamiento por inversión y se fijaron las células con 100 µL/pocillo de metanol al 100 % durante 10 minutos (min). Pasado este tiempo, se removió el contenido de la placa y se realizaron tres lavados con agua destilada. Luego, se agregaron 100 µL de cristal violeta (CV) 0,1 % (p/v, en metanol al 20 %) por pocillo y se dejó actuar durante 30 min. Nuevamente, se realizaron tres lavados con agua destilada para remover en este caso el exceso de colorante y se dejó secando durante toda la noche.

Al día siguiente, se agregó a cada pocillo 100 µL de ácido acético al 10 % para remover el CV incorporado por las células. Finalmente se midió la absorbancia a $\lambda = 560$ nm en un lector de placas. Los

ensayos se realizaron como mínimo dos veces de manera independiente, desarrollando en ellos cada condición por cuadruplicado.

B. Conteo celular manual en cámara de Neubauer

Para este ensayo, se removió el medio de cultivo de cada pocillo tratado y se realizó un lavado con 100 μ L de PBS 1X. Se agregaron 50 μ L de tripsina por pocillo para lograr el desprendimiento de las células y luego se inactivó la misma adicionando 50 μ L de medio de cultivo completo a cada pocillo. De la suspensión de cada pocillo, se tomaron 10 μ L para el cargado de la cámara de Neubauer. Finalmente, se cuantificó el número de células presentes bajo microscopio. Los ensayos se realizaron como mínimo dos veces de manera independiente, desarrollando en ellos cada condición por cuadruplicado.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para este ensayo se utilizaron placas de cultivo de 35 mm en las cuales se sembraron las células con una densidad de 55.000 a 200.000 células por placa, dependiendo de la línea celular utilizada. Luego de 24 h de crecimiento, las células fueron tratadas con 2 mg/mL o 5 mg/mL de Fracción I o vehículo según la línea celular empleada y durante 48 h. Finalizado el tiempo de tratamiento, se recuperaron los medios de cada placa en tubos Falcon individuales, se realizó el lavado de cada una de ellas con 1 mL de PBS 1X y se agregaron 150 μ L de tripsina en cada una. Con el medio de cultivo recuperado anteriormente se inactivó la tripsina y la suspensión celular fue colectada en el tubo Falcon correspondiente. Luego se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min. Se lavó el pellet generado con 1 mL de PBS 1X y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Los nuevos pellets fueron resuspendidos en 1,5 mL de PBS 1X y sobre ello se incorporó gota a gota 3,5 mL de etanol 100 % (v/v) frío para la fijación. Las células fueron almacenadas a -20°C durante 24 h como mínimo y por un período no mayor a 15 días.

El día del análisis, se centrifugaron las suspensiones celulares a 2.000 rpm durante 5 min, se lavó el pellet resultante con 1,5 mL de PBS 1X y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El nuevo pellet generado se resuspendió en 0,5 mL de PBS 1X con 50 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio (IP) y 100 $\mu\text{g/mL}$ de ARNasa A. La suspensión se incubó por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. El IP empleado se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del ADN y produce un aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. El empleo de ARNasa se debe a que el IP también puede unirse al ARN, y por lo tanto es necesario degradar al mismo para una óptima resolución del ADN.

Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se llevaron al servicio de citometría del INBIOSUR-CONICET-UNS. Allí fueron analizadas en un citómetro de flujo *FACSCalibur* usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de 585 nm de emisión. Se empleó el programa *ModFit LT*

cell cycle analysis para determinar, en base a la cantidad de ADN presente, el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (sub G₀/G₁, G₁, S y G₂/M). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo de migración celular

Para evaluar el efecto de la Fracción I sobre la capacidad migratoria de las células tumorales se realizó el ensayo de “la herida”, también conocido como “*wound healing*”, ensayo que imita la migración celular durante la cicatrización *in vivo*.

Para llevar a cabo el mismo, se emplearon placas de cultivo de 35 mm de diámetro. Con la ayuda de un elemento punzante, se realizó una cuadrícula sobre la superficie inferior externa de cada placa a utilizar. Posteriormente, se sembraron las células tumorales con una densidad de 400.000 a 500.000 células por placa y se cultivaron hasta que formaron una monocapa. Sobre la misma, se realizó una herida empleando un *tip* de 10 µL a modo de lápiz y un cubreobjeto a modo de regla. Por último, se removió el medio de cultivo, se lavó suavemente con 2 mL de PBS 1X y se añadió medio nuevo con 2 mg/mL de Fracción I o vehículo.

La herida sobre la monocapa de células fue observada con un microscopio invertido *Nikon Eclipse TE 2000S* y fotografiada con una cámara digital *Sony Coolpix* acoplada al microscopio. Se tomaron fotos a tiempo 0 de tratamiento utilizando a la cuadrícula realizada en la placa como guía para ubicar la posición de cada foto. Posteriormente, sobre las mismas posiciones, se tomaron nuevas fotos de la herida a las 20 h y 24 h de tratamiento (HN13 y MDA-MB-231, respectivamente). Es importante notar que estos tiempos resultan menores al tiempo de duplicación (T₂) celular de cada línea (T₂ de HN13 ≈ 24 h y T₂ de MDA-MB-231 ≈ 29 h).

Se utilizó el software *Image J* para medir el área de la herida sobre las fotos de cada condición y a cada tiempo evaluado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad y progresión del ciclo celular fueron analizados mediante ANOVA (análisis de la varianza) de dos vías con posterior test de Bonferroni para la comparación de los grupos. Los datos obtenidos en los ensayos de migración celular fueron analizados mediante test de *Student*. Se utilizó el software *GraphPad Prism* versión 8.0 (San Diego California USA) y los valores $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Para que una célula normal se transforme en maligna, logre establecer un tumor y diseminarse metastásicamente debe adquirir una serie de capacidades biológicas distintivas y complementarias conocidas como sellos o *hallmarks* del cáncer: activación y mantenimiento de señales proliferativas, evasión de señales supresoras del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, activación de mecanismos de invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2000; 2011; Hanahan, 2022). Estos ocho sellos, además de proporcionar un marco para comprender la diversidad de la biología tumoral, constituyen una guía al momento de evaluar el potencial antitumoral de un nuevo compuesto.

Efecto de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius* sobre la viabilidad de células tumorales

Teniendo presente que uno de los *hallmarks* del cáncer es la proliferación celular descontrolada y sostenida en el tiempo sin señales celulares que la disparen, comenzamos realizando ensayos de viabilidad celular para evaluar el efecto de la Fracción I sobre esta capacidad adquirida.

Entre los distintos tipos de ensayos que se pueden utilizar para determinar el número de células que permanecen viables luego de un tratamiento específico, decidimos emplear en primera línea al ensayo colorimétrico con CV debido a su rapidez, reproducibilidad, precisión y bajo costo (Kamiloglu et al, 2020). Como ensayo de segunda línea y para validar de manera independiente los resultados obtenidos con CV, seleccionamos al conteo manual en cámara de Neubauer: ensayo que requiere mayor manipulación y tiempo (Alonso et al, 2018).

Efecto sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 de CMTN

Mediante el ensayo colorimétrico con CV, se observó que la Fracción I no afecta la viabilidad de las células de CMTN MDA-MB-231 a ninguna de las concentraciones ensayadas bajo tratamiento de 24 h (Figura 8, A). Sin embargo, al prolongar el tiempo de tratamiento a 48 h la Fracción I disminuyó la viabilidad de estas células tumorales a partir de la concentración de 2 mg/mL (Figura 8, B). Específicamente, bajo el tratamiento de 48 h, las concentraciones de 2 mg/mL y 2,5 mg/mL de Fracción I disminuyeron la viabilidad celular en un 23,57 % y 28,31 % respectivamente en comparación con el control ($p < 0,01$). La máxima concentración ensayada de 5 mg/mL produjo un efecto mayor, disminuyendo la viabilidad en un 57,55 % en comparación con el control ($p < 0,001$). En la Figura 8 C se muestran fotos de pocillos tratados con las concentraciones efectivas, sobre los cuales se puede apreciar la disminución del número de células a medida que aumenta la concentración de la Fracción I, en comparación con el vehículo.

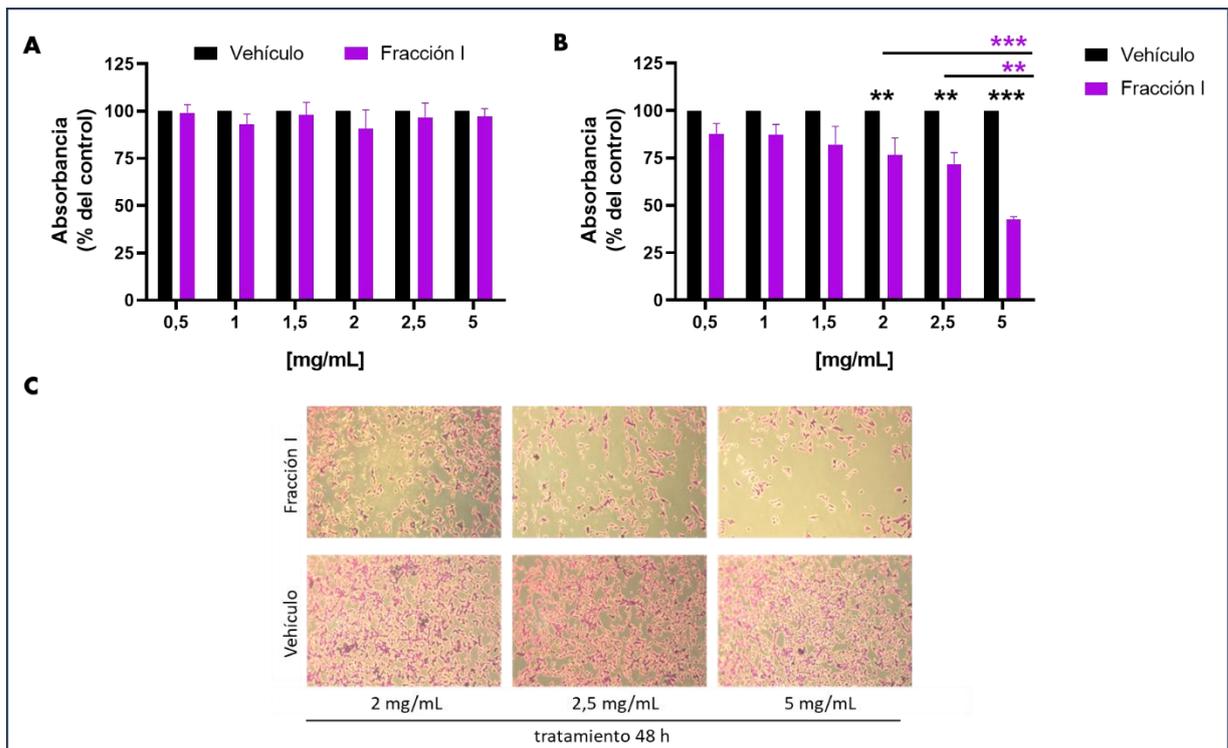


Figura 8. Efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 determinado mediante ensayo colorimétrico con CV. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de Fracción I (barras violetas) o vehículo (control: PBS 1X, barras negras) durante **(A)** 24 h y **(B)** 48 h de tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. Asteriscos negros: significancia respecto al control; asteriscos violetas: significancia entre distintas concentraciones de Fracción I. En **(C)** se muestran fotografías representativas tomadas al microscopio (40x) de pocillos tratados con las concentraciones efectivas.

Al comparar el accionar de la Fracción I en los distintos tiempos de tratamiento, se evidenció un efecto tiempo dependiente del extracto sobre la viabilidad celular ya que concentraciones que no lograron reducir la viabilidad a las 24 h, resultaron efectivas a las 48 h de tratamiento: 2; 2,5 y 5 mg/mL. Sumado a ello, al comparar la magnitud del efecto producido por las dosis efectivas a 48 h se detectó un accionar dosis dependiente del extracto sobre la viabilidad de las células tumorales MDA-MB-231. Como lo indican los asteriscos violetas en la Figura 8 B, la disminución de la viabilidad lograda por la concentración de 5 mg/mL fue significativamente mayor que la lograda por 2,5 mg/mL (diferencia entre medias: 29,24; $p < 0,01$) y por 2 mg/mL (diferencia entre medias: 33,98; $p < 0,001$).

Posteriormente, mediante el conteo manual en cámara de Neubauer se validaron los resultados obtenidos a través del ensayo colorimétrico con CV sobre las células MDA-MB-231. Como se observa en la Figura 9 A, por conteo manual también se detectó que, bajo un tratamiento de 24 h, ninguna de las concentraciones ensayadas de Fracción I afecta la viabilidad de las células MDA-MB-231. Nuevamente la reducción de la viabilidad se evidenció a las 48 h de tratamiento, tiempo en el cual la Fracción I disminuyó la viabilidad de las células tumorales a partir de una concentración mínima efectiva de 2,5 mg/mL (Figura 9, B).

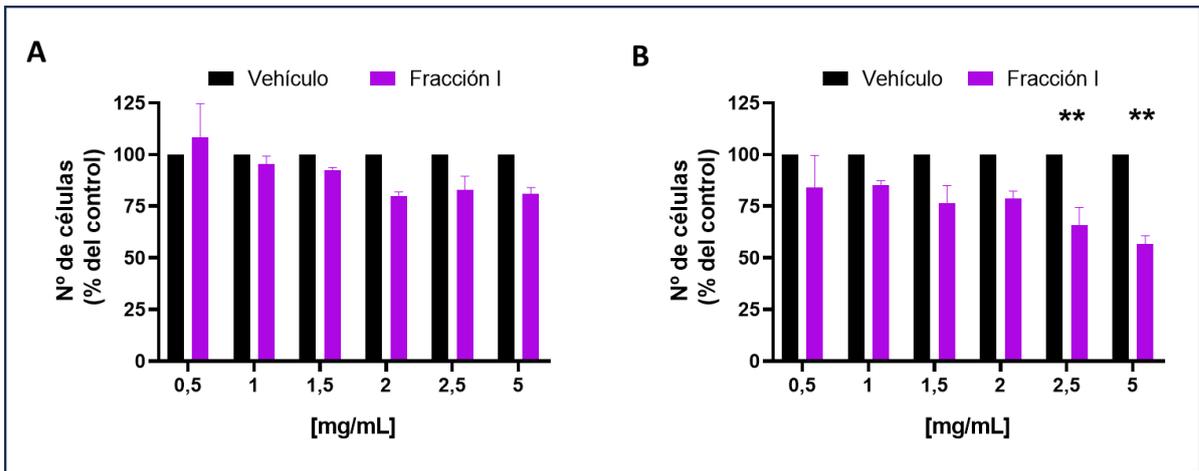


Figura 9. Efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de células MDA-MB-231 determinado mediante conteo manual en cámara de Neubauer. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de Fracción I (barras violetas) o vehículo (control: PBS 1X, barras negras) durante (A) 24 h y (B) 48 h de tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$.

Efecto sobre la viabilidad de células HN13 de CCECC

Para comenzar a evaluar el potencial antitumoral de la Fracción I en CCECC, realizamos ensayos de viabilidad celular sobre la línea HN13 mediante los dos métodos independientes utilizados anteriormente.

Como se observa en la Figura 10 A, mediante el ensayo colorimétrico con CV, se observó que la Fracción I no afecta la viabilidad de las células de CCECC HN13 a ninguna de las concentraciones

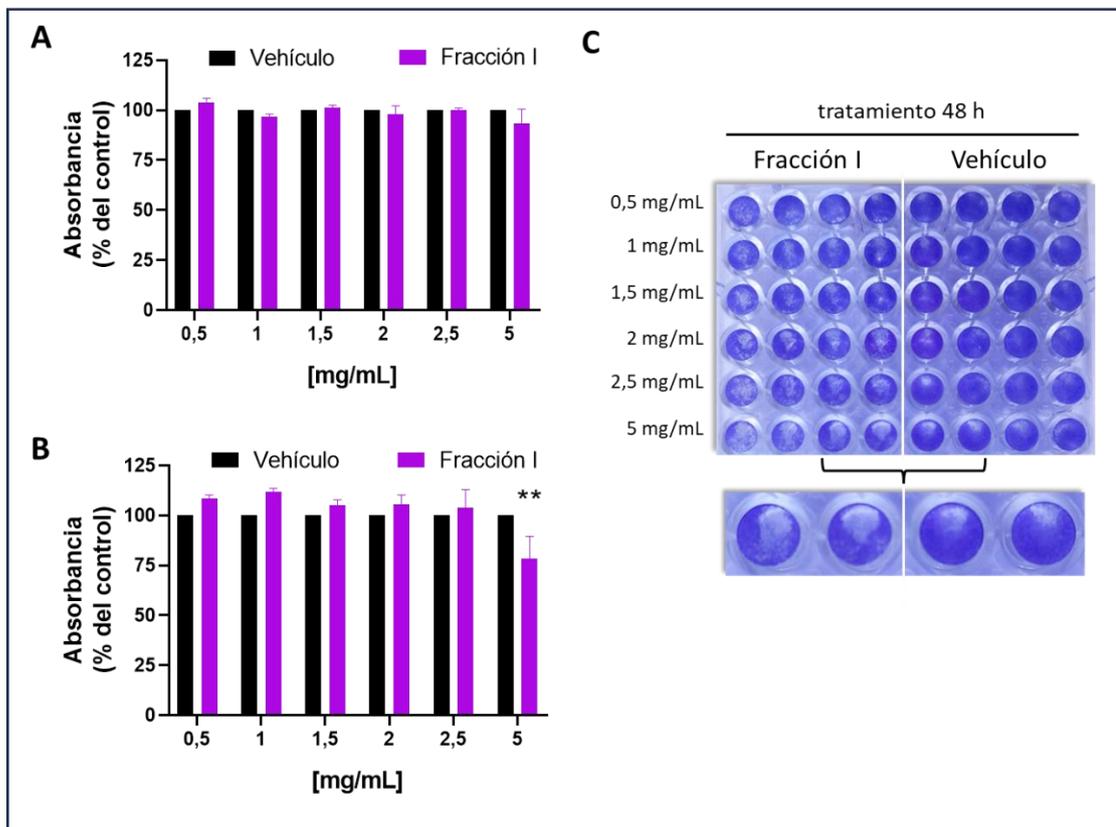


Figura 10. Efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de células HN13 determinado mediante ensayo colorimétrico con CV. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de Fracción I (barras violetas) o vehículo (control: PBS 1X, barras negras) durante (A) 24 h y (B) 48 h de tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$. En (C) se muestra una placa *multiwell* representativa de los ensayos realizados para 48 h de tratamiento mostrando con mayor aumento pocillos tratados con la única concentración efectiva.

ensayadas bajo un tratamiento de 24 h. Al prolongar el tiempo de tratamiento a 48 h, sólo la máxima concentración evaluada de Fracción I: 5 mg/mL, logró disminuir la viabilidad de estas células tumorales en un 78,5 % en comparación con el vehículo ($p < 0,01$) (Figura 10, B). Como se observa en la Figura 10 C, el efecto de la Fracción I en la concentración de 5 mg/mL se ve reflejado en la menor cantidad de células teñidas en sus pocillos vs el vehículo. Estos resultados indican un efecto tiempo- dosis-dependiente de la Fracción I sobre la viabilidad de las células HN13.

Posteriormente, mediante conteo manual en cámara de Neubauer, se detectó un efecto más temprano y a una menor dosis efectiva de la Fracción I sobre la viabilidad de las células HN13, en comparación con lo observado por el método colorimétrico con CV. Específicamente, mediante conteo se detectó que, la máxima concentración ensayada (5 mg/mL) ya logró disminuir la viabilidad celular a las 24 h de tratamiento (Figura 11, A) y que, a las 48 h la Fracción I disminuyó la viabilidad a partir de

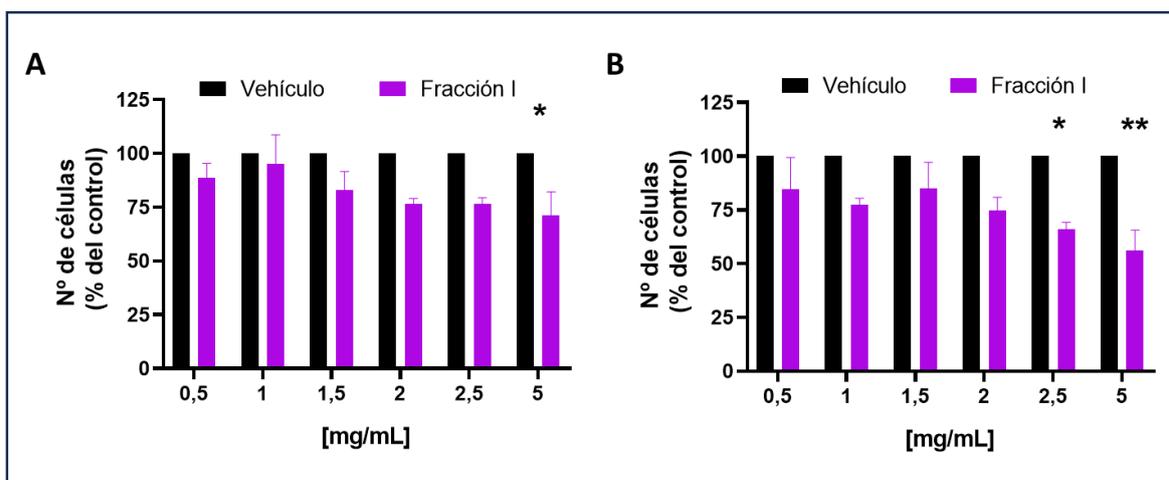


Figura 11. Efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de células HN13 determinado mediante conteo manual con cámara de Neubauer. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de Fracción I (barras violetas) o vehículo (control: PBS 1X, barras negras) durante (A) 24 h y (B) 48 h de tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2,5 mg/mL (Figura 11, B). De esta manera, el conteo manual aportó nuevas significancias al efecto desplegado por la Fracción I en la viabilidad de las células HN13 y validó el resultado obtenido previamente mediante CV.

Los resultados hasta aquí obtenidos a nivel de la viabilidad de las células HN13 sugieren una menor sensibilidad de éstas frente al tratamiento con la Fracción I, en comparación a las células de CMTN. Es por ello que, particularmente sobre las HN13, decidimos prolongar el tiempo de tratamiento

a 72 h. Mediante el ensayo colorimétrico con CV se observó que nuevamente sólo la máxima concentración ensayada de Fracción I (5 mg/mL) disminuyó la viabilidad de las células HN13, en esta ocasión en un 59,52 % en comparación con el vehículo ($p < 0,001$) (Figura 12 A y B). Al comparar el efecto producido por la concentración efectiva de 5 mg/mL a las 48 h vs 72 h (Figura 12, C), se pone nuevamente en evidencia el efecto tiempo dependiente de la Fracción I, ya que la disminución de la viabilidad alcanzada a las 72 h de tratamiento es significativamente mayor que la alcanzada a 48 h (diferencia entre medias = 38,02; $p < 0,01$).

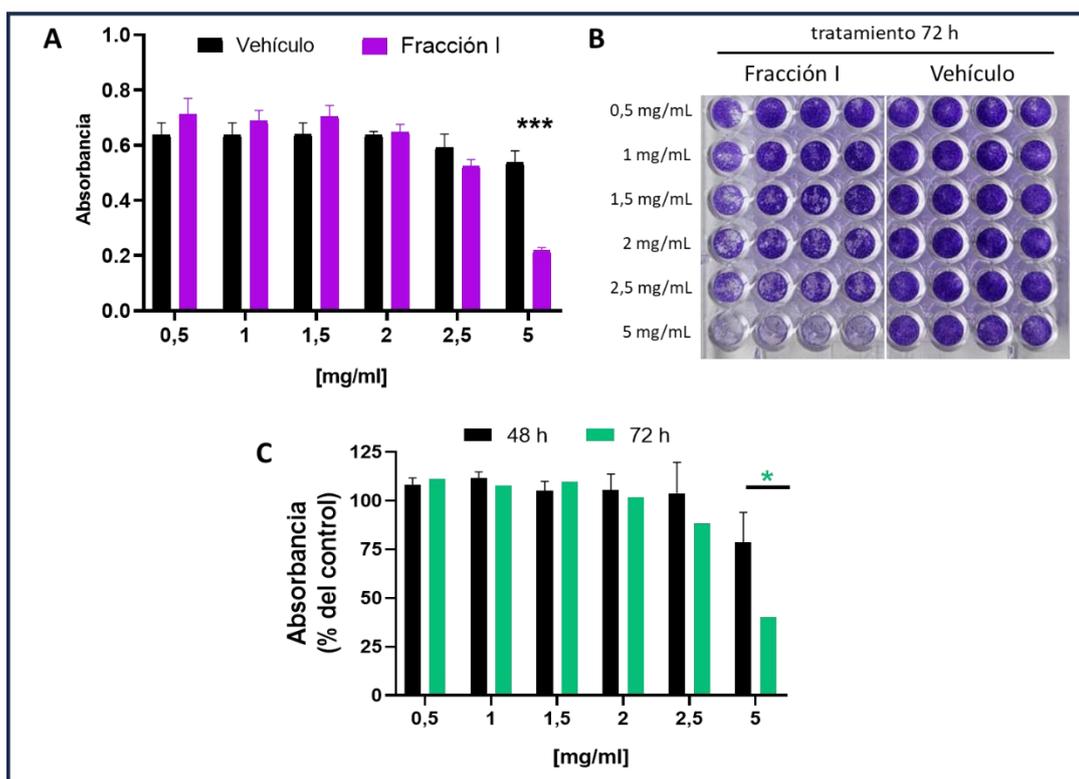


Figura 12. Efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de células HN13 bajo 72 h de tratamiento determinado mediante CV. (A) Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de Fracción I (barras violetas) o vehículo (control: PBS 1X, barras negras) durante 72 h. Las barras representan la media \pm SD del ensayo realizado. **(B)** Foto de la placa *multiwell* del ensayo realizado a 72 h de tratamiento. **(C)** Comparación del efecto producido por la Fracción I entre el tratamiento de 48 h (barras negras) vs 72 h (barras verdes). * $p < 0,05$, **** $p < 0,001$.

De esta manera, y tras la prolongación del tiempo de tratamiento a 72 h, queda en evidencia la mayor resistencia de las células tumorales HN13 de CCECC a reducir su viabilidad frente a la Fracción I, en comparación con las células tumorales de CMTN.

Efecto de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius* sobre la progresión del ciclo celular

Las células tumorales logran proliferar descontroladamente tras adquirir autonomía proliferativa, insensibilidad a las señales de freno de su ciclo celular y resistencia a la muerte (tres de los ocho *hallmarks* del cáncer presentados al comienzo de esta sección) (Hanahan & Weinberg, 2000; 2011; Hanahan, 2022). Es por ello que, interrumpir la progresión del ciclo celular (Benada & Macurek,

2015) y/o inducir una respuesta apoptótica (Indap & Rao, 1995) en la célula tumoral diana son estrategias efectivas para limitar el crecimiento tumoral.

En este contexto, y teniendo presente que los resultados anteriormente obtenidos demuestran que la Fracción I de *P. pulmonarius* disminuye la viabilidad de las células tumorales de CMTN MDA-MB-231 y CCECC HN13, decidimos evaluar si tal efecto era producto de un arresto del ciclo celular y/o de una inducción de muerte. Para ello, comenzamos estudiando por citometría de flujo la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo celular utilizando la tinción con IP.

Efecto sobre la progresión del ciclo de células MDA-MB-231 de CMTN

Como se observa en la Figura 13, el tratamiento de las células MDA-MB-231 con 2,5 mg/mL de Fracción I durante 48 h disminuyó el número de células en fase G₀/G₁ (Fracción I = 36,51 % vs

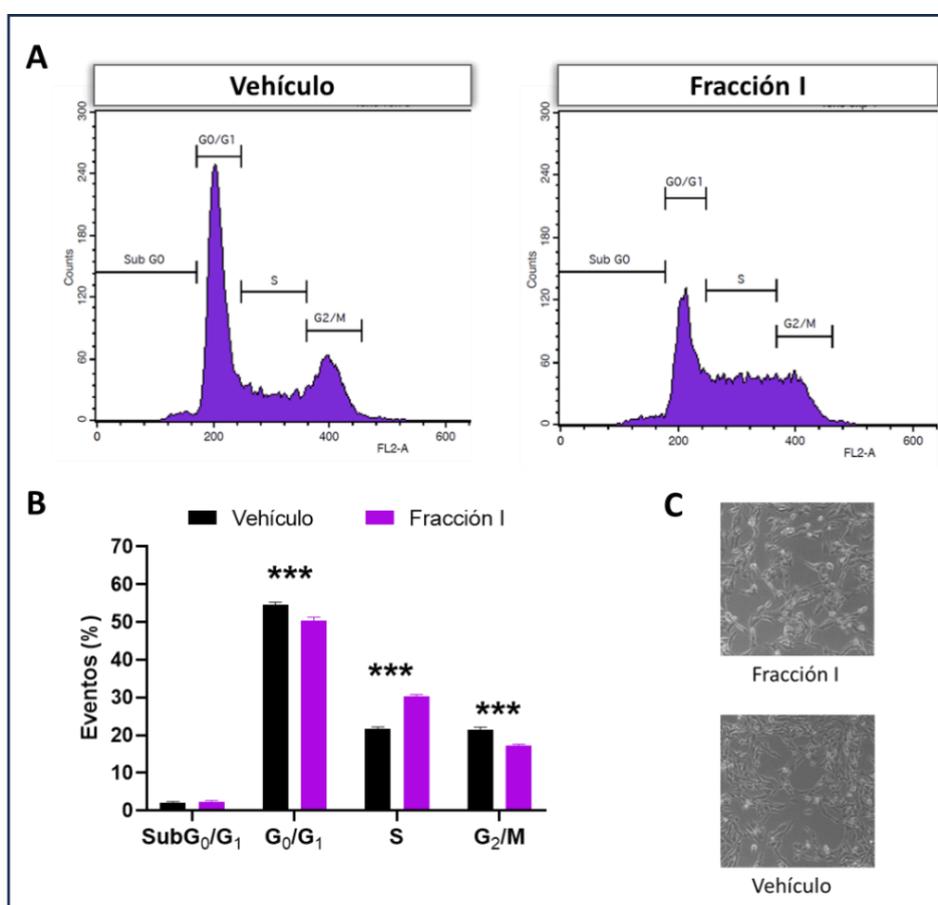


Figura 13. Efecto de la Fracción I sobre la progresión del ciclo celular en la línea MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con Fracción I (2,5 mg/mL) o vehículo por 48 h. En (A) se muestra la distribución de la población celular analizada por citometría de flujo luego de la tinción con IP. El gráfico (B) representa el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Las barras representan la media \pm SD del ensayo realizado por triplicado. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (C) Fotografías tomadas al microscopio (100x) de las células MDA-MB-231 al finalizar el tratamiento correspondiente.

vehículo = 55,09 %; $p < 0,001$) y en fase G₂/M (Fracción I = 19,99 % vs vehículo = 22,21 %; $p < 0,05$). Sumado a ello, el tratamiento con la Fracción I aumentó el número de células en fase S (Fracción I = 40,32 % vs vehículo = 19,96 %; $p < 0,001$) sin provocar cambios en la fase sub G₀/G₁ (Fracción I = 3,33 % vs vehículo = 2,15 %; no significativo- ns).

Efecto sobre la progresión del ciclo de células HN13 de CCECC

Sobre las células HN13 (Figura 14), el tratamiento con la Fracción I (5 mg/mL) durante 48 h disminuyó el número de células en fase G₀/G₁ (Fracción I = 30,48 % vs vehículo = 59,49 %; $p < 0,001$) y aumentó la población celular en fase S (Fracción I = 50,36 % vs vehículo = 24,68 %; $p < 0,001$). El tratamiento con el extracto no provocó cambios en la fase sub G₀/G₁ (Fracción I = 4,32 % vs vehículo = 1,21 %; ns) ni en la fase G₂/M (Fracción I = 14,83 % vs vehículo = 14,62 %; ns).

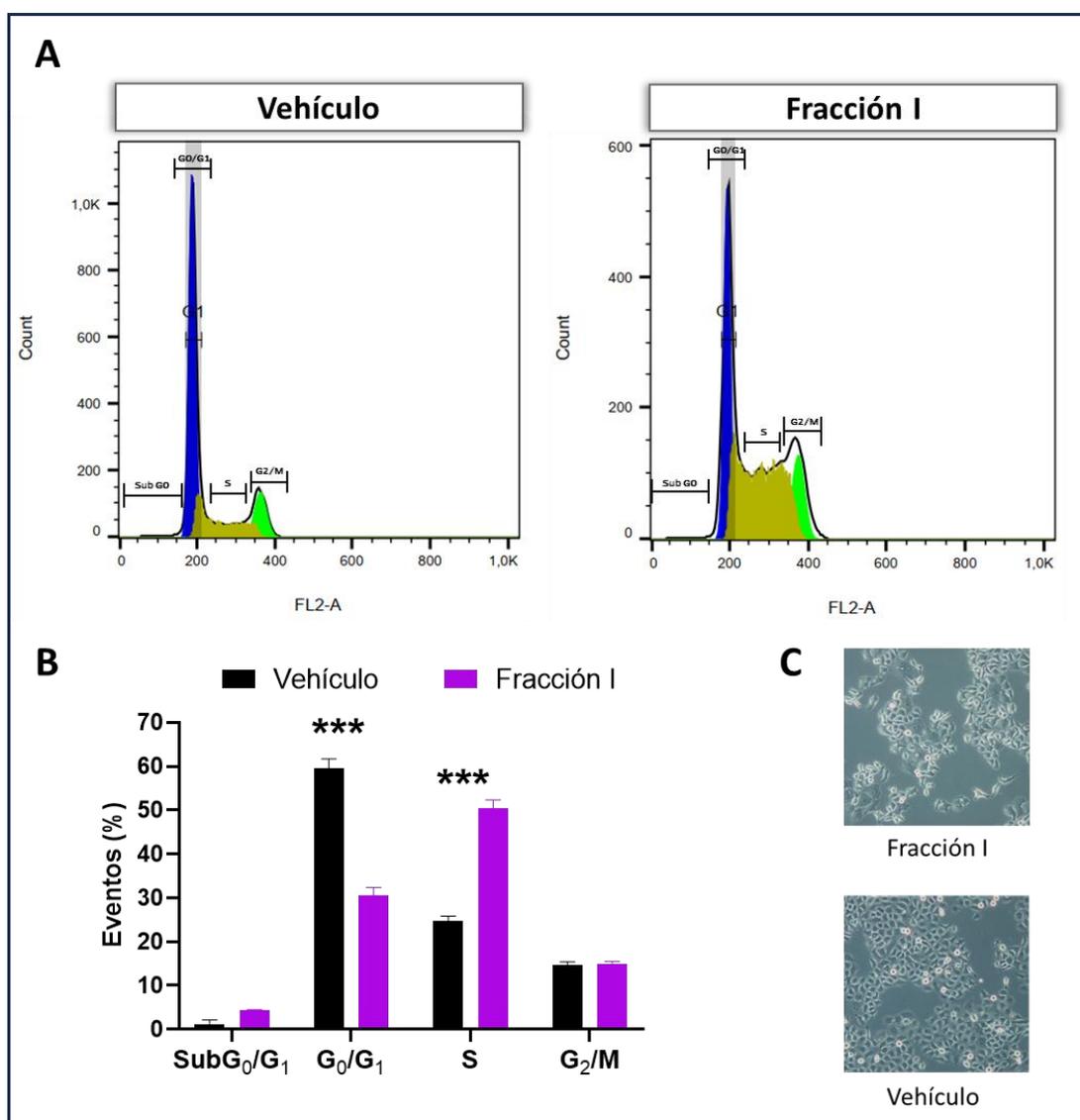


Figura 14. Efecto de la Fracción I sobre la progresión del ciclo celular en la línea HN13. Las células fueron tratadas con Fracción I (5 mg/mL) o vehículo por 48 h. En (A) se muestra la distribución de la población celular analizada por citometría de flujo luego de la tinción con IP. El gráfico (B) representa el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Las barras representan la media \pm SD del ensayo realizado por

triplicado. *** $p < 0,001$. (C) Fotografías tomadas al microscopio (100x) de las células HN13 al finalizar el tratamiento correspondiente.

Los resultados obtenidos mediante el análisis del ciclo celular en las células de CMTN MDA-MB-231 y CCECC HN13, demuestran que la Fracción I ejerce un efecto citostático sobre ambas líneas; sin indicios de provocar muerte celular en los tiempos evaluados. Tal efecto citostático es responsable, al menos en parte, de la disminución de la viabilidad celular producida por la Fracción I en las células tumorales MDA-MB-231 y HN13.

Efecto de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius* sobre la capacidad migratoria

Las células tumorales deben activar mecanismos de invasión y metástasis, uno de los *hallmark* del cáncer, para poder trasladarse físicamente desde el tumor primario hacia un nuevo sitio y poder colonizarlo (Chaffer & Weinberg, 2011). Este proceso metastásico, multiescalonado y complejo, comienza con la migración activa de las células tumorales desde su lugar de origen, a través de las matrices extracelulares, en busca de alcanzar vasos por los cuales viajar rumbo a un tejido distante (Curto, 1999; Chaffer & Weinberg, 2011).

En este contexto, comenzamos estudiando el efecto de la Fracción I sobre la capacidad migratoria de las células tumorales. Para ello, realizamos el ensayo de la herida, trabajando con concentraciones de Fracción I que no afectan la viabilidad celular de la línea en estudio y tiempos de tratamiento inferiores al T_2 celular de cada línea en particular. De esta manera, el efecto observado podrá ser enteramente adjudicado al impacto de la Fracción I sobre la capacidad migratoria de las células tumorales.

Efecto sobre la capacidad migratoria de células MDA-MB-231 de CMTN

Considerando que, a las 24 h de tratamiento con la Fracción I, la viabilidad de las células tumorales MDA-MB-231 no resultó afectada por ninguna de las concentraciones evaluadas (resultado demostrado por dos métodos independientes: colorimétrico con CV y conteo manual en cámara de Neubauer) decidimos emplear en el ensayo de la herida una concentración intermedia de 2 mg/mL de Fracción I. Sumado a ello, el tiempo de tratamiento empleado fue de 24 h; tiempo inferior al T_2 de la línea (≈ 29 h).

Mediante el ensayo de la herida, se observó que el tratamiento con la Fracción I (2 mg/mL; 24 h) redujo la capacidad migratoria de las células tumorales MDA-MB-231 en comparación con el vehículo. Como se observa en la Figura 15, el área de la herida en las células tratadas con la Fracción I resultó mayor al área de la herida control (área de la herida Fracción I: $34,15 \pm 6,34$ % vs área de la herida vehículo: $26,25 \pm 4,28$ %; $p < 0,01$). Cabe destacar que una mayor área de herida es indicativa de una menor capacidad migratoria de las células tumorales.

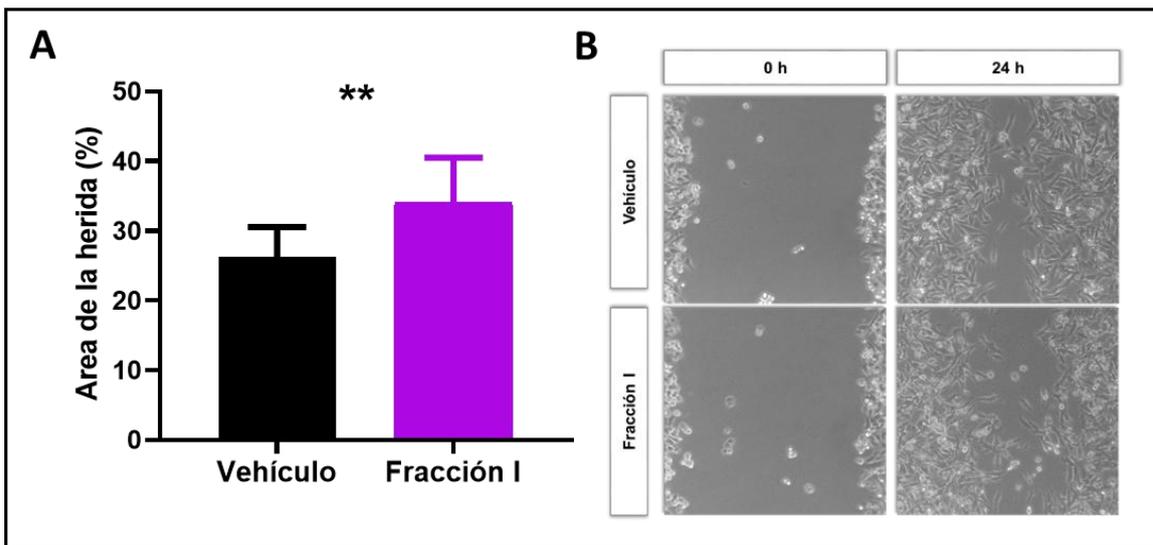


Figura 15. Efecto de la Fracción I sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con Fracción I (2 mg/mL) o vehículo. El gráfico (A) representa la media \pm SD de un ensayo representativo. El ensayo se realizó tres veces de manera independiente. ** $p < 0,01$. En (B) se muestran fotos representativas obtenidas mediante microscopio invertido (200x) de cada condición a tiempo 0 y 24 h de tratamiento.

Efecto sobre la capacidad migratoria de células HN13 de CCECC

Considerando que el T_2 de la línea HN13 es de 24 h aproximadamente, se decidió emplear un tratamiento de 20 h para realizar en ellas el ensayo de la herida. Al igual que sobre las células MDA-MB-231, en esta ocasión se empleó una concentración de 2 mg/mL de Fracción I. Recordemos que tal concentración no afectó la viabilidad de las células HN13 a las 24 h de tratamiento en comparación con el vehículo (resultado demostrado por dos métodos independientes: colorimétrico con CV y conteo manual en cámara de Neubauer).

Mediante el ensayo de la herida, se observó que el tratamiento con la Fracción I (2 mg/mL; 20 h) redujo la capacidad migratoria de las células tumorales HN13 en comparación con el vehículo. En la Figura 16, se observa que el área de la herida en las células tratadas con la Fracción I es mayor que el área de la herida en las células tratadas con el vehículo (área de la herida Fracción I: $22,28 \pm 14,26$ % vs área de la herida vehículo: $7,416 \pm 9,56$ %; $p < 0,01$).

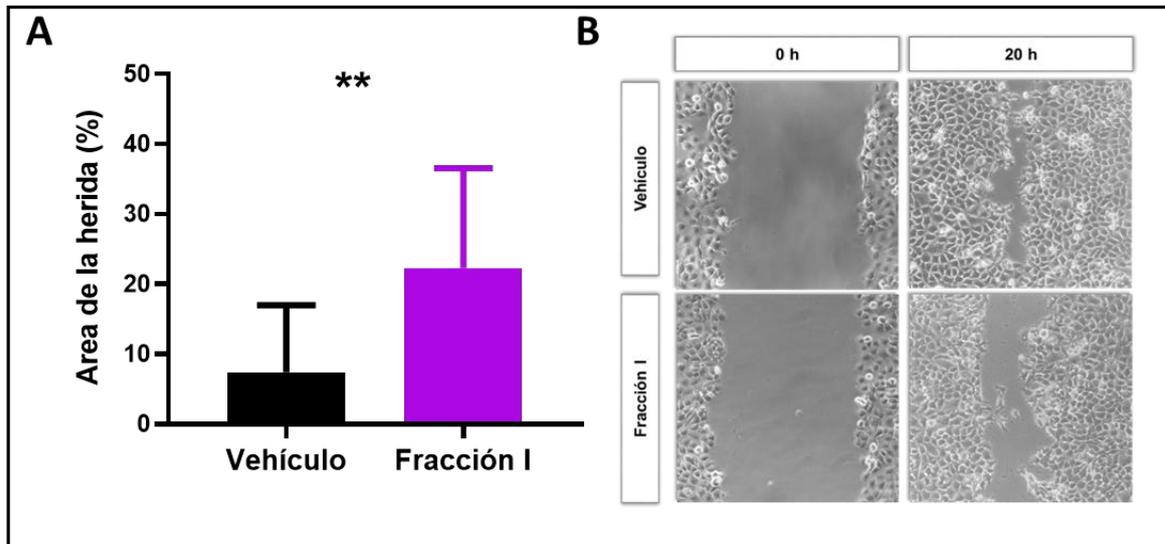


Figura 16. Efecto de la Fracción I sobre la capacidad migratoria de las células HN13. Las células fueron tratadas con Fracción I (2 mg/mL) o vehículo. El gráfico (A) representa la media \pm SD de un ensayo representativo. El ensayo se realizó tres veces de manera independiente. ** $p < 0,01$. En (B) se muestran fotos representativas obtenidas mediante microscopio invertido (200x) de cada condición a tiempo 0 y 20 h de tratamiento.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de la herida demuestran que la Fracción I de *P. pulmonarius* disminuye la capacidad migratoria, y con ello el potencial metastásico, de las células de CMTN MDA-MB-231 y CCECC HN13.

Efecto de la Fracción I de *Pleurotus pulmonarius* sobre células no malignas

Habiendo demostrado que la Fracción I afecta la viabilidad, progresión del ciclo celular y capacidad migratoria de células tumorales, decidimos investigar si el extracto ejerce un accionar selectivo o diferencial sobre células no malignas; comenzando específicamente con la evaluación sobre la viabilidad celular. Teniendo en cuenta que de los dos tipos tumorales estudiados (CMTN y CCECC), la Fracción I redujo con mayor eficacia la viabilidad de células de CMTN, seleccionamos a la línea HC11 de epitelio glandular mamario murino no maligno para la realización de este punto.

Las células no malignas HC11 fueron tratadas durante los mismos tiempos y con las mismas concentraciones de Fracción I o vehículo que la contraparte tumoral, y el efecto sobre la viabilidad fue evaluado mediante ensayo colorimétrico con CV. Como se observa en la Figura 17 A la Fracción I no afectó la viabilidad de las células no malignas HC11 a ninguna de las concentraciones ensayadas bajo un tratamiento de 24 h. Sin embargo, al prolongar el tiempo de tratamiento a 48 h, sorprendentemente todas las concentraciones de Fracción I evaluadas disminuyeron la viabilidad de las células HC11 (Figura 17 B). En este punto, es de notar que no se detectaron diferencias significativas entre el efecto

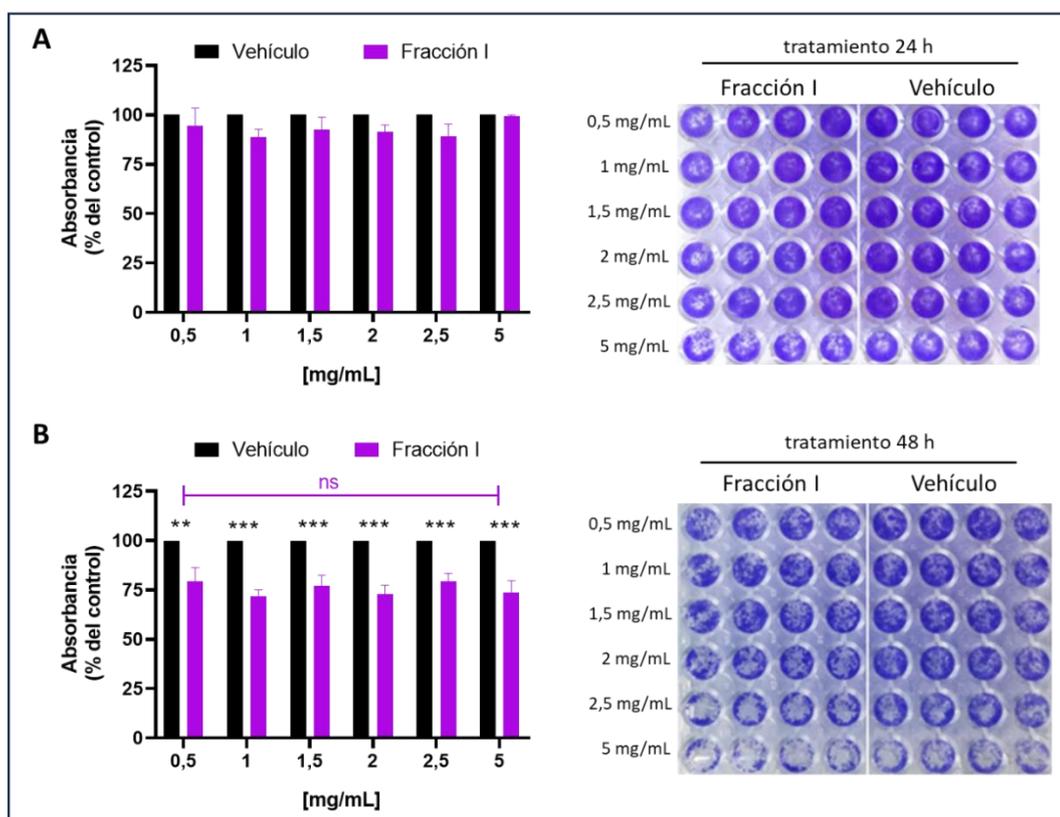


Figura 17. Efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de células HC11 determinado mediante ensayo colorimétrico con CV. Las células fueron expuestas a las concentraciones indicadas de Fracción I (barras violetas) o vehículo (control: PBS 1X, barras negras) durante (A) 24 h y (B) 48 h de tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$; ns. A la derecha de cada gráfico se muestra una placa *multiwell* representativa del correspondiente ensayo.

producido por las distintas concentraciones. Dicho en otras palabras, sobre las células no malignas HC11, la reducción de la viabilidad provocada por la Fracción I a 48 h de tratamiento no resultó ser dependiente de la dosis: el efecto producido por 0,5 mg/mL de Fracción I no resultó ser estadísticamente distinto al efecto producido por una concentración 10 veces mayor del extracto (5 mg/mL).

Para determinar si la Fracción I ejerce un efecto diferencial entre lo no maligno vs lo tumoral, comparamos la magnitud del efecto producido sobre la viabilidad celular en HC11 vs en MDA-MB-231 y 4T1. Recordemos que los resultados en 4T1 se encuentran descriptos en la sección: Introducción.

Reuniendo los resultados obtenidos previamente, a 24 h de tratamiento, ninguna de las dosis ensayadas de Fracción I disminuyó la viabilidad celular de la línea no maligna HC11 ni tumoral MDA-MB-231. Sin embargo, a igual tiempo de tratamiento, la viabilidad celular de la línea tumoral 4T1 resultó reducida a partir de 2,5 mg/mL de Fracción I. Al comparar las medias del efecto producido (Figura 18, A), se detecta una diferencia significativa a 5 mg/mL de extracto entre las células no malignas HC11 vs tumorales 4T1 (diferencia entre medias = 39,22; $p < 0,001$); siendo mayor el efecto producido sobre estas últimas.

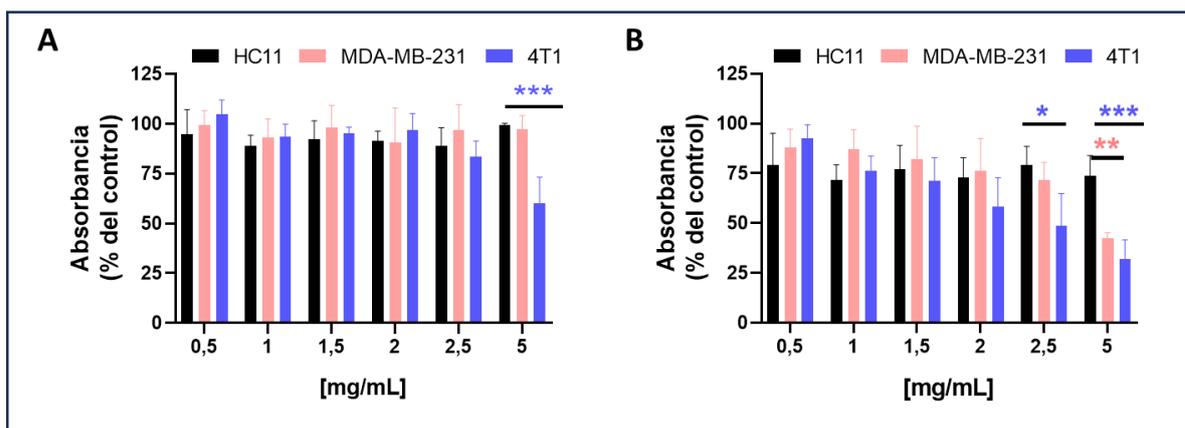


Figura 18. Comparación del efecto producido por la Fracción I sobre la viabilidad de células de CMTN y su contraparte no maligna determinado mediante ensayo colorimétrico con CV. Comparación del efecto producido por el tratamiento de (A) 24 h y (B) 48 h sobre las células tumorales MDA-MB-231 (barras rosas) y 4T1 (barras azules) vs las no malignas HC11 (barras negras). Las barras representan la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bajo el tratamiento de 48 h, recordemos que anteriormente demostramos que la Fracción I disminuyó la viabilidad de las células tumorales 4T1 y MDA-MB-231 de manera dosis dependiente a partir de 1 mg/mL y 2 mg/mL respectivamente. En contraposición a ello, el efecto sobre las células no malignas HC11 resultó ser independiente de la dosis. Al comparar la magnitud de los efectos producidos (Figura 18, B), detectamos que a la concentración de 2,5 mg/mL el efecto de la Fracción I sobre la viabilidad de las células tumorales 4T1 fue significativamente mayor que el producido sobre las células no malignas HC11 (diferencia entre medias = 30,65; $p < 0,001$). Sumado a ello, el tratamiento con 5 mg/mL de Fracción I afectó en mayor medida a la viabilidad de ambas líneas tumorales: 4T1 y MDA-MB-231 en comparación con las células no malignas HC11 (diferencia entre medias = 41,94; $p < 0,001$; y diferencia entre medias = 31,32; $p < 0,01$; respectivamente).

El conjunto de estos resultados demuestra que la Fracción I ejerce un efecto diferencial sobre la viabilidad de las células tumorales vs no malignas, afectando en mayor medida a las primeras. Este efecto se evidencia fundamentalmente con las concentraciones de 2,5 y 5 mg/mL de extracto.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cáncer es actualmente uno de los principales problemas de salud a nivel mundial (Singh & Dorak, 2017; Farrelly, 2021). Pese a los grandes avances logrados en su detección, diagnóstico y tratamiento, las estrategias terapéuticas convencionales aplicadas continúan demostrando tener severas limitaciones en el abordaje eficaz de la enfermedad. Ante ello, existe una necesidad urgente de contar con enfoques de tratamiento más específicos y eficientes. En este contexto, los productos naturales son considerados, cada vez más, como una valiosa fuente para el desarrollo de nuevos fármacos debido a sus altos perfiles de seguridad, baja toxicidad, escasos efectos secundarios y diversas actividades biológicas (Zhang et al, 2024).

En términos generales, los productos naturales se definen como extractos, metabolitos o derivados bioactivos de origen natural; producidos por microorganismos, hongos, plantas o animales (Kan et al, 2023). Desde fines de 1990 a la fecha, la tasa de investigaciones científicas resultante del motor de búsqueda en *PubMed* “*natural products and cancer*” revela un crecimiento exponencial del número de reportes vinculado a ello. Más aún, se estima que más del 60 % de todos los fármacos antitumorales derivan parcial o totalmente de la naturaleza (Newman et al, 2012). Es así como en los últimos años, el empleo de productos naturales como terapia complementaria aplicada junto al tratamiento convencional del cáncer ha ido ganando reconocimiento mundial (Kan et al, 2023).

En este contexto, y como mencionamos en la sección “Introducción” de esta Tesis, diversas especies de hongos se presentan como pequeñas “fábricas farmacéuticas” productoras de metabolitos bioactivos con potencial terapéutico (De Silva et al, 2012; Patel et al, 2012; Gargano et al, 2017). Al evaluar exclusivamente la actividad antitumoral de ellos, se advierte que, durante mucho tiempo, se reconoció un único y exclusivo modo de acción a cada tipo de metabolito fúngico. Mientras que los de APM ejercían su acción antitumoral únicamente mediante la activación/estimulación del sistema inmune (acción antitumoral indirecta o inmuno-dependiente); los metabolitos de BPM eran los capaces de actuar directamente sobre la célula tumoral (acción antitumoral directa o inmuno-independiente) (Zaidman et al, 2005; Petrova et al, 2008; Chatterjee et al, 2011). Sin embargo, cada vez es mayor la evidencia que demuestra que ciertos polisacáridos (metabolitos de APM), también son capaces de ejercer una acción directa sobre las células tumorales (Lavi et al, 2006; Zhang et al, 2007; Xu et al, 2017).

De esta manera, entre la diversidad de metabolitos fúngicos, los polisacáridos se destacan por: su capacidad inmuno-estimuladora, de gran importancia al complementar la terapia antitumoral convencional (Leung et al, 2006), y por su potencial accionar directo sobre la célula tumoral, tendiente a disminuir las capacidades adquiridas, *hallmarks* o sellos del cáncer. Con esto en mente, nuestro grupo de trabajo ha investigado y demostrado que la actividad antitumoral de la Fracción D: extracto estandarizado de polisacáridos solubles en agua unidos a proteínas, obtenido del hongo *G. frondosa* (Maitake) está dada no sólo por su capacidad inmuno-estimuladora previamente reportada (Hishida et al, 1988; Sanzen et al, 2001; Inoue et al, 2002; Harada et al, 2003; Kodama et al, 2005), sino también

por su accionar directo en distintos subtipos de cáncer de mama (Soares et al, 2011; Alonso et al, 2013; 2017; 2018).

A medida que las investigaciones con la Fracción D avanzaban, comenzamos a advertir la importancia y necesidad de que la especie natural considerada como fuente de compuestos bioactivos presente una utilización sustentable a nivel local. Frente a esta necesidad, desde el año 2018 hemos establecido colaboración con el LBHCyM, laboratorio pionero en la adaptación al cultivo intensivo de especies silvestres de hongos comestibles. Mientras se trabaja en pos de ello con *G. frondosa*, entre las especies que lograron adaptarse a su cultivo intensivo en Argentina, seleccionamos a *P. pulmonarius* para dar comienzo al proyecto del cual se desprende la presente Tesis.

Teniendo entonces garantizada la utilización sustentable a nivel local de *P. pulmonarius*, establecimos un protocolo de extracción para la obtención de la Fracción I: extracto enriquecido en polisacáridos solubles en agua. A la fecha, la caracterización físico-química de la Fracción I revela que el 68,72 % +/- 6,60 % del extracto son polisacáridos, específicamente glucanos, y que un 9,02 % +/- 3,32 % corresponde a proteínas. Sumado a ello, mediante difracción de rayos X quedó demostrada la solubilidad del mismo. Cabe destacar que son este tipo de polisacáridos, libres o unidos a proteínas, obtenidos a partir de *Pleurotus spp.* los que mayor evidencia presentan en cuanto a su potencial antitumoral. Esto concuerda incluso con lo reportado para otras especies fúngicas, cuyos polisacáridos solubles en agua son los que mayor capacidad inmuno-estimuladora presentaron (Rop et al, 2009), sumado a que evitan complicaciones futuras en cuanto a la solubilidad y biodisponibilidad del compuesto.

En este trabajo de Tesis demostramos que la Fracción I de *P. pulmonarius*, ejerce actividad antitumoral directa sobre células de CMTN y CCECC, afectando en ellas ciertas capacidades biológicas distintivas y complementarias conocidas como sellos o *hallmarks* del cáncer.

Específicamente, en CMTN demostramos que la Fracción I disminuye la viabilidad de las células MDA-MB-231 (humanas) de manera tiempo- dosis- dependiente. Este resultado fue semejante al obtenido previamente en el LBC sobre las células 4T1 (murinas). De modo que, en conjunto, el tratamiento con la Fracción I redujo la viabilidad de dos líneas celulares representantes del CMTN. Es de notar que las células MDA-MB-231 (derivadas de un sitio metastásico) resultaron ser más resistentes al tratamiento con la Fracción I en comparación a las células 4T1 (derivadas de un tumor primario). Mientras que sobre las MDA-MB-231 la dosis mínima efectiva de 2,5 mg/mL surgió a las 48 h de tratamiento, sobre las 4T1 esa misma dosis resultó efectiva con sólo 24 h de tratamiento. Dada la alta heterogeneidad biológica existente (Ospital et al, 2024), intrínseca de la enfermedad y vinculada al estadio de la misma, es de esperar que las distintas líneas celulares, incluso de un mismo subtipo tumoral, exhiban distinta sensibilidad a un tratamiento. Con igual tendencia a nuestros resultados, en el trabajo reportado por Silva et al (2012), se observa que la magnitud del efecto desplegado por los polisacáridos solubles en agua obtenidos de *P. ostreatus* en la línea celular SW-480 (estadio B de Dukes -

adenocarcinoma colorrectal) es considerablemente mayor que en la línea HT-15 (estadio C de Dukes - adenocarcinoma colorrectal).

Sumado a ello, al demostrar que la Fracción I disminuye la viabilidad de las células MDA-MB-231 y 4T1 (representantes de CMTN), hemos ampliado el espectro de acción de los polisacáridos solubles en agua de *P. pulmonarius* ya que, anteriormente, Lavi et al (2010 y 2012) reportaron el efecto de los mismos sobre la viabilidad de células HT29, HCT-116, Caco2, LS174T, HM-7, RSB (representantes de cáncer de colon) y Xu et al (2012) sobre células representantes de cáncer de hígado (Huh7, Hep3B, HepG2 and SMMC-7721). Particularmente, en relación a la disminución de la viabilidad en CMTN demostrada en este trabajo, es de advertir que desplegar tal efecto sobre dicho subtipo tumoral es poco frecuente. Se ha observado que cuando los extractos fúngicos disminuyen la viabilidad de células tumorales mamarias, generalmente ejercen el efecto sólo sobre células que expresan RE, inhibiendo la actividad de la aromatasa (Grube et al, 2001; Petrova et al, 2005; Zaidman et al 2005; Jafaar et al, 2014). Así, por ejemplo, de 38 extractos acuosos completos evaluados sobre MCF-7 (carcinoma mamario hormono-dependiente), BT-20 (CMTN) y MDA-MB-231 (CMTN), sólo 3 de ellos fueron capaces de afectar la viabilidad celular de ambos subtipos tumorales (Gu et al, 2006).

En CCECC, trabajando con la línea HN13 (humana) demostramos que la Fracción I ejerce también un efecto directo sobre la viabilidad de estas células tumorales. Aquí advertimos que, al menos con los resultados actuales, este tipo tumoral exhibe una resistencia al extracto notablemente mayor que el CMTN. Sólo la máxima concentración evaluada de 5 mg/mL logró disminuir la viabilidad de las células HN13 a partir de las 48 h de tratamiento y de manera tiempo dependiente.

Seguido a ello, al comenzar a evaluar el mecanismo de acción por el cual la Fracción I disminuye la viabilidad de las células MDA-MB-231 y HN13, demostramos que en ambos tipos tumorales el extracto induce un efecto citostático, arrojando a las células en fase S del ciclo celular. Aquí evidenciamos también la distinta resistencia de estas células a la Fracción I, ya que efectos citostáticos semejantes fueron alcanzados empleando el doble de concentración del extracto sobre las células HN13 (5 mg/mL; 48 h) en comparación al empleado sobre las MDA-MB-231 (2,5 mg/mL; 48 h). Sobre las células 4T1 (células que demostraron tener menor resistencia a la Fracción I), los resultados previos obtenidos en el LBC demuestran que el extracto despliega en ellas un efecto citotóxico, induciendo muerte celular por apoptosis y, en menor medida, por necrosis (2,5 mg/mL; 48 h).

En este punto es importante notar que el efecto de los polisacáridos solubles en agua de *P. pulmonarius* sobre la viabilidad celular ha sido demostrado en otros tipos tumorales: cáncer de colon (Lavi et al, 2010 y 2012) y cáncer de hígado (Xu et al, 2012), siendo el mecanismo responsable de ello la inducción de apoptosis mediada por la modulación de la expresión de Bcl-2, Bax y citocromo c (Lavi et al, 2012) y la inactivación de la vía de PI3K/ATK (Xu et al, 2012).

Por otro lado, es sabido que la principal causa de muerte por cáncer es el desarrollo de metástasis (Park et al, 2022). Como hemos comentado anteriormente, el proceso metastásico es un proceso

complejo y multiescalonado que comienza con una invasión primaria o local en la cual la célula tumoral debe ser capaz de migrar activamente. Aumentando aún más su complejidad, recientemente se ha sugerido que no se trata de un proceso lineal, sino que involucra múltiples rutas paralelas (Suhail et al, 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la Fracción I de *P. pulmonarius* reduce la capacidad migratoria de las células tumorales de CMTN MDA-MB-231 y CCECC HN13. Tal efecto fue demostrado también previamente en el LBC sobre las células 4T1 (CMTN). Al observar la magnitud del efecto producido por la Fracción I en cada línea celular, se advierte que la capacidad migratoria de las HN13 fue la más reducida por el extracto. Recordemos que las HN13 demostraron ser las más resistentes al efecto de la Fracción I sobre la viabilidad celular. Claramente esto muestra que distintos procesos celulares son dirigidos/orquestados por distintas vías moleculares, las cuales pueden incluso variar de un tipo celular a otro, y sugiere que la Fracción I tiene distinta injerencia en ellos.

Aquí, advertimos nuevamente que, de los trabajos en los que se demostró la actividad antitumoral directa de los polisacáridos solubles en agua de *P. pulmonarius*, sólo en uno de ellos se evaluó el efecto sobre la capacidad invasiva; demostrando que tales metabolitos reducen la misma en células de cáncer de hígado (Xu et al, 2012).

Finalmente, una característica deseada en todo compuesto con potencial efecto terapéutico antineoplásico es que presente un accionar selectivo o diferencial entre las células tumorales y las no malignas/normales. Evaluando el efecto de la Fracción I sobre células epiteliales mamarias normales de ratón (HC11) observamos un efecto particular del extracto sobre ellas. A las 48 h de tratamiento todas las concentraciones ensayadas de Fracción I afectaron por igual (sin diferencia significativa entre ellas; efecto independiente de las dosis) la viabilidad de las células HC11, disminuyéndola en promedio en un 24,2 %. Pese a ello, al comparar la magnitud de los efectos producidos por el extracto en las células tumorales vs su contraparte no maligna, demostramos que la Fracción I de *P. pulmonarius* ejerce un accionar diferencial afectando en mayor medida la viabilidad de las células tumorales 4T1 (5 mg/mL, 24 h; 2,5 y 5 mg/mL a 48 h) y MDA-MB-231 (5 mg/mL, 48 h) que la viabilidad de la contraparte normal HC11.

En conclusión, el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo de Tesis aporta evidencia de que la Fracción I, extracto enriquecido en polisacáridos solubles en agua de *P. pulmonarius*, posee actividad antitumoral directa sobre células de CMTN y CCECC. Con distinto grado de magnitud, la Fracción I actúa sobre las células tumorales, independientemente del sistema inmune, afectando ciertas capacidades celulares cuya desregulación conduce al desarrollo y progresión del cáncer. Específicamente, la Fracción I reduce la viabilidad de las células tumorales MDA-MB-231 y HN13, ejerciendo en ellas un efecto citostático mediante la inducción de arresto celular en fase S; disminuye la capacidad migratoria de ambas líneas tumorales, reduciendo su fenotipo metastásico; y ejerce un efecto diferencial sobre la viabilidad de las células no malignas HC11.

Lo aquí demostrado, junto con bibliografía vinculante al tema, nos lleva a hipotetizar que es el accionar sinérgico de los metabolitos presentes en el extracto, polisacáridos y proteínas, el responsable de la actividad antitumoral directa de la Fracción I. Nos motiva a continuar desarrollando nuevos ensayos *in vitro* que permitan abordar más *hallmarks* del cáncer; a ampliar los resultados obtenidos en CCECC empleando una segunda línea representante de este tipo tumoral y; a concluir el análisis del modelo murino de trasplante singeneico con células 4T1 desarrollado. En paralelo a ello, nos motiva a evaluar la capacidad inmuno-estimuladora de la Fracción I de *P. pulmonarius* en ambos carcinomas aquí abordados.

El presente trabajo de Tesis ha aportado evidencia científica a la línea de investigación en la cual se enmarca: “Determinación y estudio de la actividad antitumoral de extractos fúngicos en carcinomas con escasas opciones terapéuticas”. En dicha línea aspiramos al desarrollo de nuevos agentes antitumorales naturales de baja toxicidad, capaces de actuar como complemento de la terapia convencional, fortaleciendo incluso al sistema inmune y mejorando la calidad de vida de los pacientes. Aspiramos con ello también, a continuar con la cadena de valorización del cultivo de hongos comestibles en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertó E, Curvetto N, Deschamps J, González Matute R, Lechner B. *Hongos Silvestres y de Cultivo en Argentina: Historia, regiones y sistemas de producción, hongos silvestres de valor económico, consumo, mercado interno y externo, legislación, oferta tecnológica e investigación y desarrollo. COLPOS-UNSCONACYT- AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP, Puebla, Primera edición. 2010; capítulo 19, pp.333-358*
- Alonso EN*, Ferronato MJ*, Fermento ME, Gandini NA, López Romero A, Guevara JA, Facchinetti MM, Curino AC. Antitumoral and antimetastatic activity of Maitake D-Fraction in triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget*. 2018; 9(34):23396-23412.
- Alonso EN, Ferronato MJ, Gandini NA, Fermento ME, Obiol DJ, López Romero A, Arévalo J, Villegas ME, Facchinetti MM, Curino AC. Antitumoral Effects of D-Fraction from Grifola Frondosa (Maitake) Mushroom in Breast Cancer. *Nutrition and Cancer*. 2017; 69(1):29-43.
- 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. *Journal of Medicinal Food*. 2013; 16(7):602-617.
- Amos KD, Adamo B, Anders CK. Triple-negative breast cancer: an update on neoadjuvant clinical trials. *International Journal of Breast Cancer*. 2012; 2012:385978.
- Benada J, Macurek L. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules*. 2015; 5(3): 1912-1937.
- Bobek P, Galbavy S, Ozdín L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *British Journal of Biomedical Science*. 2001; 58(3):164-8
- CAA: Codigo Alimentario Argentino. Capitulo XVI: correctivos y coadyuvantes. Artículo 1249. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario> .
- Cao XY, Liu JL, Yang W, Hou X, Li QJ. Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 12(2):2383-9.
- Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cellmetastasis. *Science* 2011; 331, 1559–1564.
- Chatterjee S, Biswas G, Basu SK, Acharya K. Antineoplastic effect of mushrooms: A review. *Australian Journal of Crop Science*. 2011; 5:904-911
- Chen P, Yong Y, Gu Y, Wang Z, Zhang S, Lu L. Comparison of antioxidant and antiproliferation activities of polysaccharides from eight species of medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2015; 17(3):287-95.
- Curvetto N, Figlas D, Delmastro S. Sunflower seed hulls as substrate for the cultivation of shiitake mushrooms. *HortTechnology*. 2002b; 12:652-655.

- Curvetto N, Figlas D, Devalis R, Delmastro S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄⁺ and/or Mn(II). *Bioresource Technology*. 2002a; 84: 171-176.
- Curvetto N, González Matute R, Figlas D, Delmastro S. *Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation*. 2005; Chapter 5:119-124.
- Darjania L, Curvetto N, Schapiro M, Figlas, Curvetto D. Sunflower seed hulls as a substrate for cultivation of an oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom News*. 1997; 45: 6-10.
- 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*. 2012; 55, 1-35
- Devi KS, Behera B, Mishra D, Maiti TK. Immune augmentation and Dalton's Lymphoma tumor inhibition by glucans/glycans isolated from mycelia and fruit body of *Pleurotus ostreatus*. *International Immunopharmacology*. 2015; 25(1):207-17.
- Devi KS, Roy B, Patra P, Sahoo B, Islam SS, Maiti TK. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. *Carbohydrate Polymers*. 2013; 94(2):857-65
- Doçi, C. L., Mikelis, C. M., Lionakis, M. S., Molinolo, A. A., & Gutkind, J. S. Genetic identification of SEMA3F as an antilymphangiogenic metastasis suppressor gene in head and neck squamous carcinoma. *Cancer research*. 2015; 75(14), 2937-2948
- El-Deeb NM, El-Adawi HI, El-Wahab AEA, Haddad AM, El Enshasy HA, He YW, Davis KR. Modulation of NKG2D, KIR2DL and Cytokine Production by *Pleurotus ostreatus* Glucan Enhances Natural Killer Cell Cytotoxicity Toward Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019; 7:165
- Facchini JM, Alves EP, Aguilera C, Gern RM, Silveira ML, Wisbeck E, Furlan SA. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014; 68:72-77.
- Farrelly C. 50 years of the "war on cancer": lessons for public health and geroscience. *GeroScience*. 2021; 43(3):1229-1235.
- Ferreira IC, Vaz JA, Vasconcelos MH, Martins A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2010; 10(5): 424-436
- Figlas, D., R. González Matute & N. Curvetto. Cultivation of culinary-medicinal lion's mane mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetidae) on substrate containing sunflower seed hulls. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2007; 9: 67-73.
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 363:1938–1948.
- Gargano ML, Van Griensven LJ, Isikhuemhen OS, Lindequist U, Venturella G, Wasser SP, Zervakis GI. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential.

Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 2017; 151:3,548-565.

- Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. *The Journal of Nutrition*. 2001; 131:3288–3293.
- Gu Y, Sivam G. cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Journal of medicinal food*. 2006; (2)196-204.
- Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022; 12(1):31–46.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-674.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57- 70
- 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*. 2003; 192(2):181-187.
- Hishida I, Nanba H, Kuroda H. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (maitake). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1988; 36(5):1819-1827.
- IARC: International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2022 (en línea). Fecha de consulta: 4 octubre 2024. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/>.
- Indap M A, Rao S G. Cell death by apoptosis and cancer chemotherapy. *The National Medical Journal of India*.1995; 8(2):65-7.
- 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. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002; 25(4):536-540
- Jafaar ZM, Litchfield LM, Ivanova MM, Radde BN, Al-Rayyan N, Klinge CM. β -D-glucan inhibits endocrine-resistant breast cancer cell proliferation and alters gene expression. *International Journal of Oncology*. 2014; 44:1365–1375.
- Jamdade VS, Sethi N, Mundhe NA, Kumar P, Lahkar M, Sinha N. Therapeutic targets of triple-negative breast cancer: a review. *British Journal of Pharmacology*. 2015; 172:4228-4237.
- Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020; 26,6(1):92.
- Kamiloglu S, Sari G, Ozdal t, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food frontiers*. 2020; 1:332-349.
- Kan LL-Yu, Chan BC-L, Leung P-C, Wong C-K. Natural-Product-Derived Adjunctive Treatments to Conventional Therapy and Their Immunoregulatory Activities in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecules*. 2023; 28(15):5804.
- Kodama N, Asakawa A, Inui A, Masuda Y, Nanba H. Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Oncology Reports*. 2005; 13(3):497-502.

- Lavi I, Levinson D, Peri I, Tekoah Y, Hadar Y, Schwartz B. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010; 85: 1977-1990.
- Lavi I, Nimri L, Levinson D, Peri I, Hadar Y, Schwartz B. Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Journal of gastroenterology*. 2012; 47: 504-518.
- Lavi I, Friesem D, Geresh S, Hadar Y, Schwartz B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*. 2006; 244(1):61-70.
- Leung MY, Liu C, Koon JC, Fung KP. *Immunology Letters*. 2006; 105(2):101-114.
- Leung MY, Liu C, Koon JC, Fung KP. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*. 2006; 105(2):101-114.
- Li Y, Zhang H, Merkher Y, Chen L, Liu N, Leonov S, Chen Y. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2022; 15(1):121.
- Liebertz, D. J., Lechner, M. G., Masood, R., Sinha, U. K., Han, J., Puri, R. K., Correa, A.J. & Epstein, A. L. Establishment and characterization of a novel head and neck squamous cell carcinoma cell line USC-HN1. *Head & Neck Oncology*. 2010; 2(1), 1.
- Liefers GJ, Tollenaar RA. Cancer genetics and their application to individualised medicine. *European Journal of Cancer*. 2002; 38(7): 872-879.
- Martin D, Abba MC, Molinolo AA, Vitale-Cross L, Wang Z, Zaida M, Delic NC, Samuels Y, Lyons JG, Gutkind JS. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget*. 2014; 5(19):8906-8923
- Mizuno T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999; 1:9-29.
- National Cancer Institute (NCI), on line. Fecha de consulta: 4 Octubre 2024. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition> .
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012; 75(3):311-335.
- 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: basic and clinical research*. 2015; 9:17-34.
- Ospital IA, Táquez Delgado MA, Nicoud MB, Corrêa MF, Borges Fernandes GA, Andrade IW, Lauretta P, Martínez Vivot R, Comba MB, Zanardi MM, Speisky D, Uriburu JL, Fernandes JPS, Medina VA. Therapeutic potential of LINS01 histamine H₃ receptor antagonists as antineoplastic agents for triple negative breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024; 174:116527.

- Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(12):6806.
- Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2012; 2(1):1-15.
- Petrova RD, Reznick AZ, Wasser SP, Denchev CM, Nevo E, Mahajna J. Fungal metabolites modulating NF-kappaB activity: an approach to cancer therapy and chemoprevention (review). *Oncology Reports*. 2008; 19(2):299-308.
- Petrova RD, Wasser SP, Mahajna J, Denchev CM, Nevo E. Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2005; 7, 141-155.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010; 120(2): 293-308.
- Román Curto C. El proceso metastásico. I: invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermo-sifiliográficas*. 1999; 90:143-155.
- Rop O, Mlcek J, Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*. 2009; 67(11):624-631.
- Sanzen I, Imanishi N, Takamatsu N, Konosu S, Mantani N, Terasawa K, Tazawa K, Odaira Y, Watanabe M, Takeyama M, Ochiai H. Nitric oxide-mediated antitumor activity induced by the extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in a macrophage cell line, RAW264.7 *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2001; 20(4):591-597.
- Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*. 2006; 6(8):1287-1297.
- Shantsyan M, Konusova V, Maksimova Y, Goloshchew A, Panchenko A, Simbirtsev A, Petrishchev N, Denisova N. immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology*. 2004; 113:77-83.
- Silva S, Martins S, Karmali A, Rosa E. Production, purification and characterisation of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumor activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012; 92(9):1826-32.
- Singh SK, Dorak MT. Cancer Immunoprevention and Public Health. *Frontiers in Public Health*. 2017; 5:101.
- Soares R, Meireles M, Rocha A, Pirraco A, Obiol D, Alonso E, Joos G, Balogh G. Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation. *Journal of Medicinal Food*. 2011; 14(6):563-572.
- Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, Kshitiz. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*. 2019; 9(2):109-127.

- Tong H, Fengguo Xia, Kai Feng, Guangren Sun, Xiaoxv Gao, Liwei Sun, Rui Jiang, Dan Tian, Xin Sun. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*. 2009; 100(4):1682-6.
- Uddin Pk MM, Islam MS, Pervin R, Dutta S, Talukder RI, Rahman M. Optimization of extraction of antioxidant polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm and its cytotoxic activity against murine lymphoid cancer cell line. *Plos One*. 2019; 14(1): e0209371.
- Williams C, Helguero L, Edvardsson K, Haldosén LA, Gustafsson JA. Gene expression in murine mammary epithelial stem cell-like cells shows similarities to human breast cancer gene expression. *Breast Cancer Research*. 2009; 11(3): R26.
- Wisbeck E, Facchini JM, Alves EP, Silveira MLL, Gern RMM, Ninow JL, Furlan SA. A polysaccharide fraction extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass inhibit Sarcoma 180 tumor. *Anais De Academia Brasileira De Ciencias*. 2017; 89(3 Suppl):2013-2020.
- World Health Organization (WHO), on line. Fecha de consulta: 4 octubre 2024. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 .
- Xu H, Zou S1, Xu X. The β -glucan from *Lentinus edodes* suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in estrogen receptor positive breast cancers. *Oncotarget*. 2017; 8(49):86693-86709
- Xu W, Huang JJ, Cheung PCK. Extract of *Pleurotus pulmonarius* suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signaling pathway. *Plos one*. 2012; 7(3).
- Xu W, Li B, Lai ETC, Chen L, Huang JJ, Cheung ALM, Cheung PCK. Water Extract from *Pleurotus pulmonarius* with Antioxidant Activity Exerts In Vivo Chemoprophylaxis and Chemosensitization for Liver Cancer. *Nutrition and Cancer*. 2014; 66: 989-998.
- Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World Journal of Clinical Oncology*. 2015; 6:252–263.
- Yoshioka Y, Emori M, Ikekawa T, Fukuoka F. Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quél.*. *Carbohydrate Research*. 1975; 43(2):305-320.
- Yoshioka Y, Ikekawa T, Noda M, Fukuoka F. Studies on Antitumor Activity of Some Fractions from Basidiomyces. I. An Antitumor Acidic Polysaccharide Fraction of *P. ostreatus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1972; 20(6)1175-1180.
- Yoshioka Y, Tabeta R, Saito H, Uehara N, Fukuoka F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Quél.: Isolation and structure of a β -Glucan. *Carbohydrate Research*. 1985; 140:93- 100.
- Zaidman BZ, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005; 67(4):453-468.

- Zhang J, Wu Y, Li Y, Li S, Liu J, Yang X, Xia G, Wang G. Natural products and derivatives for breast cancer treatment: From drug discovery to molecular mechanism. *Phytomedicine*. 2024; 129:155600.
- Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*. 2007; 18(1):4-19.