



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia
Tesis Doctoral en Biología



**“Efectos antitumorales de la Fracción D
de *Grifola frondosa* (Maitake)
en cáncer de mama”**

Licenciada Eliana Noelia Alonso

Director: Dr. Alejandro Carlos Curino

Co-Director: Dra. Gabriela Andrea Balogh

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CCT BAHÍA BLANCA

Bahía Blanca

Argentina

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis Doctoral en Biología

**“Efectos antitumorales de la Fracción D
de *Grifola frondosa* (Maitake)
en cáncer de mama”**

Licenciada Eliana Noelia Alonso

Director: Dr. Alejandro Carlos Curino

Co-Director: Dra. Gabriela Andrea Balogh

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER - INIBIBB - CCT BAHÍA BLANCA

Bahía Blanca

Argentina

2016

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en el Laboratorio de Hongos Comestibles y Medicinales del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) en el período comprendido entre el 1 de Abril de 2011 al 31 de Diciembre de 2012 bajo la dirección de la Dra. Gabriela Andrea Balogh, Investigadora Adjunta del CONICET, e investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), ambos integrantes del centro Científico y Tecnológico Bahía Blanca (CONICET-UNS), en el período comprendido entre el 1 de Enero de 2013 al 10 de Febrero de 2016, bajo la dirección del Dr. Alejandro Carlos Curino, Investigador Independiente del CONICET y la co-dirección de la Dra. Gabriela Andrea Balogh, Investigadora Adjunta del CONICET.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP 112-201101-00556), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-PICT 2012-1595 y ANPCyT-PICT 2012-0966), y por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/B172).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de(.....)

DEDICATORIA

*A mis papás,
Mabel y Juan Carlos.*

*A mi hermana,
Cintia.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CERZOS por el soporte institucional durante mis dos primeros años de carrera de posgrado, y al INIBIBB por el soporte institucional en mis tres últimos años. Agradezco al CONICET por financiar mis estudios de posgrado y a la UNS por brindarme la posibilidad de estudiar una carrera de posgrado.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Alejandro Carlos Curino por haberme brindado un lugar en su laboratorio para poder continuar investigando y concluir mi tesis, por su confianza, capacidad y experiencia científica.

Agradezco a mi co-directora de tesis, la Dra. Gabriela Balogh por haberme ayudado a ingresar en este camino y por haberme permitido continuar con el tema de investigación.

Agradezco a la Dra. María Marta Facchinetti, por haber aceptado también mi ingreso en su laboratorio, por su confianza, capacidad y experiencia científica.

Al Bqco. Alejandro López Romero, por su buena predisposición para ayudarme con la citometría de flujo.

Al Médico Patólogo Julián Arévalo, por ayudarme siempre con los análisis histológicos.

Al personal de apoyo del INIBIBB y del CERZOS, en especial a Susana, Beatriz, Edgardo, Marta y Riqui por haberme ayudado cada vez que salí corriendo con un material urgente para autoclavar o con algún ensayo.

A la Dra. Alicia Carrera, a quien elegí hace ya unos años como Consejera, y por más que pase el tiempo sé que siempre está para escucharme y guiarme.

A mis compañeros de laboratorio: a Juli por todos los lindos ensayos codo a codo que pasamos, por el aguante y empuje de todos los días; a Euge por escucharme y entenderme; a Ariel por su gran ayuda con las técnicas histológicas. Agradezco también a Emi, nueva compañera de lab y vecina de escritorio y a mis ex- compañeros Debo, Julián y Andre. A todos les agradezco la ayuda que me brindaron desde el primer día, la buena predisposición y la calidad humana.

A mis compañeros de laboratorios vecinos, a Sofi SC, Pao, Guada y Sofi V por la buena onda de siempre y por las risas.

A mis amigos, Lu, Naty B, Rami, Agus, Flor, Nati P, Juan, Juli F, Mari D, Mica y Pachu, por acompañarme y ayudarme siempre....cuando las cosas están bien o tan bien, y por saber que siempre cuento con ustedes.

A mi cuñado Silvio (Pancho), por su confianza, cariño y por todos los antiguos viernes de cocinadas y de pelis descargadas que siempre me ayudaban a relajar un poco.

A mi hermana Cintia, por estar siempre a mi lado, escucharme, ayudarme y cuidarme.

A mi sobrinito Martín, por llenarme de alegría y de amor cada vez que me mira.

Agradezco a mis papás, Mabel y Juan Carlos, a quienes les debo todo lo que soy, por preocuparse siempre por mí y por los esfuerzos que han hecho para darme siempre lo mejor.

¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!

Eliana.

RESUMEN

La Fracción D es un proteoglucano obtenido del hongo comestible *Grifola frondosa* (Maitake). Existe evidencia de que la Fracción D presenta efectos anticancerígenos en distintas etapas de la progresión tumoral. Sin embargo, estos efectos han sido poco explorados en el caso del cáncer de mama. En este contexto, nos proponemos investigar los posibles efectos terapéuticos de la Fracción D en este tipo de cáncer.

Los efectos antineoplásicos de la Fracción D han sido atribuidos tradicionalmente a su capacidad inmunoestimuladora. Sin embargo, recientemente se comenzó a observar que dicha fracción podría actuar de manera independiente del sistema inmune sobre células derivadas de ciertos tipos tumorales. Por esta razón, también nos proponemos identificar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la Fracción D ejercería un efecto antitumoral independiente del sistema inmune en células de cáncer de mama.

In cultivo, demostramos que la Fracción D es capaz de actuar sobre células tumorales mamarias, modulando su perfil de expresión génica y afectando diferentes procesos celulares cuya desregulación está implicada en el desarrollo y progresión del cáncer. Particularmente, demostramos que la Fracción D disminuye la viabilidad de células tumorales mamarias hormono independientes (LM3, murinas) y triple negativas (MDA-MB-231, humanas), sin afectar la progresión del ciclo celular e induciendo apoptosis en la línea LM3. Demostramos también que la Fracción D disminuye la capacidad migratoria e invasiva de ambas líneas. En relación a esto, observamos que el proteoglucano aumenta la adhesión de las células tumorales al plástico y la expresión de E-cadherina en ellas. La Fracción D disminuyó la actividad de MMP-2 y MMP-9 secretada por las células tumorales. En relación con la motilidad celular, el proteoglucano afectó la organización del citoesqueleto de actina, disminuyendo el número de lamelipodios/filopodios en las LM3, y la presencia de fibras de estrés en las MDA-MB-231. Por otro lado, la Fracción D presentó un efecto

diferencial sobre la viabilidad de células mamarias no malignas (HC11, murinas) afectándolas en menor medida que a su contraparte tumoral. La migración de estas células resultó disminuida por el proteoglicano, mientras la capacidad invasiva no reportó cambios.

In vivo, en un modelo murino de trasplante singenico de células LM3 demostramos que el tratamiento con la Fracción D disminuye la carga tumoral y el número de metástasis pulmonares. La reducción del tamaño tumoral fue acompañada de un incremento de la expresión de Bax, sin registrar cambios el índice mitótico y la expresión de Ki-67. La Fracción D exhibió también un efecto protector en ratones BALB/c, retrasando y/o previniendo el desarrollo tumoral cuando fue aplicado en forma previa a la implantación de células LM3. En el caso de las células MDA-MB-231, los efectos antitumorales del proteoglicano observados *in cultivo* no pudieron ser fehacientemente corroborados *in vivo*.

En conjunto, los resultados de esta tesis apoyan el potencial empleo de la Fracción D de Maitake como agente terapéutico en cáncer de mama y dan muestra de su efecto sobre procesos celulares independientemente del sistema inmunológico por medio de los cuales el proteoglicano también estaría ejerciendo su efecto antitumoral.

ABSTRACT

D-Fraction is a proteoglycan extracted from the edible mushroom *Grifola frondosa* (Maitake). There is evidence that D-Fraction has antitumoral effects over different stages of tumor progression. However, these effects have been poorly investigated in breast cancer. In this context, we propose to investigate the potential therapeutic effects of D-Fraction in this type of cancer.

The antitumoral effect of D-Fraction has long been traditionally attributed to their immunostimulatory capacity. However, in recent years evidence emerged showing that this proteoglycan could act, independently of the immune system, on certain tumor cells types. For this reason, we propose to identify the cellular and molecular mechanisms by which D-Fraction could exert an immune system-independent antitumoral effect in breast cancer.

In culture, we showed that D-Fraction is capable of acting on breast tumor cells by modulating their gene expression profile and by affecting different cellular processes whose dysregulation is implicated in the development and progression of cancer. In particular, we demonstrated that D-Fraction decreases the viability of murine hormone-independent LM3 and human triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells, without affecting cell cycle progression but rather by inducing apoptosis in LM3 cell line. We also demonstrated that D-Fraction decreases the migratory and invasive capability of both tumor lines. In relation with this, we observed that the proteoglycan increases breast cancer cell plastic adhesion and also the expression of E-cadherin in them. D-Fraction decreases the activity of MMP-2 and MMP-9 secreted by tumor cells. In association with cell motility, the proteoglycan affected the actin cytoskeleton organization by decreasing the number of lamellipodia/filopodia in LM3 cells, and the presence of stress fibers in MDA-MB-231 cells. On the other hand, D-Fraction showed a differential effect on the viability of non-malignant breast cells HC11 (murine cells) affecting it to a lesser extent than their tumor counterparts. The HC11 cell migration was decreased by the proteoglycan's treatment while their invasive capability was unchanged.

In vivo, in a murine model of syngeneic transplantation with LM3 cells, we demonstrated that D-Fraction treatment reduces tumor burden and the number of lung metastases. The reduction of tumor size was accompanied by an increase in the expression of Bax and not significant changes in the mitotic index and expression of Ki-67 were observed. D-Fraction also showed a protective effect in BALB/c mice by delaying and/or preventing tumor growth when it was applied before the implantation of LM3 cells. The antitumoral effects of the proteoglycan on MDA-MB-231 cells observed *in culture* could not be conclusively corroborated *in vivo*.

Together, the results obtained in this thesis support the potential use of Maitake D-Fraction as a therapeutic agent in breast cancer and they demonstrate the effect of D-Fraction on cellular processes, independently of the immune system action, by means of which the proteoglycan would also exert its antitumor effect.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Director de Tesis

Dr. Alejandro C. Curino

ABREVIATURAS

A	Amperio
aaARN	ARN amplificado
AB	Avidina biotina
ADN _C	Ácido desoxirribonucleico complementario
APM	Alto peso molecular
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
AV	Anexina V-FITC
BPM	Bajo peso molecular
BSA	Albúmina de suero bovino
C3	Componente 3 del complemento
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAV1	Caveolina 1
CD	Células dendríticas
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CE	Células esplénicas
CO ₂	Dióxido de carbono
CR3	Receptor del complemento tipo 3
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos tri-fosfatados
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis</i>
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
h	horas
H&E	Hematoxilina y eosina
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico

HDAC	Histona deacetilasa
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacil]-etanosulfónico
HER2/Neu/ErbB2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
Hg	Mercurio
His	Histidina
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
iC3b	Fragmento grande de C3, inactivo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50 o media
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintetasa
IP	Ioduro de propidio
IRS	Score inmunoreactivo
K	Potasio
kDa	kiloDalton
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
LTh	Linfocito T colaborador
3-MCA	Metilcolantreno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasa
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NDBA	N-nitrosodi-n-butilamina
NEQ	Nuevas Entidades Químicas
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
nm	Nanómetro
p21 ^{WAF1}	Inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina
p27 ^{kip1}	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PFA	Paraformaldehído
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
R	Expresión relativa del gen
RB	Reactivo de Bradford
RE	Receptor de estrógeno
RH	Receptor hormonal
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Buffer salino de citrato de sodio
T ₂	Tiempo de duplicación celular
TBS	Buffer Tris salino
TEM	Transición Epitelio-Mesenquimática
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TLR	Receptor <i>toll-like</i>
TN	Triple negativo
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNM	Tumor-Nódulo-Metástasis
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
Trp	Triptófano
V	Voltio
VC	Vitamina C
VK ₃	Vitamina K3
WB	Western blot
WST-1	4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno

ÍNDICE

PREFACIO	2
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	11
ÍNDICE	14
INTRODUCCIÓN	18
I- Cáncer	19
I.I- Generalidades	19
I.II- Epidemiología	22
I.III- Carcinoma mamario	25
II- Productos naturales como fuente de nuevas drogas	27
II.I- Hongos como fuente de metabolitos bioactivos	29
II.II- β -glucanos	31
III- Grifola frondosa (Maitake)	36
III.I- Fracción D de Maitake	37
III.II- Toxicidad de la Fracción D	38
IV- Fracción D de Maitake y cáncer	39
V- Efecto antitumoral de la Fracción D a través del sistema inmune	41
V.I- Efecto de la Fracción D sobre el sistema inmune innato	41
V.II- Efecto de la Fracción D sobre el sistema inmune adaptativo	43
VI- Efecto antitumoral de la Fracción D independiente del sistema inmune	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
I- Hipótesis	50
II- Objetivo general	50
III- Objetivos específicos	50
MATERIALES Y MÉTODOS	53
I- Fracción D de Maitake	54
II- Vehículo de la Fracción D de Maitake	54
III- Líneas celulares	54
IV- Microarreglos de ADNc	55
IV.I- Aislamiento de ARN total	55
IV.II- Amplificación del ARN utilizando PCR	56

IV.III- Síntesis y marcaje del ADNc.	56
IV.IV- Purificación de la sonda e incorporación del fluoróforo.	57
IV.V- Hibridación y lavado de los microarreglos de ADNc.....	57
IV.VI- Escaneo del microarreglo y análisis.	58
V- Ensayo de viabilidad celular.	58
V.I- Conteo celular en cámara de Neubauer.	59
V.II- Ensayo colorimétrico de WST-1.	59
VI- Tiempo de duplicación celular.	60
VII- Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.	61
VIII- Análisis de apoptosis.....	62
VIII.I- Por microscopía de fluorescencia.....	62
VIII.II- Por citometría de flujo.....	62
IX- Ensayo de migración celular.	63
X- Zimografía.	64
XI- Ensayo de adhesión celular.	66
XII- Ensayo de invasión celular.....	67
XIII- Inmunofluorescencia.	68
XIII.I- Preparación de las muestras.	68
XIII.II- Microscopía.	68
XIV- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y <i>Western Blot</i> . ..	69
XIV.I- Preparación de los lisados celulares.	69
XIV.II- Medición de la concentración de proteínas.	69
XIV.III- Preparación de las muestras.....	70
XIV.IV- Electroforesis.	70
XIV.V- Transferencia a membrana de PVDF.	71
XIV.VI- Inmunodetección de proteínas.....	72
XV- Modelo murino de xenotrasplante con células MDA-MB-231.	73
XV.I- Diseño experimental: estudio del efecto antitumoral de la Fracción D sobre tumores establecidos.	73
XVI- Modelo murino de trasplante singenético con células LM3.....	74
XVI.I- Diseño experimental: estudio del efecto antitumoral de la Fracción D sobre tumores establecidos.	75
XVI.II- Diseño experimental: estudio del efecto preventivo de la Fracción D.....	76
XVII- Procesamiento de pulmones para cuantificación de metástasis.....	77
XVIII- Técnicas histológicas.....	78
XVIII.I- Procesamiento de órganos y tumores para histología.	78
XVIII.II- Coloración con Hematoxilina-Eosina.....	78

XVIII.III- Coloración Tricrómico de Masson.....	79
XVIII.IV- Evaluación del índice mitótico.....	80
XVIII.V- Inmunohistoquímica.....	81
XVIII.V.I- Evaluación de la inmunomarcación.....	82
XIX- Análisis estadístico.....	82
RESULTADOS.....	84
Capítulo I- La Fracción D modula la expresión génica de células tumorales.....	85
I.I- Análisis de la expresión génica inducida por la Fracción D en células tumorales.....	86
Capítulo II- Efectos de la Fracción D sobre los sellos distintivos del cáncer.....	92
II.I- Efecto de la Fracción D sobre la viabilidad celular.....	93
II.I.I- Estudio en células de adenocarcinoma mamario.....	93
II.I.II- Estudio en células mamarias no malignas.....	96
II.II- Efecto de la Fracción D sobre la progresión del ciclo celular.....	98
II.III- Efecto de la Fracción D sobre la muerte celular.....	102
II.IV- Efecto de la Fracción D sobre la capacidad celular metastásica.....	104
II.IV.I- Efecto de la Fracción D sobre la migración celular.....	104
II.IV.I.I- Estudio en células de adenocarcinoma mamario.....	104
II.IV.I.II- Estudio en células mamarias no malignas.....	107
II.IV.II- Efecto de la Fracción D sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.....	108
II.IV.III- Efecto de la Fracción D sobre la degradación de la matriz extracelular.....	112
II.IV.IV- Efecto de la Fracción D sobre la adhesión celular.....	114
II.IV.V- Efecto de la Fracción D sobre la invasión celular.....	117
II.IV.V.I- Estudio en células de adenocarcinoma mamario.....	117
II.IV.V.II- Estudio en células mamarias no malignas.....	119
Capítulo III- La Fracción D y sus efectos antitumorales <i>in vivo</i>.....	121
III.I- Efecto de la Fracción D sobre un modelo de xenotrasplante con células MDA-MB-231.....	122
III.II- Efecto de la Fracción D sobre un modelo de trasplante singenético con células LM3.....	125
III.II.I- Efecto antitumoral de la Fracción D sobre tumores mamarios establecidos.....	125
III.II.I.I- Evaluación de signos de toxicidad e inmunestimulación.....	132
III.II.II- Efecto de la Fracción D en la prevención del desarrollo tumoral mamario.....	135

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	138
BIBLIOGRAFÍA	150
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS	164
I- Publicaciones.	165
II- Presentaciones a congresos.	165

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I- Cáncer.

I.I- Generalidades.

Cáncer es un término genérico que designa un amplio y complejo grupo de enfermedades que pueden originarse en prácticamente cualquier parte del organismo. A grandes rasgos, se puede decir que el cáncer es el crecimiento anormal de células que tienden a proliferar descontroladamente y, en algunos casos, metastatizar (*National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line)*, 2016).

Existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, denominados generalmente en función al órgano o tejido en el cual se desarrollan (*National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line)*, 2016). Pese a la diversidad y complejidad de la enfermedad se han podido establecer los principios que gobiernan la transformación de una célula normal en una maligna. A lo largo del proceso de transformación, la célula va adquiriendo capacidades biológicas distintivas y complementarias, conocidas como sellos o “*hallmarks*” del cáncer, que le permiten establecer un tumor y diseminarse metastásicamente (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). Originalmente, se describieron seis capacidades adquiridas (Figura 1): 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). Posteriormente, se propuso la incorporación de dos nuevas capacidades a la lista de los seis sellos del cáncer. La primera de ellas implica la reprogramación del metabolismo energético, necesaria para soportar la continua proliferación celular. La segunda involucra la evasión del ataque y destrucción por parte del sistema inmune, mediante la activación de mecanismos de escape inmunológico (Hanahan & Weinberg, 2011). Dado que estas dos últimas capacidades fueron

las más recientes en incorporarse a la lista de los sellos del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011) se la reconoce como sellos emergentes del cáncer (Figura 1).

Adicionalmente, existen dos características que facilitan la adquisición de los ocho sellos del cáncer y por lo cual se las denomina características facilitadoras. Una de ellas es la inestabilidad genómica y la mutación de las células neoplásicas, fuente creadora de las variantes genéticas que orquestan las distintas capacidades. La segunda característica facilitadora es la inflamación, estado que suplementa al microambiente tumoral con moléculas bioactivas: factores de crecimiento, de supervivencia, proangiogénicos, entre otros, que promueven la adquisición de los sellos del cáncer (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

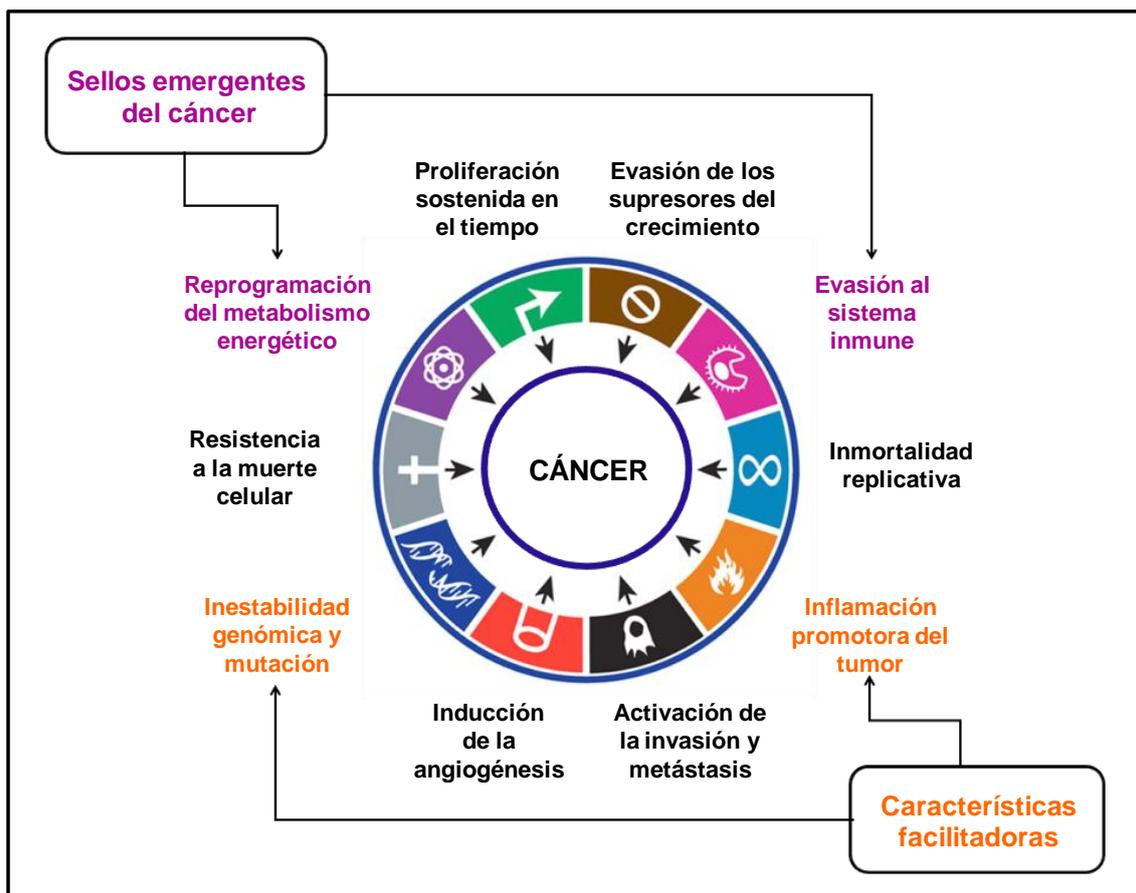


Figura 1. Los “sellos” del cáncer. Las seis capacidades distintivas adquiridas por la células neoplásicas originalmente propuestas en el año 2000, junto a las dos capacidades emergentes y las dos características facilitadoras propuestas en el año 2011. Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Es importante tener en cuenta que si bien las ocho capacidades mencionadas anteriormente son adquiridas durante el proceso tumorigénico de prácticamente todo tipo de tumor, la diversidad y complejidad se presenta en relación al mecanismo molecular que promueve la capacidad adquirida y al momento en que ocurre dicha adquisición (Hanahan & Weinberg, 2011). Más aún, para comprender correctamente la biología del cáncer es necesario incorporar una nueva dimensión de complejidad. Para esto, los tumores no deben ser vistos simplemente como un grupo relativamente homogéneo de células cancerosas (visión reduccionista), sino que deben ser considerados como tejidos complejos, compuestos por diferentes tipos de células que interactúan heterotípicamente dentro del microambiente tumoral (Figura 2) (Hanahan & Weinberg, 2011).

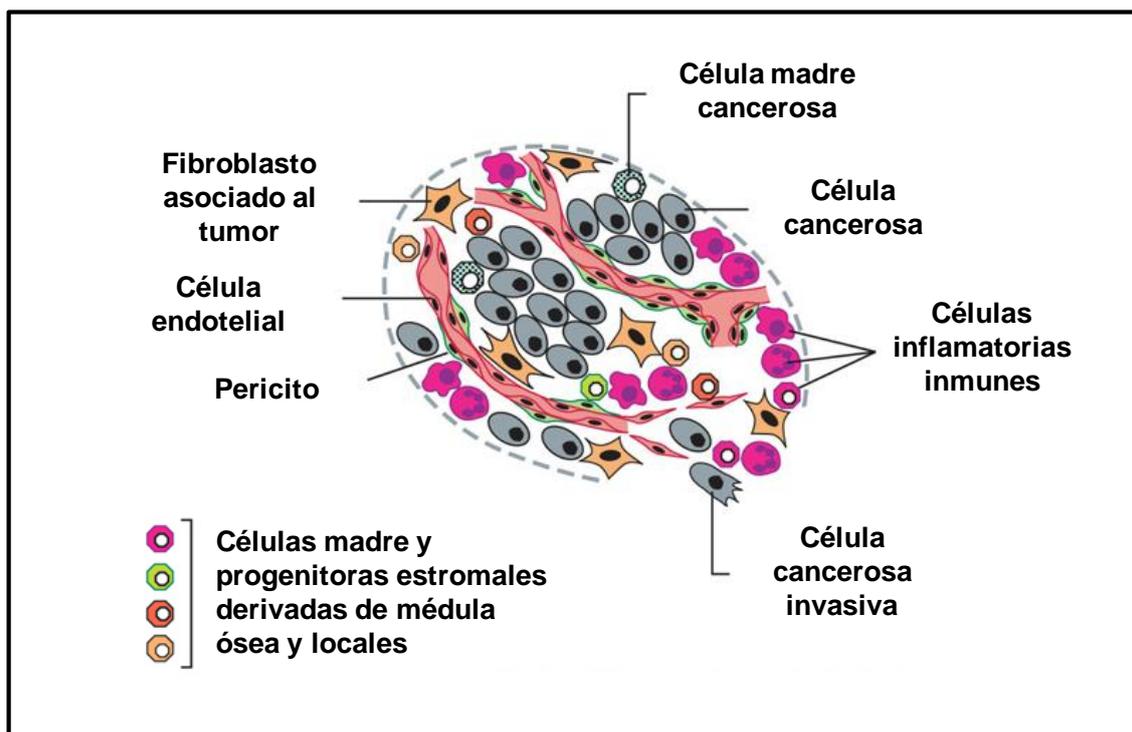


Figura 2. Células del microambiente tumoral. Distintos tipos de células presentes tanto en parénquima como en el estroma tumoral colectivamente cooperan con el desarrollo y progresión del tumor. Tomado y adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Desde la década pasada, la importancia del microambiente tumoral ha ido ganando cada vez mayor aceptación. Actualmente, su importancia es tal, que se considera que las células cancerosas por si solas no son capaces de manifestar la enfermedad. Necesariamente requieren del reclutamiento de

células normales que contribuyan a la “sociedad de células” que se encuentra fuera de la ley. Es así como las células del estroma tumoral establecen interacciones de cooperación-colaboración con las células cancerosas, contribuyendo con prácticamente las ocho capacidades adquiridas (Figura 3) e influyendo sobre el fenotipo tumoral (Hanahan & Coussens, 2012).

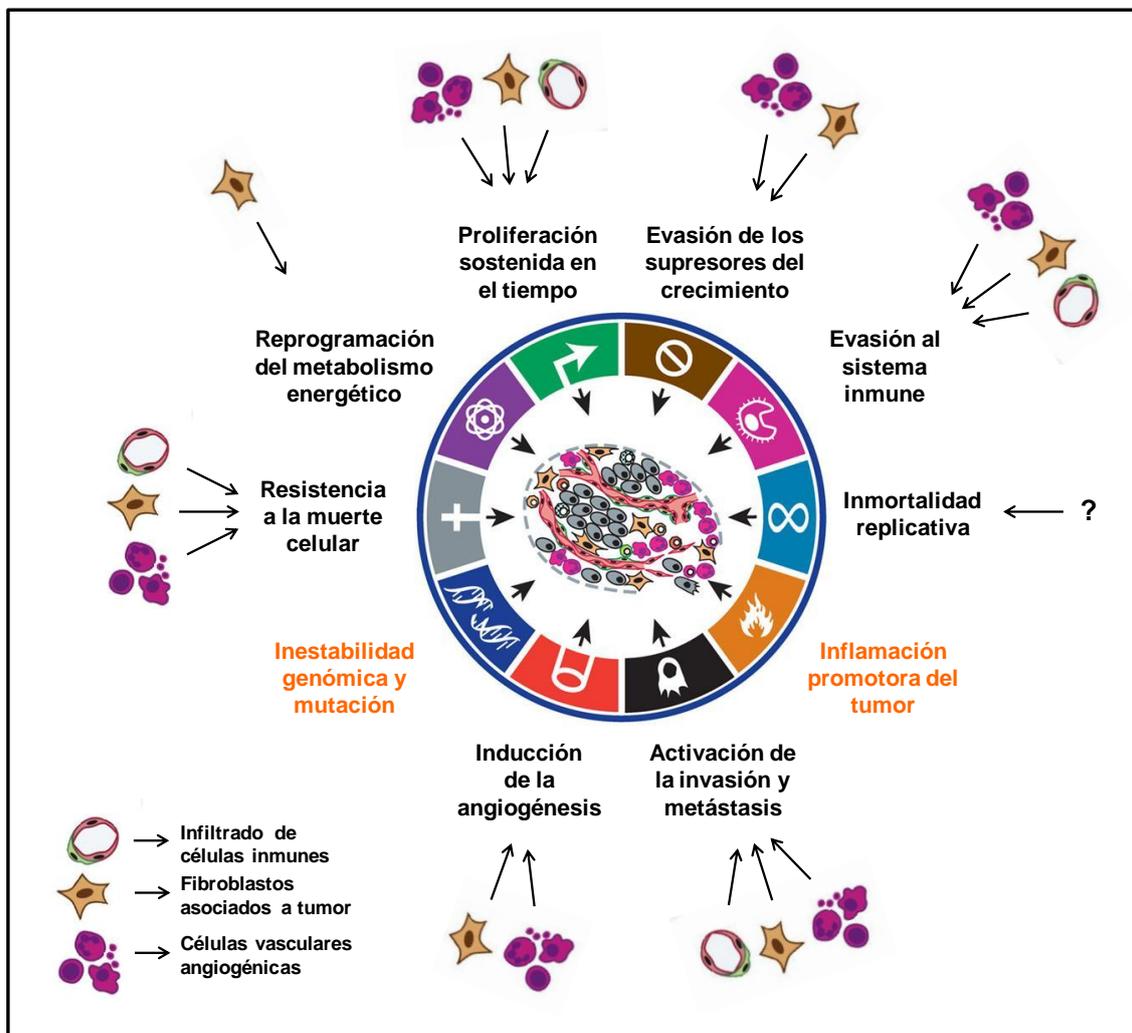


Figura 3. Contribuciones multifactoriales de células del microambiente tumoral reclutadas/activadas sobre los “hallmarks” del cáncer. De las ocho capacidades adquiridas por las células tumorales, se ha demostrado que siete de ellas reciben contribución de las células del microambiente tumoral. Tomado y adaptado de Hanahan & Coussens, 2012.

I.II- Epidemiología.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (más conocida por sus siglas IARC, en inglés) en su proyecto GLOBOCAN 2012

(IARC, GLOBOCAN 2012), estima que a nivel mundial durante el año 2012 se han producido 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y que 32,6 millones de personas viven con cáncer (dentro de los 5 años del diagnóstico).

Al evaluar la incidencia y mortalidad mundial en función a los distintos tipos de cáncer (Figura 4) se observa que en las mujeres, el tipo de cáncer que se diagnostica con mayor frecuencia y que a su vez es la principal causa de muerte por cáncer es el cáncer de mama. En el caso de los hombres, el cáncer de pulmón es el que presenta la mayor incidencia y mortalidad (IARC, GLOBOCAN 2012).

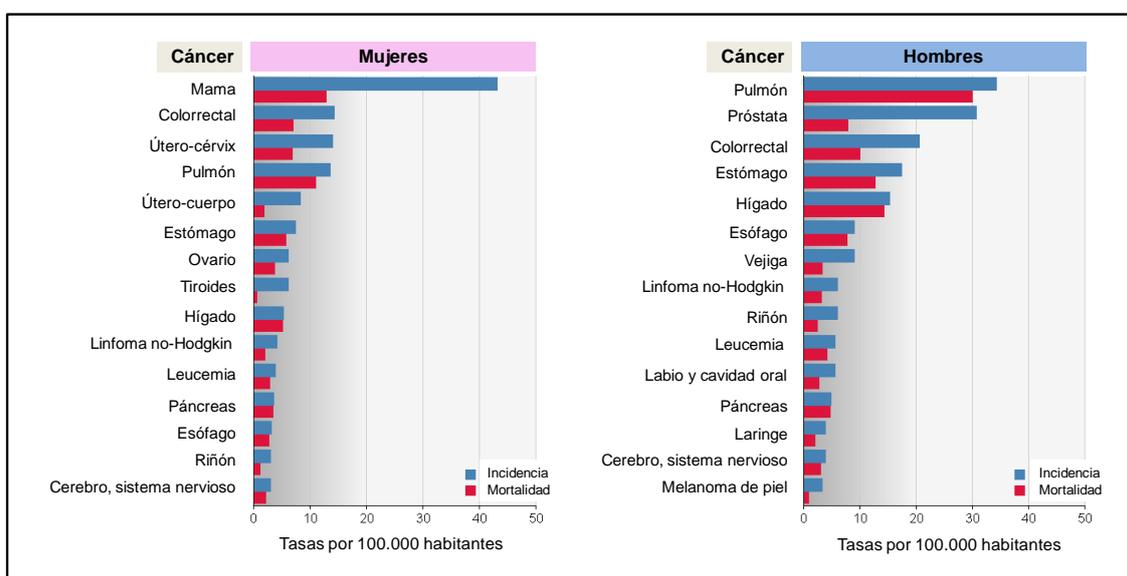


Figura 4. Tasas mundiales de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad para mujeres y hombres. Número de nuevos casos o muertes estimadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2012. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3 - 242,9 x 100.000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones obtenidas por el IARC para el año 2012 (Figura 5).

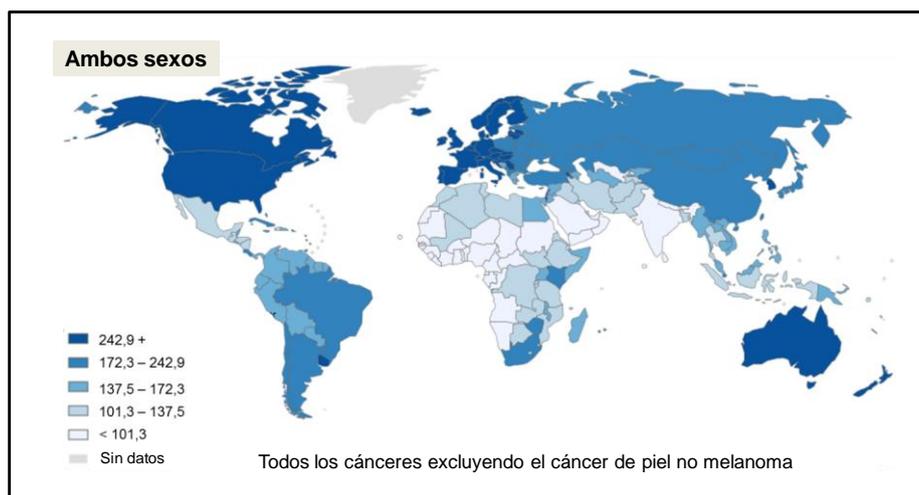


Figura 5: Incidencia de cáncer mundial en el año 2012. Tasas estandarizadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2012. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

Al igual que a nivel mundial, en la población femenina de Argentina el tipo de cáncer que presenta la mayor incidencia (alejándose notablemente del resto) es el cáncer de mama, con una tasa estimada de 71,2 nuevos casos por 100.000 mujeres durante el año 2012. El cáncer de mama también es el principal responsable de muerte por cáncer entre las mujeres de nuestro país (Figura 6). En cuanto a la población masculina de Argentina, la mayor tasa de incidencia corresponde al cáncer de próstata, pero es el de pulmón el cáncer con mayor mortalidad (Figura 6) (IARC, GLOBOCAN 2012).

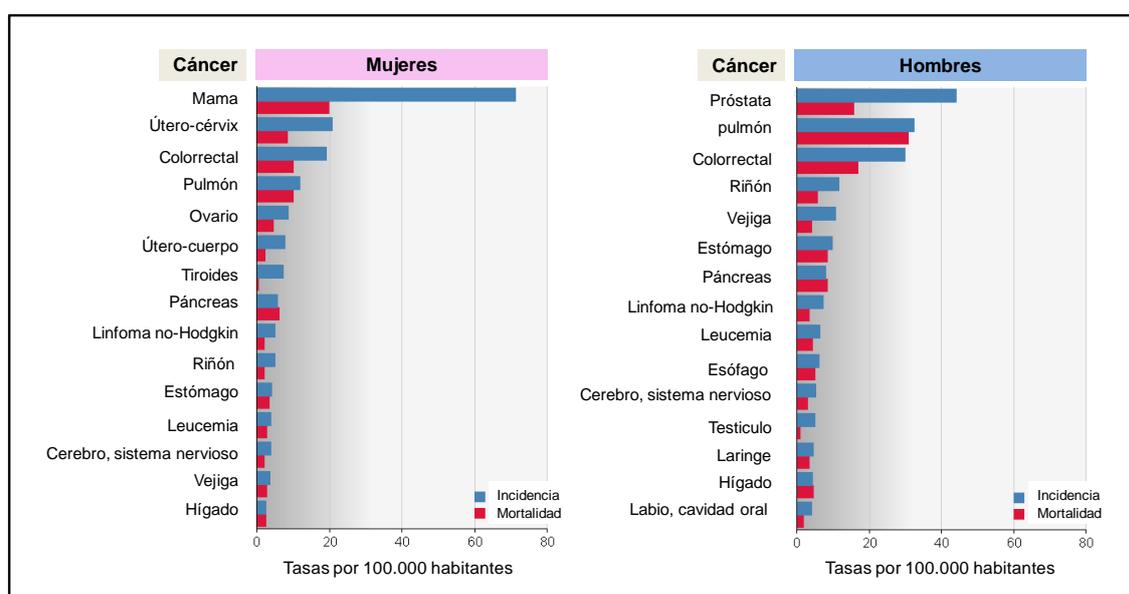


Figura 6. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad para mujeres y hom-

bres en Argentina. Número de nuevos casos o muertes estimadas por cada 100.000 habitantes durante el año 2012. Proyecto GLOBOCAN 2012. Tomado y adaptado de <http://globocan.iarc.fr/>.

I.III- Carcinoma mamario.

Tal como se describió anteriormente, el cáncer de mama es el de mayor incidencia, mortalidad y prevalencia entre las mujeres a nivel mundial (IARC, GLOBOCAN 2012). Anualmente en nuestro país se producen 5.400 muertes por esta enfermedad y se estima que se producirán 18.000 nuevos casos por año, lo cual representa el 17,8 % del total de incidencia de cáncer en Argentina. Estos datos muestran la necesidad de continuar investigando la biología de dicha patología.

El cáncer de mama se origina en la unidad ducto-lobulillar de la glándula mamaria. Es una patología heterogénea, compleja y multifacética que incluye una gran variedad de lesiones con distinto origen celular, alteraciones moleculares, etiologías y atributos clínicos (Lanari et al, 2012). En este contexto, distintos sistemas de clasificación son utilizados para establecer el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, y como guía para la elección del tratamiento (Liefers & Tollenaar, 2002).

Los sistemas de clasificación tradicionales para los carcinomas mamarios son el sistema TNM, la clasificación histopatológica y la clasificación molecular:

El sistema TNM incluye el tamaño del tumor primario (T), el compromiso de los ganglios linfáticos (N) y la extensión de metástasis (M) (Edge & Compton, 2010). A cada letra se añade un número para indicar el tamaño o extensión del tumor primario y el grado de diseminación del cáncer.

El sistema histopatológico, clasifica a los carcinomas mamarios en carcinomas ductales o lobulillares, dependiendo del lugar de la glándula mamaria en el que se originan. A su vez, estos se clasifican en carcinomas *in*

situ o invasivos, en función de la capacidad de las células tumorales de atravesar la membrana basal. Los carcinomas ductales invasivos son además subclasificados según su grado histológico, nuclear y mitótico. El grado histológico cuantifica la proporción de estructuras glandulares tubulares. El grado nuclear tiene en cuenta la atipia nuclear y el grado mitótico tiene presente la cantidad de mitosis. Estos tres *scores* son combinados para dar el Grado I (bien diferenciado); Grado II (moderadamente diferenciado) y Grado III (pobrementemente diferenciado) (NouNou et al, 2015).

En cuanto a la clasificación molecular, los marcadores comúnmente utilizados en la práctica clínica son: el receptor hormonal de estrógeno (RE) y de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/Neu/ErbB2) (Rakha et al, 2010). La clasificación se lleva a cabo en base a la presencia o ausencia de estos receptores (Carlson et al, 2009). Bajo esta clasificación, el 70 % de los carcinomas mamarios expresa RE y RP, aproximadamente el 20 % sobreexpresa HER2 y el 10 % no expresa ninguno de estos tres receptores, por lo cual son conocidos como triple negativos (TN).

A su vez, en los últimos años, el estudio de los perfiles de expresión génica de estos tumores (Perou et al, 2000; Sørlie et al, 2001) permitió establecer una nueva clasificación del carcinoma mamario en los siguientes subtipos moleculares:

Subtipo luminal: son tumores positivos para receptores hormonales (RH: estrógeno y progesterona), expresan citoqueratinas luminales 5-8-18. Se subdividen en luminal A (HER2-, de bajo índice de proliferación), luminal B (HER2-, de alto índice de proliferación) y luminal HER2+.

Subtipo basal (*basal like*): son tumores RH- y HER2-, expresan citoqueratinas 5-6-17 junto con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), c-Kit, FOXC1.

Subtipo HER2: son tumores con alta expresión de HER2 y RH-.

Subtipo *normal-like*: son tumores con alta expresión de genes asociados al tejido adiposo y a otros tipos celulares estromales.

Actualmente, el cáncer de mama es tratado mediante la combinación de cirugía, terapia por radiación, quimioterapia y terapia endócrina (Nounou et al, 2015). Como dijimos anteriormente, la clasificación del tumor es determinante a la hora de establecer la terapia a aplicar. En este contexto, es importante destacar que los tumores mamarios que carecen de RE y RP y más aún los TN son los que presentan una terapia más limitada (Chavez et al, 2010). Es por ello, la necesidad de desarrollar nuevas drogas que resulten efectivas para el tratamiento de estos tipos de tumores mamarios.

II- Productos naturales como fuente de nuevas drogas.

Desde los primeros tiempos el hombre ha explorado la naturaleza en busca de sustancias que le permitieran calmar su dolor, aliviar los síntomas de sus enfermedades o bien le ayudaran en la obtención de su alimento y en sus relaciones sociales y religiosas. Tal búsqueda, que en sus comienzos no se refería a una disciplina, actualmente es conocida como bioprospección.

La bioprospección (del griego βίο: vida, y del latín prospectio: exploración) es el estudio de la naturaleza con el fin de identificar organismos y sustancias que resulten beneficiosos para el ser humano. Particularmente, en lo que respecta al descubrimiento de sustancias aplicables a la medicina la bioprospección ha resultado sumamente exitosa. Es así como gran parte de las drogas con efectos terapéuticos son de origen natural o sintetizadas imitando productos naturales (Eisner & Niemeyer, 1996; Newman & Cragg, 2007).

En relación a las drogas antitumorales, durante el período 1940-2010 la Administración de Medicamentos y Alimentos (conocida por sus siglas en inglés como FDA) y organizaciones afines aprobaron para su aplicación clínica 206 Nuevas Entidades Químicas (NEQ). Al evaluar el origen de cada una de ellas (Figura 7) se observa que el 13 % son productos biológicos (fabricados mediante el empleo de organismos vivos como soporte de producción) (B), otro

13 % son productos naturales (N), el 28 % son derivados de un producto natural con alguna modificación semi-sintética (ND), el 21 % son drogas totalmente sintéticas (S), el 9 % son copias sintéticas de un producto natural (S/NM), el 10 % son sintéticos excepto a nivel del farmacóforo que es natural (S*), un 4 % son totalmente sintéticos pero con el farmacóforo copiado de un producto natural (S*/NM) y el 2 % restante corresponde a las vacunas (V) (Newman & Cragg, 2012).

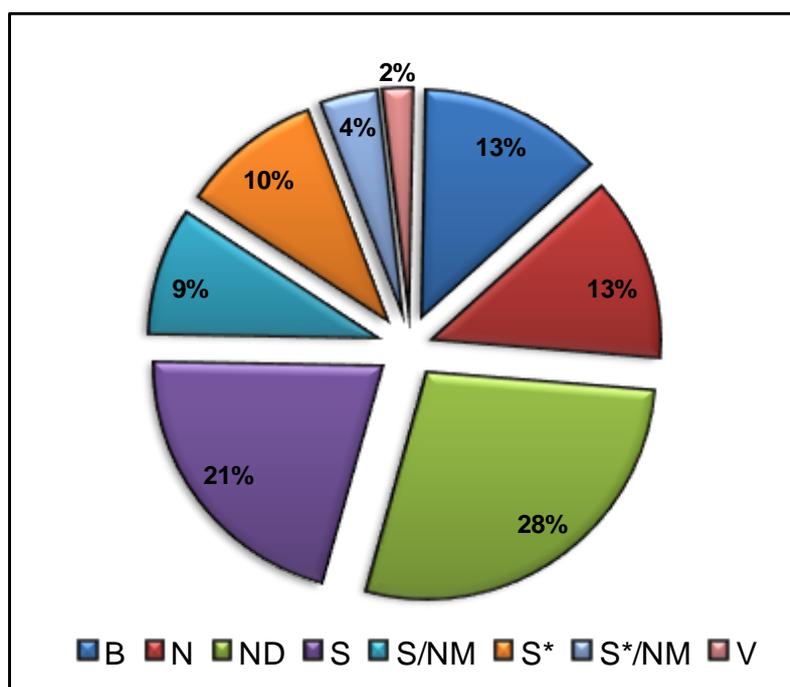


Figura 7. Drogas antitumorales aprobadas para su aplicación (1940-2010) agrupadas en función a su origen (N=206). B= biológico, N= natural, ND= derivado de un N, S= sintético, S/NM= S imitando a un N, S*= S pero con farmacóforo N, S*/NM= S* imitando a un N y V= vacunas. Tomado y adaptado de Newman & Cragg, 2012.

De esta manera, se puede ver que de los 206 agentes antitumorales aprobados para su aplicación durante el período 1940-2010, el 64% (N, ND, S/NM, S* y S*/NM) son directamente productos naturales o están inspirados en, o copiados de, compuestos de la naturaleza. Estas cifras evidencian la importancia y el grado de participación que tienen los compuestos naturales en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

II.I- Hongos como fuente de metabolitos bioactivos.

Para que una especie natural sea considerada como potencial fuente de compuestos medicinales debe cumplir con ciertos criterios: 1) ser abundante en la naturaleza, 2) existir evidencia de su uso tradicional por las comunidades indígenas, 3) presentar un desarrollo sustentable y 4) tener potencialidad para producir metabolitos secundarios (Ferreira et al, 2010).

Muchas especies del reino Fungi cumplen ampliamente con cada uno de los puntos mencionados. El criterio 1) resulta inapropiado de generalizar, ya que no sólo depende de las características intrínsecas de la especie, sino también de las características de su ambiente natural en un momento determinado. Con respecto al criterio 2) muchas especies de hongos han sido utilizadas desde hace siglos por la medicina oriental, especialmente en países como China, India, Japón y Corea (Lull et al, 2005; De Silva et al, 2012). Las especies tradicionalmente empleadas para el tratamiento de diversas enfermedades incluye a: *Grifola frondosa*, *Cordyceps* spp., *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes* y *Piptoporus betulinus* (De Silva et al, 2012). En la cultura occidental, el consumo de hongos, tanto por su valor nutricional como por sus aspectos medicinales, está ganando cada vez mayor aceptación (Konno, 2009). 3) el desarrollo sustentable de muchas especies de hongos se puede alcanzar gracias al rápido crecimiento de los cuerpos fructíferos y a la posibilidad de ser cultivados en sustratos artificiales o mediante cultivo sumergido (Ferreira et al, 2010). Por último, con respecto al criterio 4) una enorme variedad de compuestos derivados del metabolismo secundario y primario de numerosas especies de hongos han sido descritos (Patel & Goyal, 2012). Todo esto, convierte a muchas especies del Reino Fungi en potenciales fuentes de exploración para el descubrimiento o desarrollo de nuevas drogas.

La diversidad de metabolitos bioactivos presente en los hongos medicinales puede clasificarse en dos categorías: metabolitos de bajo peso molecular (BPM) y metabolitos de alto peso molecular (APM), tal como se resume en la Figura 8. Los metabolitos de BPM son derivados del metabolismo

secundario del hongo, por lo que no están implicados en el metabolismo central del organismo. Contrariamente, los metabolitos de APM son producidos a través del metabolismo primario del hongo y resultan esenciales para su continuo crecimiento y producción de biomasa (Ferreira et al, 2010; De Silva et al, 2012).

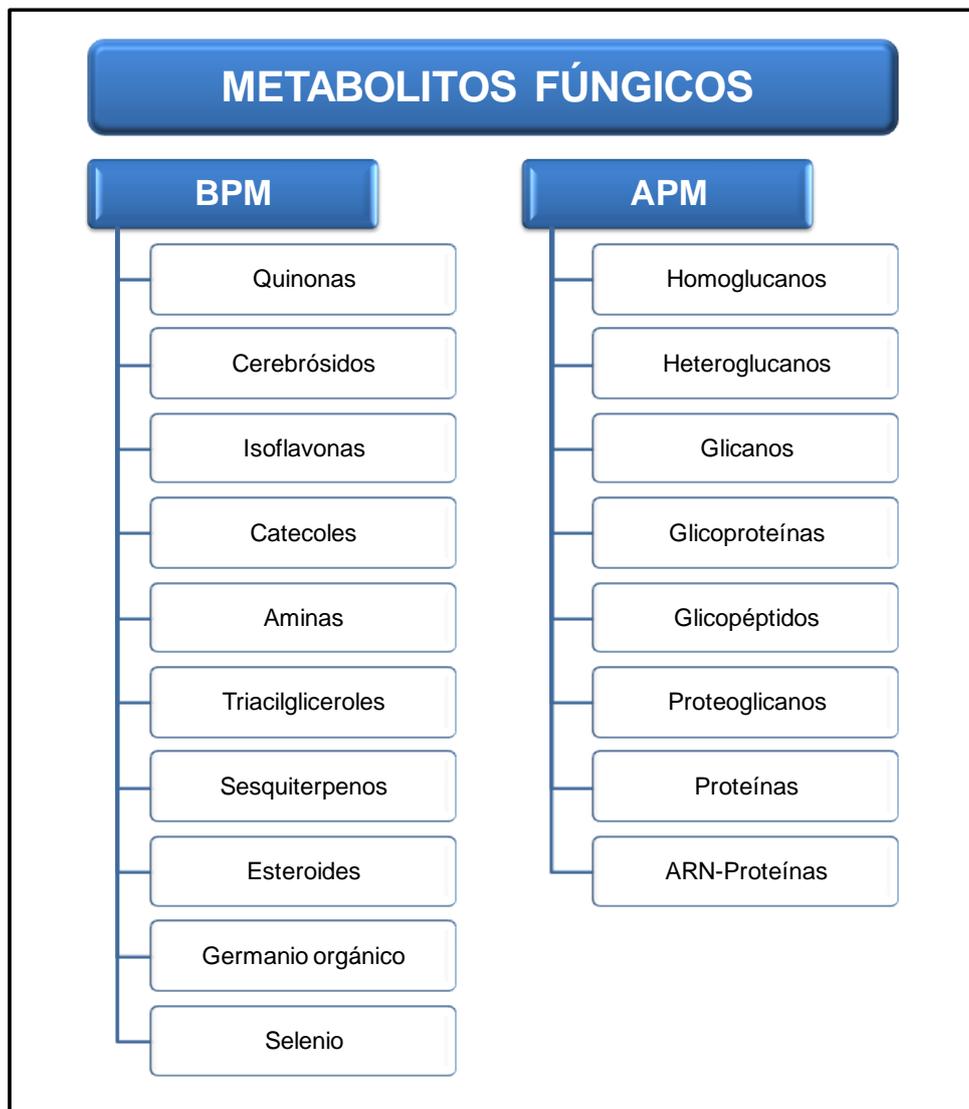


Figura 8. Metabolitos bioactivos obtenidos a partir de los hongos. BPM= metabolitos de bajo peso molecular y APM= metabolitos de alto peso molecular. Tomado y adaptado de Ferreira et al, 2010.

II.II- β -glucanos.

Los glucanos son polisacáridos compuestos exclusivamente por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos. Estos enlaces pueden ser de dos tipos: α o β , dando origen así a los α -glucanos o β -glucanos respectivamente (Figura 9) (Ferreira et al, 2010; De Silva et al, 2012). De ellos, los β -glucanos son los que presentan mayor potencial terapéutico (Ferreira et al, 2010).

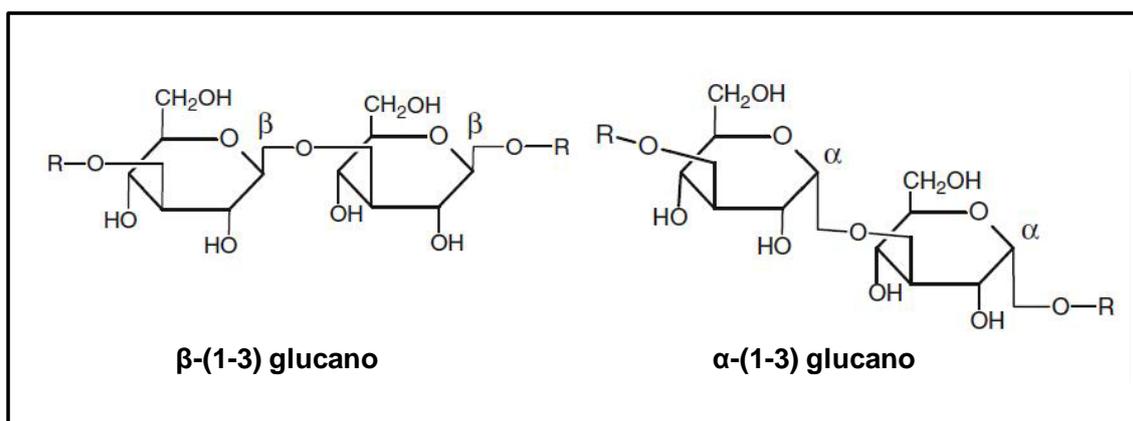


Figura 9. Representación esquemática de la estructura molecular de un β -glucano y α -glucano. Tomado de De Silva et al, 2012.

Naturalmente, los β -glucanos se encuentran presentes en la pared celular de diversos organismos, tales como: bacterias, hongos (tanto multicelulares como levaduras) y plantas (principalmente cereales) (Pizarro et al, 2014). Su estructura macromolecular varía en función de la fuente de origen. Particularmente, es el tipo de enlace presente en la cadena principal y en las ramificaciones laterales lo que permite reconocer el origen del β -glucano (Figura 10) (Volman, 2009). Así, los β -glucanos de bacterias y cereales (avena, cebada y centeno) presentan cadenas lineales, no ramificadas, con uniones β -(1-3) en el caso de las bacterias y uniones β -(1-3)/ β -(1-4) en los cereales. Contrariamente, los β -glucanos de hongos multicelulares y levaduras presentan una cadena principal con enlaces β -(1-3) y ramificaciones laterales con enlace β -(1-6). La diferencia entre estos glucanos se encuentra en la longitud de dichas cadenas laterales, las cuales son más largas en las levaduras (Volman, 2009; Pizarro et al, 2014).

	Organismo	Estructura del β -glucano	Descripción de la estructura
	Bacteria		β - (1-3)-glucano lineal
	Hongo multicelular		β - (1-3)-glucano con ramificaciones β - (1-6) cortas
	Levadura		β - (1-3)-glucano con ramificaciones β - (1-6) largas
	Cereal		β - (1-3) / β - (1-4)- glucano lineal

Figura 10. Estructura de los β -glucanos provenientes de diversos grupos de organismos. Tomado y adaptado de Volman, 2009.

En líneas generales, los β -glucanos provenientes de cereales presentan propiedades beneficiosas de tipo metabólico, mientras que los procedentes de levaduras y hongos multicelulares muestran propiedades inmunoestimuladoras (Pizarro et al, 2014).

La actividad biológica de los β -glucanos se encuentra estrechamente relacionada con su peso molecular, estructura terciaria, carga eléctrica, solubilidad y conformación en solución. A su vez, todas estas características están influenciadas por la fuente de origen del β -glucano y el método de aislamiento utilizado (Volman, 2009). Se ha sugerido que un mayor peso molecular y mayor grado de complejidad estructural de los β -glucanos se correlaciona con un mayor potencial antitumoral y que los β -glucanos que contienen principalmente uniones 1-6 presentan menor actividad que aquellos

con cadena principal 1-3 y ramificaciones 1-6 (Ferreira et al, 2010; De Silva et al, 2012). Más aún, complejos de proteínas-glucanos presentan mayor actividad antitumoral que los glucanos libres (De Silva et al, 2012).

Los β -glucanos son polisacáridos no digeribles, por lo cual luego de su ingesta oral son fermentados, en distintos grados, por la microflora intestinal. Inicialmente, esto llevó a pensar que el efecto inmunomodulador de los β -glucanos era dependiente de la flora microbiana, pero al demostrarse que dichos polisacáridos eran capaces de unirse directamente a receptores de células inmunes, esta hipótesis quedó desechada. Del intestino delgado, los β -glucanos son capturados e internalizados por macrófagos intestinales presentes en las placas de Peyer (tejido linfoide asociado al tubo digestivo o GALT). Dentro de los macrófagos, los β -glucanos son degradados en pequeños fragmentos y transportados al bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. Los fragmentos de β -glucanos son luego liberados y tomados por neutrófilos, monocitos, células dendríticas y *natural killer* (NK), disparando una respuesta inmune. En la Figura 11 se muestra particularmente la inducción de la citotoxicidad mediada por células-dependiente de CR3, uno de los receptores de β -glucanos (descrito a continuación). Neutrófilos o NK con el β -glucano unido a su CR3 están aptos para ejercer citotoxicidad sobre células tumorales opsonizadas con iC3b, resultante de la activación del complemento vía anticuerpos antitumorales, naturales o monoclonales (Yan et al, 2005; Chan et al, 2009). Cuando los β -glucanos son administrados por vía intravenosa, serían reconocidos directamente por granulocitos y monocitos en circulación.

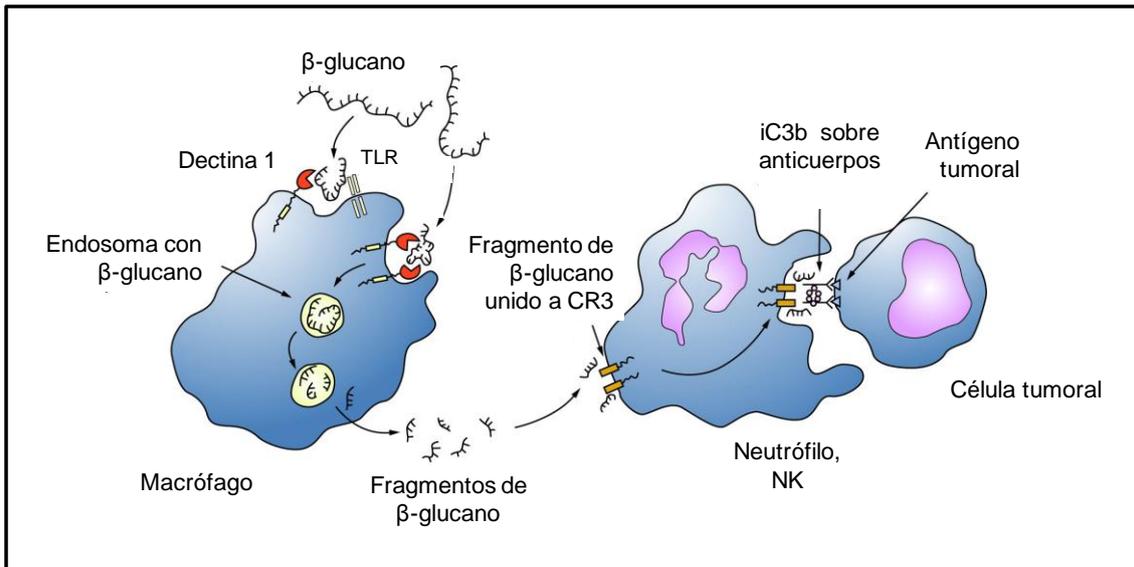


Figura 11. Acción de β -glucanos administrados por vía oral sobre las células inmunes. Tomado y adaptado de Chan et al, 2009. Como se describe a continuación, Dectina 1 y CR3 son dos de los cuatro receptores de β -glucanos. Receptores *toll-like* (TLR) colaboran con Dectina 1. iC3b = fragmento grande del componente 3 del complemento (C3), inactivo.

Dado que el organismo de los vertebrados no sintetiza naturalmente β -glucanos, cuando estos son administrados (independientemente de la vía), el organismo los reconoce como moléculas extrañas y dispara una respuesta inmune (De Silva et al, 2012). Tal respuesta esta mediada principalmente por receptores celulares de membrana. La actividad de estos receptores se ha identificado tanto en células inmunes como en células endoteliales, células del epitelio alveolar y fibroblastos (Brown & Gordon, 2005). Los receptores capaces de reconocen a los β -glucanos y mediar su actividad son (Figura 12):

- Receptor *scavenger*: expresado en células mieloides y algunas células endoteliales (Brown & Gordon, 2005).
- Receptor del complemento tipo 3 (CR3): altamente expresando en neutrófilos, monocitos y NK, y expresado en menor medida sobre macrófagos (Akramiene et al, 2007). Es su dominio extracelular tipo lectina el que posee el sitio de unión a β -glucanos. La activación del receptor por β -glucanos media la migración transendotelial del neutrófilo y participa de la citotoxicidad dependiente de CR3 de células tumorales opsonizadas con iC3b, producto de la activación del complemento vía

anticuerpos antitumorales, naturales o monoclonales (como se observó anteriormente en la Figura 11) (Hong et al, 2004; Brown & Gordon, 2005).

- Receptor lactosilceramida: se expresa en neutrófilos y células endoteliales. La interacción β -glucanos-lactosilceramida estimula el estallido oxidativo y las funciones antimicrobianas en los neutrófilos, induciendo la activación del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) (Brown & Gordon, 2005).
- Receptor dectina 1: expresado en células del linaje monocito/macrófago y en neutrófilos. Para su interacción con los β -glucanos, dos aminoácidos (Trp²²¹ e His²²³) ubicados en el dominio de reconocimiento a carbohidratos resultan críticos. Activado por β -glucanos, dectina-1 media diversas respuestas celulares tales como: fagocitosis, endocitosis, estallido oxidativo, producción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas, requiriendo para esta última función la colaboración de receptores *Toll-like* (TLR) (Brown & Gordon, 2005).

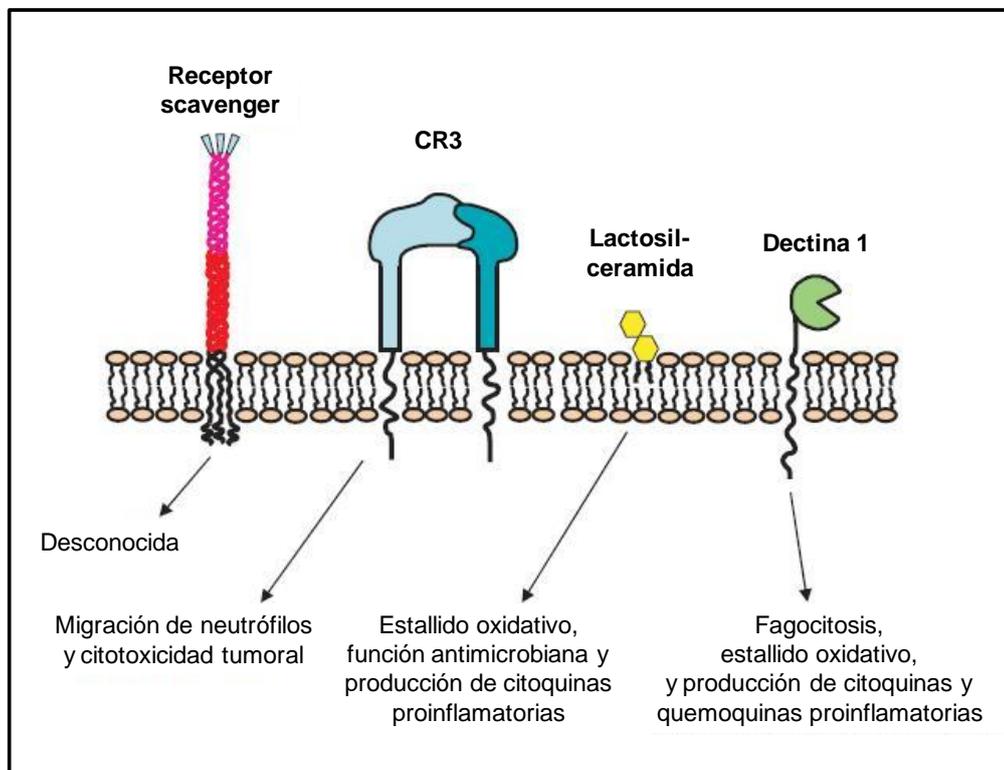


Figura 12. Receptores de β -glucanos presentes en vertebrados y funciones mediadas por cada uno de ellos. Tomado y adaptado de Brown & Gordon, 2005.

A través de los receptores mencionados, los β -glucanos actúan como potentes inmunomoduladores, activando tanto la inmunidad innata como adaptativa (Akramiene et al, 2007; Chan et al, 2009; De Silva et al, 2012). Es por esta capacidad que los β -glucanos son clasificados como agentes inmunomoduladores o modificadores de respuesta biológica (Lull et al, 2005).

III- *Grifola frondosa* (Maitake).

Grifola frondosa (Dicks.) Gray, es un Basidiomycete perteneciente a la familia Meripilaceae, del orden Polyporales, clase Agaromycete. Crece en la base de árboles vivos, particularmente coníferas y caducifolios, en los bosques templados del hemisferio norte (Illana-Esteban, 2008). En occidente se lo encuentra en Canadá y en el noreste de Estados Unidos, mientras que en oriente es nativo de China, noreste de Japón y Europa (Stamets, 2000).

Morfológicamente, *Grifola frondosa* es un hongo grande, cuyos basidiocarpos anuales pueden alcanzar 1 m de diámetro y varios kilos de peso (18-20 Kg). Los basidiocarpos son ramificados, formados por pequeños sombreros imbricados, con forma de abanico y de color marrón-gris oscuro en edad temprana, que viran a un gris más claro con la edad (Illana-Esteban, 2008; Stamets, 2000) (Figura 13).



Figura 13. *Grifola frondosa* (Maitake) creciendo en la base de un árbol. Tomado de http://en.wikipedia.org/wiki/Grifola_frondosa.

Grifola frondosa es conocido vulgarmente como Maitake, “hongo que baila” en japonés. El origen de este nombre tiene dos razones: una de ellas es el aspecto del hongo cuando sopla el viento, asemejándose a mariposas bailando. Mientras que la otra razón hace referencia al baile de alegría que la gente desplegaba al encontrarlo en los bosques. El aprecio hacia *G. frondosa* se remonta a cientos de años atrás en la cultura oriental, y la importancia adjudicada a este hongo era tal que durante la época feudal su peso podía ser cambiado por plata (Nanba, 1997).

III.I- Fracción D de Maitake.

A comienzos de 1980 en la Universidad Farmacéutica de Kobe, el micólogo japonés Hiroaki Nanba, estudiando diversos hongos medicinales, demostró que los polisacáridos del hongo Maitake presentaban una estructura única y con mayor poder antitumoral que los de otros hongos estudiados a la fecha (Mayell, 2001). Se comenzó entonces a realizar distintas extracciones de *Grifola frondosa* y testear su potencial inmunomodulador y antitumoral. En 1984, se identificó una fracción presente tanto en el micelio como en el cuerpo fructífero del Maitake, a la cual se denominó Fracción D (Mayell, 2001).

La Fracción D es una mezcla de β -glucanos (específicamente β -(1,3) y β -(1,6) glucanos) y proteínas, con un peso molecular de aproximadamente 1.000 kDa (Mayell, 2001). Recordando la Figura 8 en la cual se muestran los posibles metabolitos bioactivos encontrados en los hongos, se puede ver que la Fracción D corresponde a un metabolito de APM y dentro de ellos a un proteoglicano.

La particularidad que presenta la Fracción D es que contiene tanto β -glucanos de cadena principal 1,3 con ramificaciones 1,6; como β -glucanos de cadena principal 1,6 con alto grado de ramificaciones 1,3 (Mayell, 2001). Recordando que las características estructurales, moleculares, etc. de los β -glucanos influyen sobre su actividad biológica (Ferreira et al, 2010; De Silva et al, 2012), se ha sugerido que la combinación de β -(1,3) y β -(1,6)-glucanos, el

alto peso molecular, el alto grado de ramificación de las cadenas y las proteínas presentes le otorguen a la Fracción D la potente actividad biológica.

III.II- Toxicidad de la Fracción D.

Ensayos realizados en ratones para evaluar la potencial toxicidad de la Fracción D de Maitake demostraron la carencia de efectos adversos en estos animales (Nanba, 1997).

El primer ensayo clínico no randomizado en humanos, realizado en 1997, incluyó 165 pacientes, de entre 26 y 65 años de edad, con cáncer avanzado (estadio III-IV) de mama, pulmón, hígado, próstata, cerebro, páncreas, estómago, hueso o leucemia. Todos los pacientes ingirieron la Fracción D, un grupo de manera exclusiva y el otro en combinación con quimioterapia. La mayoría de los pacientes que ingirieron la Fracción D de Maitake reportaron una mejoría en sus síntomas clínicos generales, e incluso el 83 % de ellos informó una disminución del dolor. Ninguno reportó efectos secundarios/adversos. El tratamiento con la Fracción D disminuyó también los efectos adversos de la quimioterapia (falta de apetito, náuseas, caída del cabello y leucopenia) (Nanba, 1997). Es importante considerar que, al menos en los casos particulares que se informan de este ensayo clínico, los pacientes que recibieron sólo tratamiento con la Fracción D fueron aquellos que por voluntad propia decidieron abandonar el tratamiento quimioterápico. Pese a esta consideración, se puede observar que el estudio presentó ciertas deficiencias metodológicas.

Ratificando estos ensayos, la seguridad de consumo de la Fracción D de Maitake fue avalada por el *Consumer Product Testing Co.*, Nueva Jersey, Estados Unidos (Kodama et al, 2002 A). Más aún, la FDA eximió la realización de estudios de fase I con la Fracción D de Maitake y otorgó a Maitake *Products, Inc.* (actualmente *Mushroom Wisdom, Inc.*) el permiso para emplear a la Fracción D como nuevo fármaco en investigación en un estudio piloto de fase II en pacientes con cáncer de mama y próstata (Konno, 2002; Smadelli et

al, 2004; De Silva et al, 2012; Alexander et al, 2013). Este estudio se encuentra actualmente en curso, siendo desarrollado por varias instituciones/hospitales.

Por otro lado, los efectos toxicológicos de la Fracción D también han sido evaluados en personas sanas. Veintiocho personas, 14 hombres y 14 mujeres, con edad entre 35-73 años, participaron de un ensayo clínico randomizado y doble ciego (Smadelli et al, 2004). Quince de ellos ingirieron 1 gota de Fracción D por Kg de peso por día (distribuida igualmente en 3 dosis) durante un mes, mientras que los trece restantes recibieron una preparación placebo. Ninguno de los participantes experimentó dolencias o efectos adversos durante el ensayo, lo cual confirmó nuevamente la seguridad del consumo de la Fracción D. A su vez, de los 24 parámetros hematológicos analizados, en 17 de ellos se produjeron cambios que sugieren un efecto favorable para la salud (Smadelli et al, 2004).

Por lo tanto, estos estudios sugieren que la ingestión de la Fracción D de Maitake no tiene efectos negativos e incluso que puede proporcionar beneficios para la salud en general y en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer en particular.

IV- Fracción D de Maitake y cáncer.

Se ha reportado que la Fracción D obtenida del hongo *Grifola frondosa* posee efectos anticancerígenos en las distintas etapas de la progresión tumoral: previniendo la transformación de las células normales en tumorales (carcinogénesis), retardando el crecimiento tumoral una vez establecido el tumor, e inhibiendo el desarrollo de metástasis. A continuación se detalla lo reportado acerca de la actividad de la Fracción D sobre cada una de dichas etapas.

La Fracción D de Maitake demostró prevenir la carcinogénesis hepática en ratones expuestos a N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA). Luego de repetidas exposiciones al carcinógeno, un grupo de ratones recibió alimento conteniendo

la Fracción D, un segundo grupo recibió administración oral de Fracción D y un tercer grupo no recibió tratamiento alguno (control). En los grupos tratados la incidencia tumoral fue del 22,2 % y del 9,7 % respectivamente, mientras que en el grupo control la incidencia detectada fue del 100 % (Nanba, 1995). La capacidad anticarcinogénica de la Fracción D también fue confirmada empleando metilcolantreno (3-MCA) (Nanba & Kubo, 1997). En esta ocasión, el carcinógeno fue inyectado en los ratones, y se evaluó el tratamiento por vía oral de la Fracción D (o solución salina, grupo control). Mientras que el 93,2 % del grupo control desarrolló cáncer, el tratamiento con la Fracción D disminuyó la carcinogénesis a un 30,7 % (Nanba & Kubo, 1997). En este trabajo se observó también un aumento de la actividad de macrófagos (medida por la producción de H₂O₂) y linfocitos T (LT) citotóxicos en los ratones tratados con la Fracción D (Nanba & Kubo, 1997).

En cuanto a la actividad antitumoral de la Fracción D de Maitake sobre tumores ya establecidos, se ha demostrado que la administración del extracto retarda el crecimiento tumoral en modelos murinos alogénicos de sarcoma (Hishida et al, 1988) y singénicos de cáncer mama (Hishida et al, 1988; Inoue et al, 2002; Kodama et al, 2002 A), de cáncer colon (Kodama et al, 2002 B) y melanoma (Hishida et al, 1988).

La actividad antimetastásica de la Fracción D de Maitake fue inicialmente evaluada sobre células de carcinoma hepático (MM-146). Las células fueron implantadas en la almohadilla plantar de la pata trasera de ratones, la cual fue removida quirúrgicamente luego de 48 h. Posteriormente, un grupo de ratones recibió alimento conteniendo la Fracción D, un segundo grupo recibió alimento más la administración intraperitoneal de Fracción D y el grupo control recibió únicamente alimento. Luego de 30 días, se demostró que tanto la administración intraperitoneal como oral de Fracción D previno las metástasis en hígado en un 91,3 % y 81,7 % respectivamente, en comparación con el control. Los autores sugirieron que este resultado demuestra que las células tumorales en circulación por la sangre o linfa fueron atacadas por el sistema inmune de los ratones tratados con la Fracción D de Maitake (Nanba, 1995). Posteriormente, se demostró que la Fracción D también inhibe el

desarrollo de metástasis, y la recurrencia tumoral, en ratones C3H implantados con células MM-46 (tumores mamarias) (Nanba & Kubo, 1997).

Todos estos efectos anticancerígenos reportados de la Fracción D de Maitake fueron atribuidos a la capacidad inmunoestimuladora del extracto en base a lo que se describe en la siguiente sección.

V- Efecto antitumoral de la Fracción D a través del sistema inmune.

La capacidad inmunomoduladora de la Fracción D y su relación con el efecto antitumoral del extracto fue estudiada por primera vez en 1988 (Hishida et al, 1988). Para ello se realizó un ensayo de Winn en el cual ratones C3H fueron inoculados con células tumorales mamarias MM-46 (grupo control) o con una suspensión de células tumorales MM-46 y células esplénicas (CE) obtenidas de distintos donantes. Los donantes fueron: **A)** ratones C3H portadores de tumores (MM-46) tratados por vía oral con la Fracción D; **B)** ratones C3H portadores de tumores (MM-46) no tratados con la Fracción D. Mientras que los ratones que fueron inoculados con las células MM-46 + CE obtenidas de **B** experimentaron un menor desarrollo tumoral con respecto al control, los ratones inoculados con MM-46 + CE obtenidas de **A** alcanzaron una completa inhibición tumoral. Estos resultados indicaron que si bien el sistema inmune de ambos grupos donantes (**A** y **B**) fue activado, probablemente por la implantación de las células tumorales, el tratamiento del donante con la Fracción D potenció dicha activación del sistema inmune (Hishida et al, 1988).

Como se describe a continuación se demostró que la Fracción D era capaz de activar tanto al sistema innato como adaptativo y ejercer así sus efectos inhibitorios sobre la progresión tumoral.

V.I- Efecto de la Fracción D sobre el sistema inmune innato.

Macrófagos.

Se ha demostrado que la Fracción D activa macrófagos, estimulando en estas células inmunes la producción y liberación de interleuquina (IL)-1 β (Hishida et al, 1988; Kodama et al, 2001), IL-12 (Kodama et al, 2002 A; Kodama et al, 2005) y del factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Inoue et al, 2002).

La Fracción D aumenta también la expresión de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) en los macrófagos, y de esta manera dichos efectores inmunes resultaran capaces de destruir células tumorales de hígado *in vitro* (Sanzen et al, 2001).

Natural Killer (NK).

Una de las citoquinas críticas para las funciones de los NK es la IL-12, liberada por monocitos y macrófagos. Se observó que la Fracción D aumenta la expresión del receptor de la IL-12 en los NK y la citotoxicidad de estos hacia células YAC-1 (línea celular de linfoma murino) (Kodama et al, 2005). De esta manera, se demostró que la activación de los NK por la Fracción D, implicaría al menos en parte, a la IL-12 liberada por los macrófagos activados previamente por el proteoglicano. Se observó también que la Fracción D eleva significativamente la producción de TNF- α e interferón (IFN)- γ por los NK, (Kodama et al, 2002 A; Kodama et al, 2003 A). Estas citoquinas son claves para el ataque de los NK hacia las células tumorales (Wang et al, 2012).

La activación de estas células inmunes por la Fracción D también fue demostrada en dos estudios clínicos. Uno de ellos (Kodama et al, 2002 A) involucró ocho pacientes con carcinoma pulmonar, mamario, hepático y de paratiroides (estadio II-IV), mientras que el segundo (Kodama et al, 2003 B) reunió diez pacientes con cáncer pulmonar, mamario, gástrico y lingual (estadio II-IV). Los pacientes recibieron una administración oral de Fracción D sin estar bajo tratamiento de quimio o radioterapia. Sin embargo, estos estudios requieren ser ampliados e incorporar pacientes controles.

Células dendríticas (CD).

En relación a estas células inmunes, se demostró que la Fracción D aumenta la proporción de CD8 α + / CD8 α - y con ello el nivel de IL-12 producido por las CD (Harada et al, 2003). A su vez, la Fracción D aumenta la expresión de los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de las CD (Harada et al, 2003) y en correlación con esto, también aumenta la expresión de CD28 (receptor de B7) en los LT CD4+ (Kodama et al, 2002 B), induciendo claramente una respuesta inmune vía B7/CD28.

Se ha sugerido que la capacidad inmunoestimuladora de la Fracción D sobre las CD podría potencialmente ser empleada en protocolos de vacunas antitumorales basadas en CD (Borchers et al, 2008).

Sistema del complemento.

A la fecha, no existe reporte alguno que estudie la activación del complemento mediada por la Fracción D de Maitake. Sólo se ha informado que otro β -glucano obtenido de *Grifola frondosa*, denominado LELFD podría activar al complemento por la vía alternativa (Suzuki et al, 1989).

V.II- Efecto de la Fracción D sobre el sistema inmune adaptativo.

Linfocitos T (LT).

Se demostró que la Fracción D induce inmunidad celular activando específicamente LT CD4+, es decir LT *helper* (LTh) (Inoue et al, 2002), sin ejercer cambios sobre la activación de los LT CD8+ (LT citotóxicos) (Kodama et al, 2002 B).

Los LTh se clasifican en tres subtipos en función de las citoquinas que producen y liberan: LTh₁, LTh₂ y LTh₀ (Lull et al, 2005). Se ha demostrado que la Fracción D de Maitake induce una inmunidad dominada por LTh₁ (Kodama et al, 2002 B). Para lograr esto, la Fracción D:

- estimula la creación de un ambiente favorable para la conversión de LTh₀ en LTh₁: aumentando la producción de IL-12 e IL-18 y disminuyendo la producción de IL-1β por células presentadoras de antígenos (Inoue et al, 2002), entre ellas por las CD8α⁺ activadas por el proteoglicano (Harada et al, 2003).
- inhibe la conversión de LTh₁ en LTh₂. Así, la Fracción D estimula la inmunidad celular y ejerce de esta manera, al menos en parte, su efecto antitumoral (Inoue et al, 2002).

Linfocitos B (LB).

Mientras que ciertos compuestos fúngicos son capaces de estimular la proliferación, diferenciación y activación de los LB, otros compuestos son capaces de suprimir las funciones de dichas células inmunes (Lull et al, 2005). Tal es el caso de la Fracción D de Maitake, la cual disminuye la activación de LB presentes en ganglios linfáticos sin afectar la activación de LB esplénicos (Inoue et al, 2002). Por lo tanto, se cree que la Fracción D de Maitake estaría impidiendo el ingreso de LB activados al área tumoral.

En síntesis, se puede ver que la Fracción D de Maitake no sólo activa a efectores del sistema inmune, tales como CD, macrófagos, NK y LT que atacan a las células tumorales, sino que también potencia la liberación de mediadores como linfoquinas e interleuquinas que amplifican la señal.

VI- Efecto antitumoral de la Fracción D independiente del sistema inmune.

Como se comentó anteriormente y debido a lo expuesto en la sección V, los efectos anticancerígenos de la Fracción D sobre las distintas etapas de la progresión tumoral han sido atribuidos exclusivamente a su capacidad inmunoestimuladora. Sin embargo, desde hace poco más de una década, se comenzó a observar que la Fracción D de Maitake exhibe también la capacidad

de actuar sobre las células tumorales, de manera independiente del sistema inmune.

El primer trabajo publicado que informó sobre efectos antitumorales independientes del sistema inmunológico de la Fracción D sobre células tumorales, data del año 2000 (Fullerton et al, 2000). En este estudio se evaluó el efecto antitumoral *in vitro* de la Fracción D sobre células humanas de cáncer de próstata (PC-3). El tratamiento de dichas células con 480 µg/mL de Fracción D durante 24 h causó la muerte de más del 95 % de la población celular. Se pudo determinar que la muerte celular ocurrió a través de apoptosis y que la elevación del estrés oxidativo producido por el proteoglucano era el disparador, al menos en parte, de la misma (Fullerton et al, 2000).

Años más tarde, se evaluó el efecto de ocho extractos fúngicos disponibles comercialmente, entre los cuales se encontraba la Fracción D, sobre células humanas de cáncer de vejiga (T24). De los ocho extractos, únicamente la Fracción D y la Fracción PL (derivada de *Phellinus linteus*) afectaron la viabilidad de las células T24. En el caso particular de la Fracción D, la disminución de la viabilidad celular fue alcanzada luego de 72 h de tratamiento siendo 120 µg/mL la menor concentración efectiva (Konno, 2007).

Posteriormente, se evaluó el efecto de la Fracción D sobre un panel más amplio de líneas tumorales humanas, para determinar si se trataba de un efecto dependiente del tipo de tumor. Para esto, las líneas tumorales de riñón (ACHN), mama (MCF-7), pulmón (A549), estómago (AGS), hígado (HepG2), cerebro (U-89), leucemia (HL-60), nuevamente de vejiga (T24) (Konno, 2004) y de próstata (PC-3) (Konno, 2009) fueron expuestas a distintas concentraciones de Fracción D y por distintos períodos de tiempo. La viabilidad de las células ACHN, A549 y AGS no resultó afectada por la Fracción D, ni si quiera utilizando la máxima concentración evaluada (1000 µg/mL) y el tiempo de tratamiento más prolongado (72 h). Sobre las células MCF-7 y HepG2 la Fracción D disminuyó sólo ~10 % la viabilidad. Mientras que sí se observó un efecto antiproliferativo sobre las células U-89 y citotóxico sobre las células HL-

60 y T24 (Konno, 2004). Sobre las células PC-3, la Fracción D también disminuyó la viabilidad celular, pero no fue determinado el mecanismo mediante el cual se alcanza dicho efecto (Konno, 2009). Estos resultados sugirieron que la Fracción D de Maitake podría presentar un efecto dependiente del tipo de cáncer.

En este mismo trabajo, se evaluó también el efecto de la Fracción D sobre células tumorales caninas de glándula mamaria (CF33), tejido conectivo (CF21) y linfoma (CL-1). La viabilidad de las tres líneas disminuyó con el tratamiento del proteoglucano, en las dos primeras mediante un efecto antiproliferativo y en las CL-1 mediante un efecto citotóxico (Konno, 2004).

Particularmente, con respecto al efecto de la Fracción D sobre la línea celular ACHN de cáncer de riñón es importante notar la existencia de una discrepancia en los resultados publicados. Inicialmente, en Konno, 2004 se reportó que las células ACHN no eran susceptibles al tratamiento con la Fracción D (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 72 h); mientras que más tarde dos trabajos informaron el efecto de la Fracción D sobre las células en cuestión. En uno de ellos (Alexander et al, 2013), el tratamiento con 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fracción D durante 72 h redujo un ~65 % la viabilidad de las células ACHN. En el segundo trabajo (Degen et al, 2013), un efecto similar fue demostrado, ya que 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fracción D durante 72 h redujeron un 45 % la viabilidad celular. Ninguno de los dos trabajos hace referencia el potencial motivo de esta discrepancia.

Como se puede ver, el efecto de la Fracción D de Maitake sobre células tumorales, independiente del sistema inmune, comenzó a ser estudiado recién en la década pasada. Si bien dicho efecto ha sido evaluado sobre un amplio panel de líneas tumorales humanas e incluso caninas, en todos estos trabajos se investigó el efecto de la Fracción D únicamente sobre la viabilidad celular, determinando si las células eran o no susceptibles al tratamiento con el proteoglucano.

Más aún, el eje principal de prácticamente todos estos trabajos fue evaluar el efecto de combinar la Fracción D con un segundo agente, dejando de lado el estudio de los mecanismos antitumorales exclusivos del proteoglucano. Así, se demostró el accionar sinérgico entre la Fracción D y la Vitamina C (VC), mediante el cual dosis inefectivas de ambos agentes, al combinarlas, disminuyeron marcadamente la viabilidad de las células tumorales humanas: PC-3 (Fullerton et al, 2000; Konno, 2009), T24 (Konno, 2007), MCF-7, HepG2, U-87, HL-60 (Konno, 2009); y caninas CF-33, CF-21 y CL-1 (Konno, 2009). Sin embargo, la combinación de Fracción D + VC no afectó la viabilidad de aquellas líneas celulares que no mostraron respuesta frente al tratamiento con la Fracción D únicamente (ACHN, A549 y AGS) (Konno, 2004). Aquí se mantiene la discrepancia que mencionábamos anteriormente, ya que estudios posteriores reportan que la combinación de Fracción D + VC potencia el efecto sobre la viabilidad las células ACHN (Alexander et al, 2013), A549 y AGS (Konno et al, 2013). En este último trabajo también se demostró el accionar sinérgico de la Fracción D + VC sobre células tumorales de mama (MDA-MB-231) y de colon (Caco-2), que no habían sido evaluadas hasta el momento (Konno et al, 2013).

Más recientemente, algunos trabajos comenzaron a evaluar los mecanismos moleculares por los cuales la combinación de Fracción D + VC ejercía el efecto antitumoral. De esta manera, se demostró que la combinación de los agentes afecta sinérgicamente a las células ACHN (derivadas de cáncer de riñón) induciendo en ellas estrés oxidativo, arresto temprano del ciclo celular en G₁ y posterior muerte por apoptosis (Alexander et al, 2013). Sobre las células PC-3 el mecanismo disparado por el tratamiento conjunto de Fracción D + VC fue similar, reportándose un profundo estrés oxidativo seguido de muerte celular por apoptosis (Konno, 2009). En Konno et al, 2013 el aumento del nivel proteico de Bax y la disminución del nivel de Bcl-2 observado en las células tumorales luego del co-tratamiento sugieren también la participación de la apoptosis en el efecto citotóxico.

Otro caso similar se presentó frente a la combinación de Fracción D con Vitamina K₃ (VK₃, menadiona), combinación que mostró potenciar el efecto

sobre la viabilidad de las células ACHN (Degen et al, 2013). Bajo esta combinación de agentes, se observó nuevamente un arresto temprano del ciclo celular en G₁, acompañado por un aumento de expresión de p21^{WAF1} y p27^{Kip1}. Particularmente, la sobreexpresión de p21^{WAF1} podría deberse a la inactivación de la histona deacetilasa (HDAC) generada por la Fracción D + VK₃, lo cual conduciría a la hiperacetilación de histonas específicas y consecuente sobreexpresión génica. La inducción de muerte celular por apoptosis también se puso de manifiesto en las células ACHN luego del tratamiento con Fracción D + VK₃ (Degen et al, 2013).

También se observó un accionar sinérgico entre la Fracción D y el IFN- α_{2b} sobre células tumorales PC-3 (Pyo et al, 2008) y T24 (Louie et al, 2010). Sobre ambas líneas, el co-tratamiento produjo un arresto celular en fase G₁ y particularmente en las células PC-3 este arresto estuvo acompañado por la disminución de expresión de reguladores del ciclo celular tales como: quinasa dependiente de ciclina (CDK) 2, CDK4, CDK6, ciclina D₁ y ciclina E (Pyo et al, 2008).

Los resultados presentados en esta introducción comienzan a sugerir que la Fracción D de Maitake podría ser empleada como agente natural adyuvante, factible de combinarse con drogas quimioterápicas, con vitaminas (VC o VK₃), e incluso con el IFN- α_{2b} con el fin de optimizar las terapias convencionales contra los diversos tipos de tumores. Como ya se describió, los resultados obtenidos parecen depender del tipo de cáncer. En este sentido uno de los tumores menos estudiados y con resultados contradictorios es el de mama (Konno 2004; Soares et al, 2011). Por estas razones resulta interesante continuar investigando el posible efecto terapéutico de la Fracción D del Maitake en este tipo de cáncer.

Por otro lado es importante para una mayor efectividad de la combinación de agentes terapéuticos conocer el mecanismo de acción de cada uno de ellos. En este contexto, resulta necesario investigar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la Fracción D de Maitake ejerce efectos antitumorales, independiente del sistema inmune.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I- Hipótesis.

La hipótesis de este trabajo de tesis es que la Fracción D, proteoglucano obtenido del hongo *Grifola frondosa* (Maitake), tiene la capacidad de actuar como un agente terapéutico en el cáncer de mama. A su vez, postulamos que parte de dicha capacidad es atribuida a efectos del proteoglucano independientes del sistema inmunológico sobre las células tumorales mamarias. De esta manera, la Fracción D ejercería un efecto antitumoral, no sólo mediante la estimulación del sistema inmune, como ha sido considerado tradicionalmente, sino también disminuyendo el comportamiento agresivo del tumor mediante otros mecanismos.

II- Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo de tesis es contrastar esta hipótesis. Es decir, investigar en ensayos preclínicos los posibles efectos terapéuticos de la Fracción D, proteoglucano obtenido del hongo *Grifola frondosa* (Maitake), en el cáncer de mama e identificar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales esta fracción ejercería un efecto antitumoral independiente del sistema inmune en células de cáncer de mama.

III- Objetivos específicos.

Para determinar si la Fracción D de Maitake es capaz de actuar sobre células tumorales mamarias independientemente del sistema inmune, nos proponemos:

1. Evaluar el perfil de expresión génica inducido por la Fracción D en células tumorales mamarias.
2. Identificar potenciales procesos moleculares y celulares mediante los cuales el proteoglucano podría estar ejerciendo un efecto antitumoral.

Con el fin de comprobar que la Fracción D de Maitake posee actividad antineoplásica en cáncer de mama realizaremos ensayos in cultivo trabajando con distintas líneas celulares, y ensayos in vivo empleando distintos modelos murinos.

Mediante los ensayos in cultivo evaluaremos particularmente el efecto antitumoral de la Fracción D independiente del sistema inmunológico sobre células tumorales mamarias. En este punto nos proponemos:

- 3.** Estudiar el efecto de la Fracción D sobre la viabilidad celular en distintas líneas de carcinoma mamario y determinar la susceptibilidad de las células al proteoglicano.
- 4.** Estudiar los mecanismos celulares (proliferación y apoptosis) a través de los cuales la Fracción D afecta la viabilidad celular.
- 5.** Estudiar el efecto de la Fracción D sobre las capacidades de adhesión, migración e invasión celular.

A su vez, una característica deseada en todo compuesto con potencial efecto terapéutico antineoplásico es que presente un accionar diferencial entre las células tumorales y las células normales, afectando únicamente (o en mayor medida) a las primeras. Es por ello que mediante ensayos in cultivo nos proponemos también:

- 6.** Evaluar el accionar de la Fracción D sobre la viabilidad, migración e invasión celular en una línea epitelial mamaria no maligna.

Mediante los ensayos in vivo, evaluaremos el potencial efecto terapéutico de la Fracción D sobre tumores mamarios ya establecidos y su potencial empleo como agente preventivo del cáncer de mama. En esta ocasión procuraremos discernir, dentro de las limitaciones de cada modelo animal, los efectos del proteoglicano que resultan independientes del sistema inmune de aquellos mediados por tal sistema. Para ello nos planteamos:

7. Estudiar el efecto de la Fracción D sobre la progresión tumoral en un modelo murino de xenotrasplante con células de adenocarcinoma mamario humano.
8. Estudiar el efecto de la Fracción D sobre la progresión tumoral en un modelo murino de trasplante singenético con células de adenocarcinoma mamario murino.
9. Estudiar el efecto preventivo de la Fracción D en un modelo murino de trasplante singenético con células de adenocarcinoma mamario murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I- Fracción D de Maitake.

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo empleando Maitake D-Fraction® Pro 4X (líquido), producido por *Mushroom Wisdom, Inc.* (anteriormente denominada *Maitake Products, Inc.*) Nueva Jersey, Estados Unidos (<http://www.mushroomwisdom.com>). Maitake D-Fraction® Pro 4X contiene el extracto de Fracción D, glicerina vegetal y agua, y se encuentra libre de gluten, trigo, soja, colorantes, saborizantes y conservantes.

II- Vehículo de la Fracción D de Maitake.

En base a la información provista por la compañía *Mushroom Wisdom, Inc.* productora de Maitake D-Fraction® Pro 4X (líquido), se preparó el vehículo de la Fracción D a emplear en cada uno de los ensayos. Dicho vehículo está constituido por glicerol 78,12 % (v/v) (Sigma) en agua MilliQ.

III- Líneas celulares.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

Línea **LM3**, establecida a partir de pasajes sucesivos *in vitro* de un cultivo primario del adenocarcinoma mamario murino M3 (Urtreger et al, 1997). No expresa RE ni RP. Esta línea fue gentilmente cedida por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.

Línea **MDA-MB-231**, derivada de un tumor ductal humano triple negativo. Esta línea celular también fue gentilmente cedida por el Instituto de Oncología Ángel H. Roffo.

Línea **MCF-7**, derivada de una efusión pleural tomada de paciente con cáncer de mama metastático. Expresa RE y RP (Levenson & Jordan, 1997; Subik et al, 2010).

Línea **HC11**, derivada de la glándula mamaria de un ratón hembra BALB/c que se encontraba en la mitad del período gestacional. Expresa RE (Williams et al, 2009).

Las células LM3 y MCF-7 fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma), suplementado con 5 % v/v y 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) respectivamente, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (Gibco, 100 U/mL), y estreptomina (Gibco, 100 µg/mL) por igual para ambas líneas. Las células se mantuvieron a 37 °C bajo atmósfera de 5 % de CO₂.

Las células MDA-MB-231 y HC11 fueron cultivadas en RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium, Sigma) suplementado con 10 % v/v de SFB, L-glutamina (5 mM, Gibco), penicilina (100 U/mL, Gibco), y estreptomina (100 µg/mL, Gibco) por igual para ambas líneas. El medio correspondiente a las HC11 fue a su vez suplementado con insulina (5 µg/mL Gibco). Las células se mantuvieron a 37 °C bajo atmósfera de 5 % de CO₂.

IV- Microarreglos de ADNc.

Células MCF-7 fueron tratadas con concentraciones crecientes de Fracción D (36 µg/mL, 91 µg/mL, 183 µg/mL ó 367 µg/mL) durante 24 h; paralelamente células MCF-7 no tratadas se emplearon como grupo control.

IV.I- Aislamiento de ARN total.

El ARN total fue aislado por duplicado empleando Trizol (*Invitrogen, Inc*) siguiendo el método clásico de extracción de Chomczynski (Chomczynski & Sacchi, 1987). Su concentración y pureza fue determinada empleando un

espectrofotómetro Nanodrop (*Nanodrop Technologies, Inc*) y un Bioanalizador (*Agilent Technologies*).

IV.II- Amplificación del ARN utilizando PCR.

Con el objetivo de mejorar la calidad de las sondas fluorescentes empleadas para hibridar los microarreglos de ADN, realizamos una previa amplificación lineal de todo el ARN mediante un método modificado que emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa empleando la enzima RT de *Invitrogen*. A partir de los productos obtenidos de retro transcripción (ADNc de cadena simple) se sintetizó ADNc de cadena doble utilizando el kit para PCR *Advantage 2 (Clontech Laboratories)* y en presencia del primer Oligo dT-T7. Los productos de PCR fueron purificados luego utilizando el kit *QIA quick PCR purification system (Qiagen)*. Finalmente, se llevó a cabo la transcripción *in vitro* del ADNc a ARN empleando el kit *AmpliScribe SP6 High Yield Transcription kit (Epicentre Technologies, Madison, WI)*. Los productos fueron sometidos a una digestión con ADNasa I, seguido de una extracción con cloroformo-fenol y precipitación con etanol. Posteriormente, productos fueron lavados con etanol 70 %, resuspendidos y almacenados a -70 °C hasta ser empleados. El rendimiento y la calidad de la amplificación fueron evaluados utilizando un Bioanalizador (*Agilent Technologies*). Todos los RNA amplificados (aaARN) obtenidos de cada una de las condiciones ensayadas fueron marcados con el fluoróforo Cy5 (rojo) a la hora de hibridar los microarreglos de ADN. Un ARN de referencia universal humano (*Invitrogen*) se amplificó de manera idéntica a fin de utilizarse como control y para ser marcado con el fluoróforo Cy3 (verde) a modo de referencia en la hibridación de cada uno de los microarreglos de ADN.

IV.III- Síntesis y marcaje del ADNc.

Se empleó el método directo de marcado de sondas fluorescentes utilizando un *random primer* amino-modificado (2 µg/µL), a partir de 5 µg de ARN amplificado (aaARN) en presencia de inhibidor de ribonucleasa (5

unidades/ μL). La mezcla fue incubada a 70 °C durante 10 minutos y luego colocada en hielo por 10 minutos más. Posteriormente, se procedió a la reverso transcripción empleando la enzima RT (*Invitrogen*) en presencia del buffer RT 5 X y de dNTPs mix. La reacción fue incubada a 42 °C durante 2 h y finalizada mediante el agregado de EDTA (0,5 M, 10 μl). El ARN fue hidrolizado con NaOH (1 M, 10 μl) a 65 °C por 30 min.

IV.IV- Purificación de la sonda e incorporación del fluoróforo.

Las sondas fluorescentes fueron purificadas por separado con el kit de purificación *QIA quick PCR* (*Qiagen*); resumidamente los productos marcados con los fluoróforos Cy3 y Cy5 fueron primeramente mezclados con 500 μL de Buffer PB (Buffer de Unión). Las muestras se colocaron en las columnas provistas por el kit y fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 1 min a 4 °C. Para lavar las columnas, se agregó 750 μl de Buffer PE (Buffer de lavado con polietilenglicol) y se centrifugaron nuevamente a 13000 rpm durante 1 min a 4 °C. Este paso de lavado fue repetido una vez más. Las columnas se colocaron sobre tubos colectores nuevos, y se adicionó 30 μl de Buffer EB (Buffer de Elución), se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min a 4 °C. Finalmente, se realizó un lavado de igual manera que a los anteriores, colectando el eluido en el mismo tubo.

IV.V- Hibridación y lavado de los microarreglos de ADNc.

A cada sonda fluorescente purificada marcada con Cy3 y Cy5 se le adicionó 4,5 μL de buffer salino de citrato de sodio (SSC) 20 X, 2 μl de poli(A) (10 mg/mL) y 0,6 μl de SDS 10%. Posteriormente las sondas fueron denaturalizadas a 98 °C por 3 min y los productos fueron mezclados en iguales proporciones, colocados sobre cada uno de los microarreglos de ADN y cubiertos con cubreobjetos adecuados. Se incubaron en una cámara de hibridación (Corning) en baño de agua a 42 °C durante 16 h. Posteriormente se lavaron con SSC 0,5 X y SDS 0,01 % durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de un nuevo lavado de iguales condiciones con SSC 0,06 X.

Luego se dejaron secar por 5 min a temperatura ambiente y finalmente fueron centrifugados a 800 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

IV.VI- Escaneo del microarreglo y análisis.

Los microarreglos de ADNc fueron escaneados empleando un escáner fluorescente Affymetrix 428 (*MWG Technologies*) a una resolución de 10 μm y con un tubo fotomultiplicador de voltaje variable ajustado para obtener las máximas intensidades de señal con una saturación de la sonda menor a 1 % (p/v). Las imágenes resultantes fueron analizadas utilizando el programa *ImaGene* 4.2, y *GeneSight* versión 4.0 (*Biodiscovery, CA*). Los datos fueron normalizados empleando el *Software Nexus Expression* (*Biodiscovery, CA*). Se realizó un agrupamiento jerárquico utilizando el método de vecinos más cercanos y aplicando la correlación de *Pearson*. A su vez, se utilizó también otro método de agrupamiento y otra función de distancia (tal como la Euclidiana).

Todos los genes con un valor de p inferior a un umbral de 0,05 fueron seleccionados como diferencialmente expresados, manteniendo la proporción de falsos positivos en el grupo seleccionado por debajo del valor umbral (5 %). La expresión diferencial de cada gen fue informada como el Log_2 de R, siendo R la expresión relativa del gen = expresión del gen bajo tratamiento/expresión del gen bajo condición control. Se estableció como criterio una expresión diferencial ≥ 2 para genes sobreexpresados con respecto al control, y una expresión diferencial ≤ -2 para genes subexpresados con respecto al control.

V- Ensayo de viabilidad celular.

Para estudiar el efecto de la Fracción D de Maitake sobre la viabilidad celular se realizaron ensayos tiempo- dosis- respuesta, a los cuales se evaluó por conteo manual en cámara de Neubauer y mediante el reactivo colorimétrico WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H- 5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno).

Para tal fin, se repicaron células en fase exponencial de crecimiento: se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con 5 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1 X estéril, se descartó el PBS y se agregó 500 μ L de tripsina estéril. Una vez que las células perdieron su adhesión a la placa de cultivo, se frenó la acción de la tripsina por el agregado de 2 mL del medio de cultivo estéril correspondiente a la línea celular. Se homogeneizó con micropipeta la suspensión celular y se cargó 10 μ L de ella por duplicado en cámara de Neubauer para determinar el número de células presentes por mL de suspensión. Para los ensayos de viabilidad, se trabajó con placas de 96 pocillos. Las células fueron sembradas en una densidad de 800 a 4000 células por 100 μ L de medio completo por pocillo e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 5 % CO₂. La densidad celular varía en función de la línea en estudio y del tiempo de tratamiento a ensayar.

V.I- Conteo celular en cámara de Neubauer.

Las células fueron tratadas con 30, 300, 750, 1500, 2250 y 3000 μ g/mL de Fracción D o vehículo durante 24, 48 y 72 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó el conteo manual de las células en cámara de Neubauer. Para tal fin, se removió el medio de cada pocillo, se realizó un lavado con 100 μ L de PBS 1 X, se descartó el PBS, se agregó 50 μ L de tripsina y una vez que estas perdieron su adhesión se inactivó la tripsina con 50 μ L de medio de cultivo completo. Con una alícuota de 10 μ L de la suspensión se determinó en cámara de Neubauer el número de células presentes por pocillo. Cada tratamiento se realizó al menos por triplicado.

V.II- Ensayo colorimétrico de WST-1.

Las células fueron tratadas con 30, 300, 750, 1500, 2250 y 3000 μ g/mL de Fracción D o vehículo durante 24 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó la prueba WST-1: se removió el medio de cada pocillo, se agregó el reactivo WST-1 diluido en el medio de cultivo correspondiente (1:10) y se

realizó una incubación de 1 h a 37 °C y 5 % CO₂. El reactivo WST-1 es una sal de tetrazolio, de coloración ligeramente roja, que por acción de enzimas mitocondriales (activas sólo en células viables) se transforma en formazán, sal de color roja oscura. La cantidad de formazán producido durante la incubación está relacionada con el número de células metabólicamente activas presentes en cada pocillo y es cuantificada por espectrofotometría. Por lo que, luego de la hora de incubación, se agitó levemente la placa para obtener una solución de color homogéneo, se extrajo los 100 µL de cada pocillo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Jasco V-630) a longitud de onda de 440 nm. Cada tratamiento se realizó al menos por triplicado.

Los valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de la Fracción D para cada línea celular en función del tiempo se obtuvieron utilizando la ecuación de dosis-respuesta sigmoidea del programa estadístico *GraphPad Prism 5.00* para *Microsoft Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos)*.

VI- Tiempo de duplicación celular.

Para determinar el tiempo de duplicación celular de cada una de las líneas se utilizaron placas de 96 pocillos. Las células fueron sembradas en una densidad de 1000 a 2500 células por 100 µl de medio completo por pocillo e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda de 5 % CO₂. La densidad celular dependió de la línea en estudio. Cada 24 h, y al menos durante 120 h, las células de 6 pocillos fueron tripzinidas bajo flujo y se determinó por conteo doble en cámara de Neubauer el número de células presentes por pocillo. Con estos valores se armó una curva de crecimiento (número de células en función al tiempo de cultivo) para cada línea, sobre la cual se pudieron identificar las 4 fases de crecimiento: logarítmica, exponencial, estacionaria y de muerte. Trabajando con el logaritmo del número de células y exclusivamente con los valores de la fase exponencial se determinó la ecuación de la recta mediante regresión lineal. A partir de esta ecuación y considerando que el tiempo de duplicación celular (T_2) = $\log 2$ /pendiente de la recta, se puede determinar T_2 de cada línea celular.

VII- Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

El análisis del ciclo celular fue realizado por FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis*). Aproximadamente 2×10^6 células, previamente tratadas con la Fracción D (concentración dependiente de la línea celular) o vehículo por 24 h, fueron tripsinizadas y resuspendidas en el medio de cultivo completo correspondiente. La suspensión de células se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, se lavó el pellet generado con 1 mL de PBS 1 X y se centrifugó nuevamente a 2000 rpm por 5 min. Los nuevos pellets fueron resuspendidos en 1,5 mL de PBS 1 X más el agregado gota a gota de 3,5 mL de etanol 100 % (v/v) frío para la fijación. Las células se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h como mínimo y por un período no mayor a 15 días. Al momento del análisis, las células resuspendidas en etanol fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min, lavadas con 1,5 mL de PBS 1 X y nuevamente centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. Finalmente, el pellet obtenido fue resuspendido en 0,5 mL de PBS 1 X conteniendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de ioduro de propidio (IP) y 100 $\mu\text{g/mL}$ ARNasa A. Se realizó una incubación de 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. El IP empleado se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del DNA 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 que el IP también puede unirse al ARN, y por lo tanto es necesario degradar al mismo para una óptima resolución del DNA.

El análisis del ciclo celular se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de 585 nm de emisión. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de ADN (*ModFit LT cell cycle analysis software*) y se graficó el % de células en las distintas fases del ciclo celular. Siempre se trabajó por triplicado.

VIII- Análisis de apoptosis.

Las células apoptóticas fueron analizadas utilizando el kit de detección de apoptosis por Anexina V-FITC (AV) y siguiendo las instrucciones del fabricante (BD *Pharmingen*). Se observaron y cuantificaron mediante microscopia de fluorescencia y por citometría de flujo

VIII.I- Por microscopía de fluorescencia.

Las células fueron tratadas con la Fracción D o vehículo durante 24 h. Finalizado el tratamiento las células fueron tripsinizadas, colectadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Luego fueron lavadas dos veces con PBS 1 X y resuspendidas en buffer de binding 1 X (0,1 M HEPES (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) a una concentración de 1×10^6 células/mL. De dicha suspensión celular se tomaron 100 μ L y a estos se les agregó 5 μ L de AV. Se llevo a cabo una incubación de 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente (25 °C). Finalmente se adicionó 400 μ L de buffer de binding a cada tubo. Una alícuota fue colocada en un portaobjeto y observada dentro de los 5 min. Se cuantificó el número de células con marcación y sin marcación de AV presentes en 10 campos al azar.

VIII.II- Por citometría de flujo.

Las células fueron tratadas con la Fracción D o vehículo durante 24 h. Finalizado el tratamiento, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en el medio de cultivo completo correspondiente. La suspensión de células se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min, se lavó el pellet generado con 1 mL de PBS 1 X y se centrifugó nuevamente a 2000 rpm durante 5 min. Los nuevos pellets fueron resuspendidos en buffer de binding 1 X en una concentración de 1×10^6 células/mL. Se tomaron 100 μ L de la suspensión para realizar la marcación con 5 μ L de AV y/o 10 μ L de IP (50 μ g/mL) según corresponda. Se homogeneizó la suspensión y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente

(25 °C) por 15 min. Finalmente se agregó 400 µl de buffer de binding 1 X a cada tubo.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur durante el transcurso de la hora siguiente y sobre una población de 100000 células. Se realizaron los siguientes controles para establecer las compensaciones y los cuadrantes: 1) células sin teñir, 2) células teñidas solamente con AV (sin IP) y 3) células teñidas solamente con IP (sin AV). Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos fueron analizados con el software *Cell Quest (Becton Dickinson)*. Se graficó y cuantificó el % de células con marcación AV+/IP+ (apoptosis tardía), AV+/IP- (apoptosis temprana), AV-/IP+ (necrosis) y AV-/IP- (células viables).

IX- Ensayo de migración celular.

Se realizó el ensayo de “*wound healing*” (Petit et al, 2000). Este método imita la migración celular durante la cicatrización *in vivo*. Se sembraron las células en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 24 h hasta que formaron una monocapa. Luego se hizo una herida con un tip de 10 µL dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Se retiró el medio de cultivo y se añadió nuevo medio conteniendo la Fracción D (concentración dependiente de la línea celular) o el 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. Las fotos se tomaron a las 0 h de tratamiento y luego a intervalos regulares de tiempo que se establecieron en función a cada línea, siempre teniendo la precaución de que el ensayo no superara el T₂. Utilizando el programa Fiji se midió el área de la herida para cada condición en los distintos tiempos evaluados. Se realizaron gráficos representando el área de la herida de cada condición y en cada tiempo como porcentaje del área a tiempo 0. Se realizaron al menos dos experimentos independientes por duplicado.

X- Zimografía.

Con el objetivo de detectar la actividad proteolítica (gelatinasa) de la metaloproteasa (MMP)-2 y MMP-9 liberadas por las células LM3 y MDA-MB-231 se realizó la técnica de zimografía.

Para la obtención de los medios condicionados a emplear en esta técnica las células tumorales fueron tratadas con la Fracción D (concentración dependiente de cada línea celular) o vehículo durante 6 y 12 h. Luego, las células fueron incubadas *overnight* a 37 °C en atmósfera húmeda de 5 % CO₂, con la menor cantidad de medio de cultivo posible, libre de SFB y en presencia de la Fracción D o vehículo. Finalmente, y trabajando siempre en frío, los medios condicionados fueron recolectados, centrifugados a 1200 rpm durante 3 min y almacenados a -20 °C. En el caso de las células MDA-MB-231 se trabajó en placa de cultivo de 100 mm; para las células LM3 se empleó placas de 96 pocillos.

Para esta técnica se prepararon geles de poliacrilamida como se indica en la Tabla 1. La característica particular de estos geles es la presencia de gelatina como sustrato y su espesor de 0,75 mm.

Reactivos	Gel de <i>stacking</i> (5 %)	Gel de resolución (10 %)
Gelatina [3mg/mL]	-	4,15 mL
H ₂ O destilada	5,5 mL	
Tris 1,5 M pH 8,8	-	2,6 mL
Tris 1 M pH 6,8	1 mL	-
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	1,3 mL	3,5 mL
Glicerol 50 %	-	0,0825 mL
SDS 10 %	0,08 mL	0,0825 mL
TEMED	0,008 mL	0,01 mL
APS 10 %	0,08 mL	0,05 mL

Tabla 1: Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación del gel de *stacking* y de resolución utilizados en la electroforesis del ensayo zimográfico

Previo a ser sembradas, las muestras de medio condicionado de cada condición experimental, fueron resuspendidas en buffer de muestra (SDS 15 % (v/v), glicerol 50 % (v/v) en Tris-HCl 0,4 M, pH: 6,8 conteniendo azul de bromofenol sin 2-mercaptoetanol) en una proporción 1:4 (buffer de muestra: muestra cruda).

La corrida electroforética fue realizada a voltaje constante de 90 V sobre el gel de *stacking* y de 180 V sobre el gel de resolución, durante aproximadamente 90 min. El buffer de electroforesis empleado se detalla en la Tabla 2.

Buffer de electroforesis (1X)
Tris Base 3 g
Glicina 14,4 g
SDS 10 % 10 mL
H ₂ O destilada hasta completar 1 L

Tabla 2. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación del buffer de electroforesis utilizado en el ensayo zimográfico.

Luego de la corrida electroforética se realizaron dos lavados de 10 min cada uno en agitación, con buffer de activación enzimática (Tritón X-100 2,5 % (v/v) en H₂O destilada) para eliminar el SDS presente, y un último lavado con PBS 1 X para eliminar el Tritón de los lavados anteriores. Los geles fueron incubados durante 24 h a 37 °C con agitación en buffer enzimático (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4 conteniendo NaCl 0,15 mM y CaCl₂ 30 mM). Luego, se removió la solución y el gel fue teñido con *Coomasie Brilliant Blue G-250* al 0,1 % (p/v) en metanol 30 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) hasta que la actividad gelatinolítica fue detectada por la presencia de bandas claras sobre un fondo azul.

Para la identificación de cada banda de degradación, correspondiente a MMP-2 y MMP-9 se utilizaron marcadores de peso molecular estándares comerciales preteñidos, considerando que el peso molecular de las metaloproteasas es de 72 y 92 kDa respectivamente. La intensidad de las bandas fue determinada con un transiluminador y analizadas con el programa de densitometría Fiji. Los datos fueron normalizados con la concentración de proteína total en el caso de las células MDA-MB-231, y con la cantidad de células por pocillo en el caso de las LM3. Los datos fueron presentados como porcentaje respecto al control, considerándose este el 100 %.

XI- Ensayo de adhesión celular.

Para realizar este ensayo, las células fueron previamente tratadas con la Fracción D de Maitake (concentración dependiente de la línea celular) o vehículo durante 12 h. Finalizado el tratamiento, las células se tripsinizaron y se sembró 10000 células/pocillo en placa de cultivo de 96 pocillos. La viabilidad de las células sembradas fue controlada mediante el empleo de azul de tripán (Sigma). La adhesión celular fue evaluada tras distintos tiempo de incubación: 30 min, 1 h, 2 h, 5 h, 8 h, 10 h y 12 h, destinando 3 pocillos para cada condición (Fracción D vs vehículo) en cada tiempo. Transcurrido cada horario, las células no adheridas a la placa fueron removidas del pocillo mediante tres lavados suaves con PBS 1 X. Por su parte, las células adheridas fueron fijadas con metanol 100 % (v/v) durante 10 min y luego teñidas con cristal violeta 0,1 % (p/v, Sigma) en metanol 20 % (v/v, en H₂O destilada) por 20 min a temperatura ambiente. Se aspiró el cristal violeta, se lavaron los pocillos con H₂O destilada para remover el exceso de colorante y se dejó secando la placa a 37 °C por 24 h. Al día siguiente, las células adheridas fueron observadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000S y fotografiadas con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio. Se tomaron 10 fotografías de campos seleccionados al azar en cada pocillo de cada condición y se cuantificaron las células empleando el programa de computación Fiji.

XII- Ensayo de invasión celular.

El ensayo de invasión consiste en colocar insertos de membrana de policarbonato (con poros de 12 μm de tamaño) en los pocillos de una placa de cultivo celular de 24 pocillos. La superficie superior de los insertos es recubierta con una capa uniforme de Matrigel[®]. Las células invasivas son capaces de degradar las proteínas de la matriz del Matrigel[®] y atravesar los poros de la membrana de policarbonato. Finalmente, las células que permanecen en la zona superior son removidas y las que lograron atravesar la membrana (invadir) son teñidas y cuantificadas.

Para realizar este ensayo se colocaron 0,6 mL de medio de cultivo correspondiente a la línea celular a ensayar, suplementado con antibiótico y suero según el requerimiento de la célula, en cada pocillo a utilizar de la placa de cultivo. En cada pocillo se colocó el inserto de policarbonato teniendo la precaución de dejarlo correctamente posicionado y se espero unos minutos para que el medio de cultivo contacte con el inserto. Luego se colocó 0,1 mL de Matrigel[®] (Becton Dickinson, diluido 1:3 en el medio de cultivo correspondiente libre de suero) en cada inserto de policarbonato y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se sembraron las células (12500-25000 células/pocillo) en la cámara superior de cada inserto, en un volumen final de 0,4 mL de medio completo conteniendo a la Fracción D (concentración correspondiente a cada línea) o vehículo. Luego de 12 o 16 h de incubación (según la línea celular) a 37 °C se retiraron los insertos, se lavaron suavemente con 1 mL de PBS 1 X, se fijaron en metanol 100 % (v/v) por 5 minutos (1mL/pocillo) y finalmente se tiñeron con cristal violeta 0,5 % (p/v, Sigma) en metanol 20 % (v/v) por 5 min. Luego se aspiró el cristal violeta, se lavaron los pocillos con H₂O destilada para remover el exceso de colorante y las células que habían quedado en la parte superior del inserto se removieron con un hisopo. Las células que atravesaron el inserto hacia la cara inferior de los mismos fueron observadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000S y fotografiadas con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio. Se tomaron 10 fotografías de campos seleccionados al azar y se

cuantificaron las células empleando el programa de computación Fiji. Cada ensayo se realizó por triplicado.

XIII- Inmunofluorescencia.

XIII.I- Preparación de las muestras.

Se realizó un cultivo celular sembrando 1×10^5 células LM3 o MDA-MB-231 en placas de 35 mm de diámetro conteniendo en ellas un cubreobjeto estéril. Las células se incubaron hasta alcanzar un 60 % de confluencia y se trataron con la Fracción D (concentración dependiente de la línea celular) o vehículo durante 12 h. Luego del tratamiento, las células fueron lavadas tres veces con 1,5 mL de PBS 1 X y fijadas con paraformaldehído (PFA) 4 % en PBS 1 X durante 1 h a temperatura ambiente. Nuevamente, se realizaron tres lavados con 1,5 mL de PBS 1X y se permeabilizaron las células con Tritón 0,1 % (Sigma) en PBS 1 X durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres nuevos lavados con 1,5 mL de PBS 1 X y se llevó a cabo la incubación en cámara húmeda con 150 μ L de una dilución 1/100 del anticuerpo primario faloidina-rodamina en PBS 1 X durante 30 min. A continuación las células se lavaron 2 veces con PBS 1 X durante 5 min y se realizó un tercer lavado con solución de DAPI (1:10000) en PBS 1 X también por 5 min. Se sumergieron los preparados en agua destilada para remover el exceso de DAPI, se secaron por unos segundos a temperatura ambiente y se prepararon con medio de montaje.

XIII.II- Microscopía.

Los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000S y fotografiados con una cámara digital Sony Coolpix acoplada al microscopio. Para cuantificar los lamelipodios/filopodios y la presencia/ausencia de fibras de estrés se analizaron 10 campos de 400 X seleccionados al azar, pero en los cuales las colonias celulares no fueran mayores a 15-20 células. La cuantificación se realizó sobre el microscopio y evaluando las células que se encontraban ubicadas en el borde de las colonias. Las fotos capturadas fueron procesadas con el programa de computación Fiji.

En el caso de las células MDA-MB-231, en las cuales lo evaluado fue la presencia/ausencia de fibras de estrés, se realizaron observaciones y se tomaron fotografías con un microscopio confocal (Leica TSP2). La preparación de las muestras para la observación en este microscopio fue exactamente igual a la descrita anteriormente, con la salvedad que para teñir los núcleos se utilizó en este caso TOPRO en lugar de DAPI.

XIV- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y *Western Blot* (WB).

XIV.I- Preparación de los lisados celulares.

Las distintas líneas celulares fueron sembradas y cultivadas hasta alcanzar un 60 % de confluencia. En este punto, se las trató con la Fracción D o vehículo en determinada concentración y tiempo. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se procedió con el lisado celular. Para esto, se retiró el medio de cultivo de las placas, se realizó un lavado con PBS 1 X, se removió completamente todo el líquido y se adicionó 75-150 μ L de buffer de lisis (2% Tris 1 M, 1% Tritón-X 100, EDTA 0,5 M, 2% NaCl 1 M) al cual se le agregó previamente el cóctel de inhibidores de proteasas en una concentración final de 1 X. A partir de ello y trabajando siempre sobre hielo, se levantaron las células con espátula y se colocaron en tubos eppendorf. La mezcla se dejó reposar durante 30 min en hielo para su lisado.

XIV.II- Medición de la concentración de proteínas.

Para la determinación de la concentración proteica se confeccionó una curva de calibrado constituida por cantidades crecientes de un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL en un volumen final de 1 mL de reactivo de Bradford (RB) (BioRad). Se leyeron las absorbancias de los estándares en un espectrofotómetro (Jasco) a 595 nm. Paralelamente, se

prepararon las muestras incógnitas por duplicado colocando 2 μ L de muestra más 998 μ L de RB. Sus absorbancias fueron leídas también a 595 nm.

XIV.III- Preparación de las muestras.

Se realizaron los cálculos necesarios para llevar el volumen del lisado a la concentración de proteínas deseada con buffer de lisis y buffer muestra 4 X (Tris 1 M 2,4 ml pH 6,8, SDS 0,8 g, glicerol 4 ml, 0,01 g azul de bromofenol, 1 ml 2-mercaptoetanol, H₂O destilada 2,8 ml). Finalmente se calentó la mezcla por 5 min a 90 °C. Los lisados se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

XIV.IV- Electroforesis.

Para la separación de proteínas por peso molecular se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12 % o 15 % según la proteína de interés. Para ello se preparó gel de *stacking* y de resolución como se indica en la Tabla 3.

Reactivos	Gel de <i>stacking</i>	Gel de resolución	Gel de resolución
	5 %	12 %	15 %
H ₂ O destilada	6,8 mL	8,2 mL	5,7 mL
Tris 1 M pH 6,8	1,25 mL	-	-
Tris 1,5 M pH 8,8	-	6,3 mL	6,3 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	1,7 mL	10,0 mL	12,5 mL
SDS 10 %	0,1 mL	0,25 mL	0,25 mL
TEMED	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
APS 10 %	0,1 mL	0,25 mL	0,25 mL

Tabla 3. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación del gel de *stacking* y de resolución utilizados en la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las muestras a sembrar, se calentaron a 90 °C durante 5 min, se vortexearon y se les realizó un pequeño *spin*. En una calle se sembró 10 µl de marcador de peso molecular (*See Blue Plus, Invitrogen*) y en las restantes 50-100 µg de proteínas según el caso a analizar. La separación de proteínas se realizó a amperaje constante de 0,04 A sobre el gel de *stacking* y de 0,06 A sobre el gel de resolución, hasta terminar la corrida. El buffer de electroforesis empleado se detalla en la Tabla 4.

Buffer de electroforesis (1 X)
Tris Base 3 g
Glicina 14,4 g
SDS 10 % 10 mL
H ₂ O destilada hasta completar 1 L

Tabla 4. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación del buffer de electroforesis utilizado en la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

XIV.V- Transferencia a membrana de PVDF.

Una vez concluida la separación electroforética una de las caras del gel fue apoyada sobre una membrana de polifluoruro de vinilideno (PDVF, Millipore), previamente activada con metanol por 1 min, ambos fueron colocados entre papeles de filtro previamente humedecidos en buffer de transferencia (Tabla 5) y a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cámara electroforética con buffer de transferencia 1 X, orientando la membrana de PVDF hacia el lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 0,3 A constante durante 90 min o 120 min dependiendo del peso de la proteína de interés.

Buffer de transferencia (1 X)
Tris Base 3 g
Glicina 14,4 g
Metanol 200 mL
H ₂ O destilada hasta completar 1 L

Tabla 5. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación del buffer de transferencia utilizado en la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con PBS 1 X durante 15 min, secadas y guardadas a 4 °C hasta su utilización.

XIV.VI- Inmunodetección de proteínas.

Las membranas fueron sumergidas en metanol por 1 min para su activación y luego lavadas en PBS 1 X. El bloqueo se realizó con leche descremada al 5 % en PBS 1 X y en agitación continua durante 30 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1 X de 5 min cada uno y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario en cámara fría y agitación continua durante toda la noche. El anticuerpo primario se preparó en solución de BSA 0,4 % en PBS 1 X. Luego se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con *Tween* 0,01 % en buffer Tris salino (TBS) 1 X e inmediatamente se incubó la membrana con la dilución adecuada del anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano picante. La dilución del anticuerpo secundario se realizó en leche descremada al 5 % en PBS 1 X y el tiempo de incubación fue de 90 min en agitación continua a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con *Tween* 0,01 % en TBS 1 X y se procedió a revelar las membranas.

Para el revelado se empleó el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (GE *Healthcare*) según las especificaciones indicadas por el proveedor. Para su uso posterior, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS 1 X, secadas y guardadas a 4 °C. Los anticuerpos primarios usados fueron policlonal de

conejo anti-ciclina D1 (*Thermo Scientific*, RM-9104-S1), policlonal de conejo anti-ciclina E (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-481), anti-E-cadherina (H-180) (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-7870) y anti- β -catenina (H-102) (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-7199). El anticuerpo policlonal de cabra anti- β -actina (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-1615) fue usado como control de carga.

XV- Modelo murino de xenotrasplante con células MDA-MB-231.

XV.I- Diseño experimental: estudio del efecto antitumoral de la Fracción D sobre tumores establecidos.

Para la obtención de este modelo se utilizaron 14 ratones N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* hembras vírgenes sanas de 9-10 semanas de edad y de 25 g de peso promedio. Estos animales fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, con ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con libre disponibilidad de alimento y agua. El cuidado y la manipulación de los ratones se realizaron de acuerdo con los lineamientos institucionales de buenas prácticas de trabajo con animales de laboratorio.

A los 63-70 días de edad se inyectó cada ratón en forma subcutánea con 10×10^6 células MDA-MB-231 en 150 μ L de medio RPMI libre de suero y antibiótico. De igual manera al experimental anterior, las células tumorales fueron implantadas a nivel de las glándulas mamarias inguinales, a fin de que el desarrollo tumoral tuviera el entorno más propicio. El implante de las células se llevó a cabo empleando jeringas de 1 mL con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 x 25 mm (21Gx1).

En 13 de los 14 ratones la implantación tumoral fue posible. Sin embargo el comportamiento de los tumores no fue el esperado, ya que se desarrollaron como una masa muy dispersa cuyo tamaño oscilaba e incrementaba solo ligeramente con el paso del tiempo. Estas características del modelo dificultaron, en primera instancia, la decisión del momento de inicio del

tratamiento. Establecido el comienzo, los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos: experimental (n=7) y control (n=6). Los ratones del grupo experimental fueron tratados con 21 mg/Kg de Fracción D de Maitake en 50 μ L de solución fisiológica. Cada ratón recibió 5 aplicaciones semanales durante 4 semanas y un día (21 dosis en total), administradas subcutáneamente en la periferia del tumor en desarrollo. Los ratones del grupo control fueron tratados con el vehículo de la Fracción D exactamente de la misma manera y durante el mismo tiempo. La dosis de Fracción D a inyectar en los animales se determinó en base a multiplicar por 10 a la IC₅₀ resultante de los ensayos de viabilidad realizados *in vitro* sobre la línea celular MDA-MB-231 (IC₅₀=1050 μ g/mL) (de Matos et al, 2012).

Antes de cada aplicación se midió con un calibre digital el diámetro mayor (A) y menor (B) del tumor, para estimar su volumen empleando la fórmula $\pi/6 \times A \times B^2$ (se asume un forma elipsoidal; Geran et al, 1972). Así como también se registró el peso de cada ratón en estudio y su comportamiento.

Luego de 21 dosis recibidas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación. El punto final del ensayo fue condicionado por el estado de los tumores de los animales.

El tumor obtenido por disección de cada animal fue pesado, fotografiado y medido en sus tres dimensiones: diámetro mayor (A), diámetro menor (B) y profundidad (C), para calcular su volumen multiplicando las tres medidas. El tumor fue fijado en formol al 10 % en PBS 1 X por 24 h para su posterior análisis histológico.

XVI- Modelo murino de trasplante singenético con células LM3.

XVI.I- Diseño experimental: estudio del efecto antitumoral de la Fracción D sobre tumores establecidos.

Para la obtención de este modelo se utilizaron 12 ratones BALB/c hembras vírgenes sanas de 9-10 semanas de edad y de 20 g de peso promedio. Estos animales fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, con ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con libre disponibilidad de alimento y agua. El cuidado y la manipulación de los ratones se realizaron de acuerdo con los lineamientos institucionales de buenas prácticas de trabajo con animales de laboratorio.

A los 63-70 días de edad se inyectó cada ratón en forma subcutánea con 4×10^5 células LM3 en 100 μ L de medio DMEM libre de suero y antibiótico. Se decidió implantar las células tumorales a nivel de las glándulas mamarias inguinales, a fin de que el desarrollo tumoral de las células LM3 tuviera el entorno más propicio. El implante de las células se llevó a cabo empleando jeringas de 1 mL con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 x 25 mm (21Gx1).

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medible con precisión (diámetro menor $> 0,2$ cm) los ratones fueron divididos en 2 grupos: experimental (n=5) y control (n=7). Los ratones del grupo experimental fueron tratados con 15,63 mg/Kg de Fracción D de Maitake en 50 μ L de solución fisiológica. Cada ratón recibió 5 aplicaciones semanales durante 4 semanas (20 dosis en total), administradas subcutáneamente en la periferia del tumor en desarrollo. Los ratones del grupo control fueron tratados con el vehículo de la Fracción D exactamente de la misma manera y durante el mismo tiempo. La dosis de Fracción D a inyectar en los animales se determinó en base a multiplicar por 10 a la IC_{50} resultante de los ensayos de viabilidad realizados *in vitro* sobre la línea celular LM3 ($IC_{50} = 570,6 \mu\text{g/mL}$) (de Matos et al, 2012)

Antes de cada aplicación se midió con un calibre digital el diámetro mayor (A) y menor (B) del tumor, para estimar su volumen empleando la

fórmula $\pi/6 \times A \times B^2$ (se asume un forma elipsoidal; Geran et al, 1972). Así como también se registró el peso de cada ratón en estudio y su comportamiento.

Luego de 20 dosis recibidas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación. El punto final del ensayo fue condicionado por el tamaño y estado de los tumores de los animales.

El tumor obtenido por disección de cada animal fue pesado, fotografiado y medido en sus tres dimensiones: diámetro mayor (A), diámetro menor (B) y profundidad (C), para calcular su volumen multiplicando las tres medidas. El tumor, hígado, bazo y riñones fueron fijados en formol al 10 % en PBS 1 X por 24 h para su posterior análisis histológico.

XVI.II- Diseño experimental: estudio del efecto preventivo de la Fracción D.

Para la obtención de este modelo se utilizaron 16 ratones Balb/c hembras vírgenes sanas de 6 semanas de edad y de 24 g de peso promedio. Estos animales fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los animales se mantuvieron bajos condiciones controladas de temperatura y humedad, con ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con libre disponibilidad de alimento y agua. El cuidado y la manipulación de los ratones se realizaron de acuerdo con los lineamientos institucionales de buenas prácticas de trabajo con animales de laboratorio.

Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos: 2 grupos experimentales (n=5 cada uno) y un grupo control (n=6). Los grupos experimentales fueron tratados con distintas dosis de Fracción D: 1,5 mg/Kg o 5 mg/Kg en 100 μ L de solución fisiológica. Cada ratón recibió 15 dosis diarias consecutivas, administradas intraperitonealmente. Los ratones del grupo control fueron tratados con solución fisiológica exactamente de la misma manera y durante el mismo tiempo. La dosis de Fracción D a inyectar en los

animales se determinaron en base a literatura previa (Nanba, 1995; Inoue et al, 2002)

En el día 16, luego del tratamiento con la Fracción D de Maitake o control, se inyectó cada ratón en forma subcutánea con 4×10^5 células LM3 en 100 μ L de medio DMEM libre de suero y antibiótico. De igual manera a los ensayos *in vivo* descritos anteriormente, las células tumorales fueron implantadas a nivel de las glándulas mamarias inguinales. El implante de las células se llevo a cabo utilizando jeringas de 1 mL con agujas hipodérmicas (BD) 0,80 x 25 mm (21Gx1).

Por examinación visual y palpación de la zona abdominal-inguinal se detectó y registró el momento (día) de la aparición tumoral. Se consideró tumor a un bulto cuyo diámetro menor superara 0,2 cm. Una vez detectado el tumor, se midió con un calibre digital su diámetro mayor (A) y menor (B), para estimar el volumen tumoral empleando la fórmula $\pi/6 \times A \times B^2$ (se asume un forma elipsoidal; Geran et al, 1972). También se registró el peso de cada ratón en estudio. Ambas mediciones se realizaron día por medio.

Luego de 30 días de la implantación de las células tumorales, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical según recomendaciones de la Guía de Buenas Prácticas con Animales de Experimentación. El punto final del ensayo fue condicionado por el tamaño y estado de los tumores de los animales.

XVII- Procesamiento de pulmones para cuantificación de metástasis.

Al momento de la disección de los animales los pulmones obtenidos de cada ratón fueron fijados en Bouin durante 24 h para su evaluación (Tabla 6) (Kim et al, 2011). Luego de las 24 h, se determinó el número de metástasis en la superficie de los lóbulos pulmonares de cada ratón utilizando una lupa Nikon SMZ1500 con cámara digital acoplada (Nikon ACT-1 Versión 2.63) para la adquisición fotográfica. Una vez realizado el conteo, los pulmones fueron procesados para su análisis histológico.

Fijador Bouin (pH 2,2)	
Solución acuosa sobresaturada de ácido pícrico 2g /100 mL	700 mL
Formol 40 %	250 mL
Ácido acético glacial (al momento de su utilización)	50 mL

Tabla 6. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación de la mezcla fijadora Bouin.

XVIII- Técnicas histológicas.

XVIII.I- Procesamiento de órganos y tumores para histología.

Los órganos y tumores de los ratones fueron recolectados durante la disección de cada animal, colocados en casetes individuales claramente rotulados y sumergidos inmediatamente en formol al 10 % en PBS 1 X durante 24 h. Luego fueron lavados bajo agua corriente durante 15 min, escurridos y colocados en concentraciones crecientes de alcohol (70 – 96 y 100 %) durante 90 min en cada una para lograr la deshidratación de la pieza. Posteriormente se colocaron en xilol por 90 min. Transcurrido este tiempo, se escurrieron y colocaron en recipientes contenedores de parafina a 56 °C durante 3 h. Finalmente se armaron los tacos de parafina y se rotularon.

Con el material ya incluido, se realizaron cortes de 0,5 µm de espesor de cada uno de los órganos empleando un micrótopo Leica RM 2145. Cada corte se colocó sobre el portaobjeto correspondiente, quedando listo para su coloración e inmunodetección.

XVIII.II- Coloración con Hematoxilina-Eosina (H&E).

Los cortes a colorear fueron sumergidos en xilol y se colocaron en estufa a 60 °C por 30 min para remover la parafina. Posteriormente, los cortes de tejido fueron rehidratados mediante su pasaje por una en una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100 - 96 y 70 %, 5 min en

cada una de ellas). Se realizó un lavado con H₂O destilada por 5 min y se colorearon con Hematoxilina (Tabla 7) durante 15 segundos, diferenciando luego el colorante con H₂O corriente. Posteriormente, los preparados fueron sumergidos en alcohol 80 % por 5 min y coloreados 30 segundos con Eosina (Tabla 7).

Hematoxilina según Harrys		Eosina	
Hematoxilina	5 g	Eosina	1 g
Alcohol 100°	50 mL	H ₂ O destilada	100 mL
Alumbre de K	100 g	Alcohol 96°	780 mL
H ₂ O destilada	920 mL	Floxina B (1g/100 mL H ₂ O _d)	10 mL
Óxido rojo de Hg	2,5 g	Ácido acético	4 mL
Ácido acético	30 mL		

Tabla 7. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación de Hematoxilina según Harrys y Eosina.

Luego se deshidrataron mediante el pasaje por soluciones alcohólicas crecientes (96 y 100 %, 15 segundos en cada una). Finalmente, se colocaron en xilol y se realizó en montaje en medio *Permount* (*Fisher Scientific*). Los preparados fueron observados con un microscopio vertical Olympus CX31 equipado con una cámara fotográfica Lumera Infinity Microscopy USB 2.0.

XVIII.III- Coloración Tricrómico de Masson.

Los cortes a colorear fueron sumergidos en xilol y se colocaron en estufa a 60 °C por 30 min para remover la parafina. Posteriormente, los cortes de tejido fueron rehidratados mediante su pasaje por una en una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100 - 96 y 70 %, 5 min en cada una de ellas). Se realizó un lavado con H₂O destilada por 5 min y se colorearon con Hematoxilina de Carazzi (Tabla 8) durante 10 min. Luego se sumergieron en H₂O destilada y se diferenció el colorante en una solución de carbonato de litio durante 2 min. Posteriormente, los preparados fueron sumergidos en fucsina ácida-ponceau de xilidina (1:25 en ácido acético 2 %)

(Tabla 8) por 1 min y lavados dos veces con H₂O destilada. Luego, se diferencié y mordenté con ácido fosfomolibdico 1% durante 6 min y sin lavado previo se coloreó con una solución a saturación de azul de anilina aproximadamente 1min. Se realizaron tres lavados con H₂O destilada.

Hematoxilina de Carazzi		Fucsina ácida-ponceau de xilidina	
Hematoxilina	0,5 g	Fucsina ácida	0,5 g
Alumbre de K	25 g	Ponceau de xilidina	1 g
Iodato de K	0,1 g	Orange G	1 g
Glicerina	100 mL	Ácido acético 2 %	150 mL
H ₂ O destilada	400 mL		

Tabla 8. Reactivos, con sus respectivas cantidades, empleados para la preparación de Hematoxilina de Carazzi y solución madre de Fucsina ácida-ponceau de xilidina.

Luego se deshidrataron mediante el pasaje por soluciones alcohólicas crecientes (96 y 100%, 15 segundos en cada una). Finalmente, se colocaron en xilol y se realizó en montaje en medio *Permount* (*Fisher Scientific*). Los preparados fueron observados con un microscopio vertical *Olympus CX31* equipado con una cámara fotográfica *Lumera Infinity Microscopy USB 2.0*. Se cuantificó el número de vasos de pequeño calibre (de formación reciente) en 8 campos consecutivos de 400x.

XVIII.IV- Evaluación del índice mitótico.

Sobre cortes de tumores incluidos en parafina y teñidos con H&E se determinó el índice mitótico. Para ello se contaron las figuras mitóticas típicas y atípicas presentes en 10 campos consecutivos de 400x. Este análisis fue realizado a ciegas por el médico patólogo Julián Arévalo.

XVIII.V- Inmunohistoquímica (IHQ).

Inicialmente, los preparados se sumergieron en xilol y se colocaron en estufa a 60 °C por 30 min para remover la parafina. Luego, fueron hidratados mediante su pasaje por una en una secuencia de soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100 y 96 %, 5 min en cada una de ellas). Seguido a esto, se realizó un lavado de 15 min en peróxido de hidrógeno 3 % (en alcohol al 96 %) con el fin de eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Los cortes fueron lavados con PBS 1 X por 15 min y luego incubados con una solución de BSA 2 % en PBS 1 X durante 30 min en una cámara húmeda. Sin un lavado previo, los cortes fueron cubiertos con el anticuerpo primario diluido en BSA 2 % (en PBS 1 X) e incubados en cámara húmeda a 4 °C durante la noche.

Al día siguiente, se realizó un lavado de 15 min en PBS 1 X, seguido de la incubación de los cortes con el anticuerpo secundario disuelto en BSA 2 % (en PBS 1X). La incubación se realizó durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se preparó el reactivo AB *Vectastain* (*Vector Laboratories*) en una dilución 1/50 en PBS 1 X, dejándolo reaccionar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min antes de su utilización. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, los preparados fueron lavados con PBS 1 X durante 15 min e incubados con el reactivo AB en (amplificador de la señal) en cámara húmeda, oscuridad y a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se realizó un lavado de 15 min con PBS 1 X y se preparó el reactivo de diaminobencidina (DAB, Sigma) de acuerdo a las especificaciones indicadas por el proveedor. Bajo microscopio óptico se agregó 200 µL del reactivo DAB sobre cada pieza de tejido, controlando el desarrollo de la reacción. Finalmente, como coloración de contraste se realizó una tinción con Hematoxilina de Harrys. Para esto, los cortes fueron lavados con PBS 1 X durante 5 min y coloreados con Hematoxilina, diferenciado luego el colorante con agua corriente. Los preparados fueron deshidrataron mediante el pasaje por soluciones alcohólicas crecientes (80 - 96 y 100 %, 5 min en cada una). Finalmente, se colocaron en xilol y se realizó en montaje en medio *Permount* (*Fisher Scientific*). Los preparados fueron observados con un

microscopio vertical *Olympus CX31* equipado con una cámara fotográfica *Lumera Infinity Microscopy USB 2.0*.

En todas las IHQ realizadas se trabajó con un control negativo, el cual fue procesado exactamente igual a lo descrito anteriormente, con la salvedad de no haber sido expuesto al anticuerpo primario.

Los anticuerpos primarios usados fueron: policlonal de cabra anti-Ki-67 (sc-7846), policlonal de conejo anti- Bax (sc-493), policlonal de conejo anti-e-caderina (H-108) (sc-7870) y policlonal de conejo anti-beta-catenina (H-102) (sc-7199), todos de Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*

XVIII.V.I- Evaluación de la inmunomarcación.

Para la semicuantificación de las IHQs se trabajó con el *score* inmunoreactivo (IRS). El IRS es el producto entre la intensidad de marcación y el porcentaje de las células marcadas. Para la intensidad de la marcación se consideró: 0 (negativo), 1 (marcación débil), 2 (marcación moderada) y 3 (marcación fuerte); mientras que para el porcentaje de células marcadas se consideró: 0 (0-10 %), 1 (11-25 %), 2 (26-75 %) y 3 (más del 75 %). Por ende, el IRS tiene un rango de 0 a 9. En todas las IHQs, se determinó el IRS en 10 campos al azar de 400x y se realizó el promedio. La expresión de Ki-67 fue evaluada considerando únicamente el porcentaje de células marcadas. En todos los casos la evaluación de la inmunomarcación fue realizada también por un compañero, el cual trabajó a ciegas.

XIX- Análisis estadístico.

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estándar de “n” experimentos independientes. Para el análisis de los ensayos de viabilidad, progresión del ciclo celular, apoptosis por citometría de flujo, migración, adhesión, y cambios en el volumen tumoral en función del tiempo, se realizó un ANOVA de dos vías con posterior test de Bonferroni para la comparación de los grupos. Para el ensayo de apoptosis por

microscopía se empleó un Chi cuadrado. Los ensayos sobre el citoesqueleto de actina, invasión celular y WB fueron analizados mediante el test de *Student*. Finalmente, para las inmunomarcaciones, neoangiogénesis y los ensayos con modelos animales en los que se determinó peso, volumen tumoral, y número de metástasis se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney.

Todos los análisis fueron realizados utilizando el *software* GraphPad Prism 5 (San Diego California USA). Los valores $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Capítulo I- La Fracción D modula la expresión génica de células tumoraes.

I.I- Análisis de la expresión génica inducida por la Fracción D en células tumorales.

La tecnología de microarreglo de ADNc permite monitorear de manera simultánea el nivel de expresión de miles de genes bajo una condición particular (Babu, 2004). La naturaleza poligénica del cáncer convierte a la enfermedad en un buen candidato para ser estudiado bajo el enfoque global del microarreglo (Grant et al, 2004). Es así como en el campo de la oncología, el empleo de microarreglos ha permitido monitorear amplificaciones o deleciones de regiones genómicas, clasificar a los tumores, descubrir y desarrollar nuevas drogas, detectar mutaciones e investigar mecanismos implicados en el desarrollo tumoral (Cooper, 2001).

Con el objetivo de contrastar la parte de la hipótesis que propone que: “la Fracción D de Maitake es capaz de actuar sobre células tumorales mamarias independientemente del sistema inmune”, empleamos microarreglos de ADNc para detectar el perfil de expresión génica inducido por la Fracción D en células MCF-7.

Como se describe en la sección de Materiales y Métodos, consideramos que un gen resultó significativamente sobreexpresado por la Fracción D cuando el Log_2 de la expresión relativa del gen fue ≥ 2 ; mientras que un Log_2 de la expresión relativa del gen ≤ -2 fue indicativo de disminución de la expresión génica. Bajo este criterio y garantizando un cambio de expresión de factor 4 (Babu, 2004; Guo et al, 2011), detectamos que la Fracción D de Maitake modificó significativamente la expresión de 396 genes, de 25.000 analizados, de los cuales 385 resultaron sobreexpresados y 11 disminuidos en su expresión.

Posteriormente, y con el fin visualizar los potenciales mecanismos de acción del proteoglicano sobre las células tumorales MCF-7, decidimos vincular cada uno de los genes con la función biológica a la cual se asocia. Como se observa en la Figura 14, de los 385 genes sobreexpresados 83

resultaron estar relacionados con distintas vías de transducción de señales y regulación de la transcripción, 57 con el metabolismo celular, 33 con el procesamiento del ARN, 32 con el transporte de biomoléculas. Veintisiete resultaron estar vinculados con el transporte electrónico e iónico, 22 con la fosforilación/desfosforilación de proteínas, 21 con la síntesis de biomoléculas y organelas, 20 con la adhesión intercelular, adhesión de las células a la matriz extracelular (MEC), migración y metástasis. Otros 19 genes resultaron implicados con la apoptosis, 18 con el crecimiento y proliferación celular, 16 con la ubiquitinización/deubiquitinización, 10 con la proteólisis, 6 con la modificación de la cromatina y ensamblaje de nucleosomas. Cinco de los genes sobreexpresados resultaron tener una función supresora tumoral. Otros 5 resultaron vinculados con la organización del citoesqueleto y 3 al plegamiento de proteínas. De los restantes, 3 resultaron vinculados con la autofagia, otros 3 con la replicación/reparación del ADN y 2 asociados a una función antioxidante.

Por otro lado, de los 11 genes subexpresados por la Fracción D 6 resultaron estar relacionados con vías de transducción de señales y regulación de la transcripción, 2 con la proteólisis, 2 con la adhesión intercelular, adhesión de las células a la MEC, migración y metástasis y el restante con el procesamiento del ARN (Figura 14).

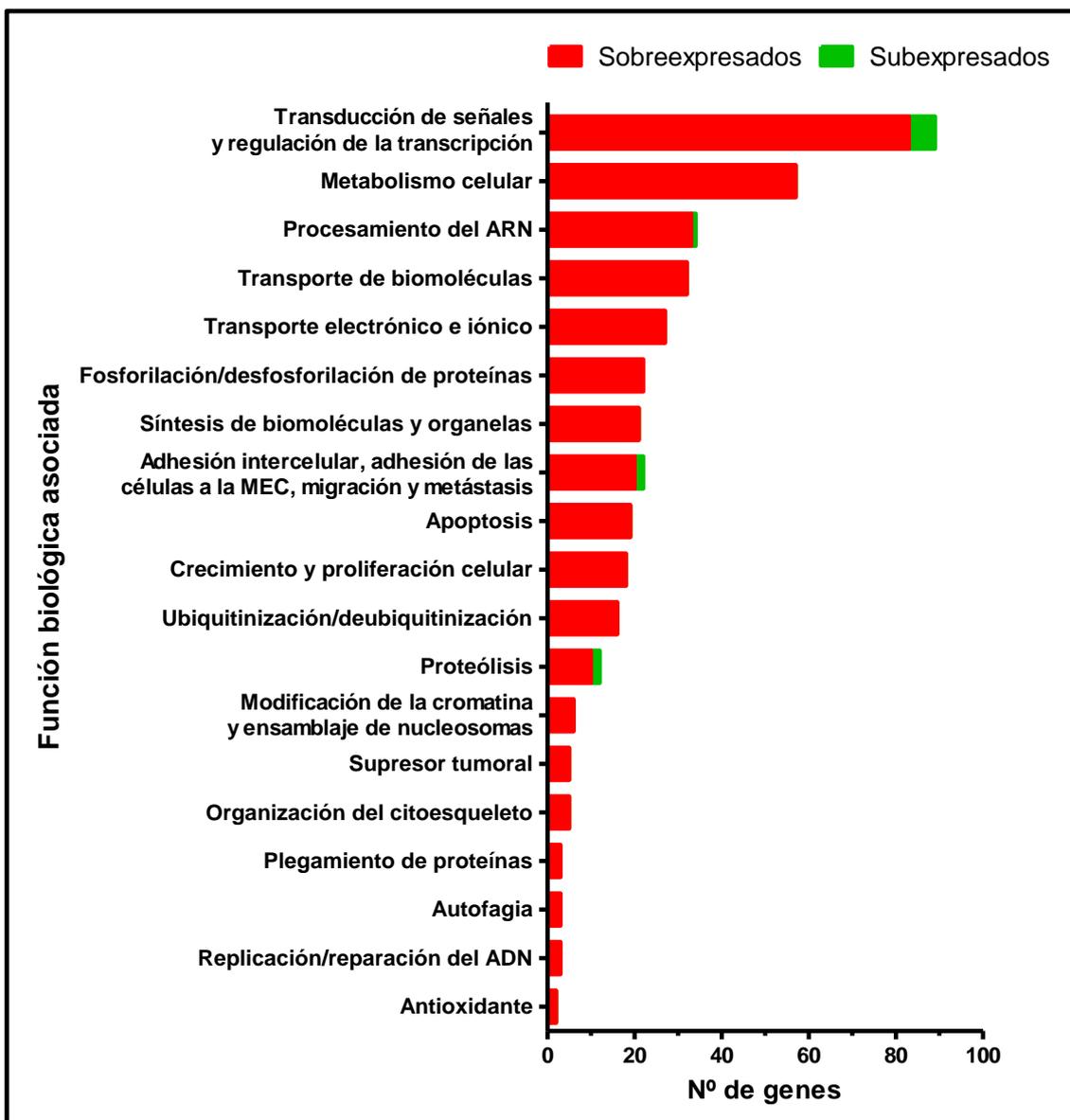


Figura 14. Efecto de la Fracción D sobre la expresión génica en células MCF-7. Las células fueron tratadas con la Fracción D de Maitake o no tratadas (control) como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Se emplearon microarreglos de ADNc para monitorear el nivel de expresión de 25.000 genes. Los microarreglos fueron analizados y normalizados utilizando *Nexus Expression Software (Biodiscovery)*. En el gráfico se muestra el número de genes que resultaron sobreexpresados o subexpresados por el tratamiento con la Fracción D, agrupados según la función biológica con la cual se asocian.

Estos resultados permiten decir que la Fracción D de Maitake ejerce un efecto sobre los procesos celulares y moleculares que se sabe que se encuentran alterados en las células cancerosas, modulando su perfil de expresión génica. A su vez, las funciones biológicas vinculadas a los genes diferencialmente expresados dan indicio de los procesos sobre los cuales la

Fracción D podría estar operando para ejercer un hipotético efecto antitumoral y antimetastásico. Es factible que dicho efecto resulte del balance funcional entre los genes vinculados principalmente con el crecimiento y la proliferación celular (Tabla 9.A), con la apoptosis (Tabla 9.B), con la adhesión intercelular, adhesión de las células a la MEC, migración y metástasis (Tabla 9.C), y con la supresión tumoral (Tabla 9.D).

Tabla 9: Lista de genes sobreexpresados y subexpresados por la Fracción D vinculados a las funciones biológicas que normalmente se encuentran desreguladas en el cáncer. La expresión diferencial de cada gen está dada por el Log_2 de la expresión relativa del gen (expresión bajo tratamiento/expresión bajo condición control).

A. Crecimiento y proliferación celular.

Número	Símbolo del gen	Nombre del gen	Expresión diferencial
1	<i>RGC32</i>	<i>Response gene to complement 32</i>	6,21
2	<i>SCC-112</i>	<i>SCC-112 protein</i>	5,44
3	<i>IGFBP5</i>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 5</i>	5,21
4	<i>ARHGEF1</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1</i>	5,03
5	<i>RBBP4</i>	<i>Retinoblastoma binding protein 4</i>	4,70
6	<i>PAPPA2</i>	<i>Pappalysin 2</i>	4,66
7	<i>CDC37</i>	<i>CDC37 cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)</i>	4,65
8	<i>IGF1R</i>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>	4,31
9	<i>TGFB3</i>	<i>Transforming growth factor, beta 3</i>	3,98
10	<i>CDK6</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>	3,91
11	<i>FGFRL1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor-like 1</i>	3,83
12	<i>IGFBP7</i>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 7</i>	3,67
13	<i>BCL3</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 3</i>	3,46
14	<i>GSK3A</i>	<i>Glycogen synthase kinase 3 alpha</i>	3,39
15	<i>RPS6KA3</i>	<i>Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3</i>	3,38
16	<i>CDKN1B</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>	3,28
17	<i>CAV1</i>	<i>Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa</i>	2,91
18	<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1</i>	2,82

B. Apoptosis.

Número	Símbolo del gen	Nombre del gen	Expresión diferencial
1	<i>IER3</i>	<i>Immediate early response 3</i>	6,48
2	<i>SEMA6A</i>	<i>Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain</i>	5,54
3	<i>BCLAF1</i>	<i>BCL2-associated transcription factor 1</i>	5,43

4	<i>SIRT4</i>	<i>Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 4 (S. cerevisiae)</i>	5,06
5	<i>BIRC1</i>	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 1</i>	4,71
6	<i>BCL2L2</i>	<i>BCL2-like 2</i>	4,02
7	<i>FADD</i>	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>	3,87
8	<i>CCAR1</i>	<i>Cell division cycle and apoptosis regulator 1</i>	3,76
9	<i>APIP</i>	<i>APAF1 interacting protein</i>	3,64
10	<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	3,47
11	<i>BCL2L13</i>	<i>BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)</i>	3,40
12	<i>BIRC3</i>	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3</i>	3,36
13	<i>ANKHD1</i>	<i>Ankyrin repeat and KH domain containing 1</i>	3,23
14	<i>BID</i>	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	3,08
15	<i>NGFR</i>	<i>Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)</i>	3,03
16	<i>TNFRSF19</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19</i>	2,89
17	<i>TNFAIP8</i>	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8</i>	2,65
18	<i>PPP1R13B</i>	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B</i>	2,20
19	<i>BAK1</i>	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>	2,18

C. Adhesión intercelular, adhesión de las células a la MEC, migración y metástasis.

Número	Símbolo del gen	Nombre del gen	Expresión diferencial
1	<i>PKP4</i>	<i>Plakophilin 4</i>	5,53
2	<i>ADAMTSL4</i>	<i>ADAMTS-like 4</i>	5,53
3	<i>SGCE</i>	<i>Sarcoglycan, epsilon</i>	5,28
4	<i>LAMB1</i>	<i>Laminin, beta 1</i>	5,04
5	<i>PKP1</i>	<i>Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)</i>	4,55
6	<i>COL21A1</i>	<i>Collagen, type XXI, alpha 1</i>	4,55
7	<i>MMP9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B)</i>	4,47
8	<i>ITGA2</i>	<i>Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)</i>	4,05
9	<i>PCDH17</i>	<i>Protocadherin 17</i>	3,63
10	<i>HN1</i>	<i>Hematological and neurological expressed 1</i>	3,51
11	<i>ITGA9</i>	<i>Integrin, alpha 9</i>	3,35
12	<i>VEZT</i>	<i>Vezatin, adherens junctions transmembrane protein</i>	3,28
13	<i>FNDC3B</i>	<i>Fibronectin type III domain containing 3B</i>	3,16
14	<i>LAMA1</i>	<i>Laminin, alpha 1</i>	3,13
15	<i>NUPR1</i>	<i>Nuclear protein 1</i>	2,93
16	<i>TSPAN4</i>	<i>Tetraspanin 4</i>	2,66
17	<i>SMOC2</i>	<i>SPARC related modular calcium binding 2</i>	2,51
18	<i>HD</i>	<i>Huntingtin (Huntington disease)</i>	2,32
19	<i>MTSS1</i>	<i>Metastasis suppressor 1</i>	2,28
20	<i>S100A8</i>	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	2,00
21	<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	-2,22
22	<i>CLDN1</i>	<i>Claudin 1</i>	-2,75

D. Supresión tumoral.

Número	Símbolo del gen	Nombre del gen	Expresión diferencial
1	<i>SFRP1</i>	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>	2,96
2	<i>AXUD1</i>	<i>AXIN1 up-regulated 1</i>	2,88
3	<i>BRCA2</i>	<i>Breast cancer 2, early onset</i>	5,06
4	<i>RASSF2</i>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2</i>	4,62
5	<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	3,27

Estos resultados constituyen la primera evidencia firme de que la Fracción D del Maitake, independientemente de su efecto sobre el sistema inmunológico, tiene efectos directos sobre la expresión de genes cuyos productos están implicados en funciones celulares y moleculares que se sabe que deben desregularse para que se produzca el cáncer. Surge entonces la necesidad de demostrar el efecto de esta fracción sobre los mismos procesos celulares y moleculares señalados y determinar, hasta donde sea posible, si el resultado final del efecto de dicha fracción es inductor o inhibidor de la carcinogénesis y la progresión tumoral.

Capítulo II- Efectos de la Fracción D sobre los sellos distintivos del cáncer.

Habiendo demostrado que la Fracción D de Maitake es capaz de encender o apagar la expresión de determinados genes, muchos de ellos vinculados con funciones biológicas normalmente desreguladas en el cáncer, nos propusimos investigar si tal modulación génica es capaz de afectar la progresión tumoral. Para ello, comenzamos evaluando directamente el efecto de la Fracción D sobre dichas funciones biológicas.

II.I- Efecto de la Fracción D sobre la viabilidad celular.

II.I.I- Estudio en células de adenocarcinoma mamario.

Una de las características distintivas de las células tumorales es su habilidad para proliferar constantemente, generando sus propias señales de crecimiento, siendo insensibles a las señales antiproliferativas y evadiendo la apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2000). Es por ello que al comenzar a evaluar el efecto antitumoral de una sustancia uno de los primeros estudios que normalmente se llevan a cabo son los ensayos de viabilidad celular.

Para evaluar el efecto de la Fracción D sobre la viabilidad de las distintas líneas celulares utilizamos la técnica de conteo manual en cámara de Neubauer y el ensayo colorimétrico de WST-1. El conteo manual se empleó para evaluar el efecto de la Fracción D sobre la viabilidad celular en un rango amplio de concentración y tiempo; mientras que el WST-1 se utilizó para validar los resultados obtenidos por conteo manual.

Se realizaron ensayos tiempo- dosis- respuesta en las líneas tumorales LM3 (murina, hormono independiente) y MDA-MB-231 (humana, triple negativa). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Fracción D: 30, 300, 750, 1500, 2250 y 3000 $\mu\text{g/mL}$, durante distintos tiempos de tratamiento: 24, 48, 72 h. Estas condiciones de tratamiento fueron elegidas en base a literatura previa, procurando abarcar las condiciones empleadas sobre otras líneas celulares (Fullerton et al, 2000; Konno, 2004; Konno, 2007; Soares et al, 2011; Alexander et al, 2013; Degen et al, 2013).

En las células LM3 se observó que la Fracción D de Maitake disminuye significativamente el número de células luego de 24 h de tratamiento y a partir de una concentración mínima efectiva de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al prolongar la duración del tratamiento, se pone de manifiesto un efecto dependiente del tiempo de tratamiento, ya que la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que no tuvo efecto a las 24 y 48 h resultó efectiva a las 72 h de tratamiento (Figura 15 A). Sobre las células MDA-MB-231, la Fracción D también provocó una disminución de la viabilidad celular a partir de las 24 h de tratamiento, pero en esta línea celular la concentración mínima efectiva fue 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mayor que la observada en la línea murina LM3. Nuevamente se observó un efecto dependiente de la concentración y el tiempo de tratamiento (Figura 15 B).

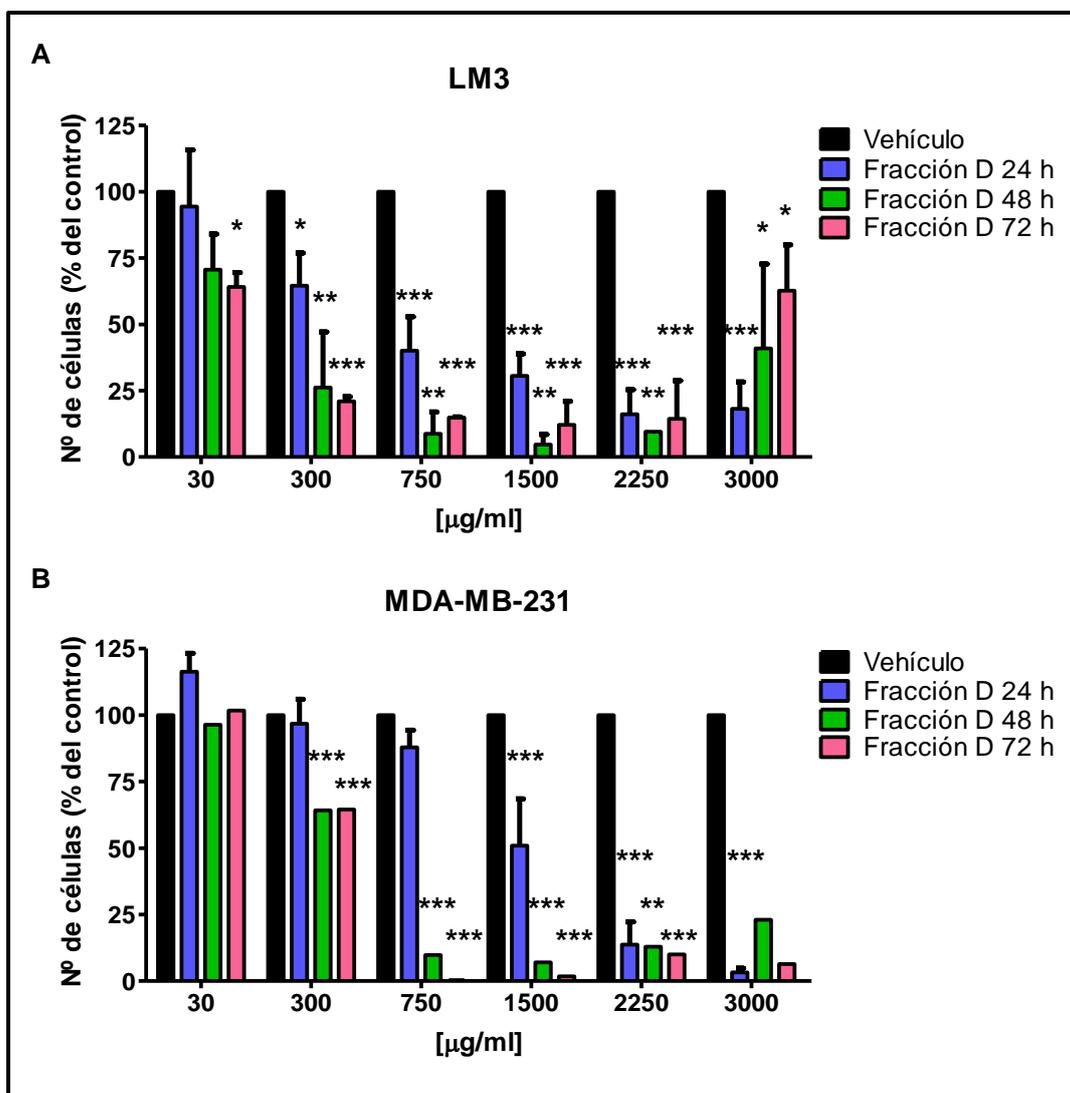


Figura 15. Efecto de la Fracción D de Maitake sobre la viabilidad celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231 evaluado por conteo manual en cámara de Neubauer. Células LM3 (A) y

MDA-MB-231 **(B)** tratadas con distintas concentraciones de Fracción D de Maitake y por distintos tiempos. El número de células fue obtenido por conteo manual en cámara de Neubauer y expresado como porcentaje del respectivo control. Media de al menos dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado \pm SEM. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A partir de estos ensayos de viabilidad celular fue posible calcular la IC_{50} de la Fracción D en función del tiempo de tratamiento para cada línea celular. Para ello se utilizó la ecuación de dosis- respuesta sigmoidea empleando el programa estadístico *GraphPad Prism 5.00* para *Microsoft Windows* (Tabla 10). Teniendo presentes los valores de IC_{50} se puede decir que la viabilidad de las células LM3 resultó más sensible a la Fracción D de Maitake, siendo esto evidente en mayor medida a las 24 h de tratamiento. En cambio, para producir el mismo efecto sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231 fue necesario prácticamente duplicar la concentración de Fracción D.

Línea	LM3	MDA-MB-231
Tiempo (h)	[$\mu\text{g/mL}$]	[$\mu\text{g/mL}$]
24	570,6	1050
48	274,4	322,2
72	210,75	238,2

Tabla 10. Valores de IC_{50} [$\mu\text{g/mL}$] de la Fracción D de Maitake para cada línea celular tumoral en función al tiempo de tratamiento. Los valores de IC_{50} fueron calculados utilizando la ecuación de dosis-respuesta sigmoidea.

Dado que el efecto de la Fracción D sobre la viabilidad de las dos líneas celulares tumorales fue evidente desde las 24 h de tratamiento, decidimos emplear este tiempo para validar por ensayo colorimétrico de WST-1 los resultados obtenidos previamente por conteo manual. Como se puede observar en la Figura 16, sobre las dos líneas se detectó una disminución de la absorbancia en función de la concentración luego de 24 h de tratamiento con la Fracción D de Maitake. Los resultados obtenidos mediante este ensayo mostraron la misma tendencia que la detectada por conteo manual bajo cámara de Neubauer para cada una de las líneas celulares.

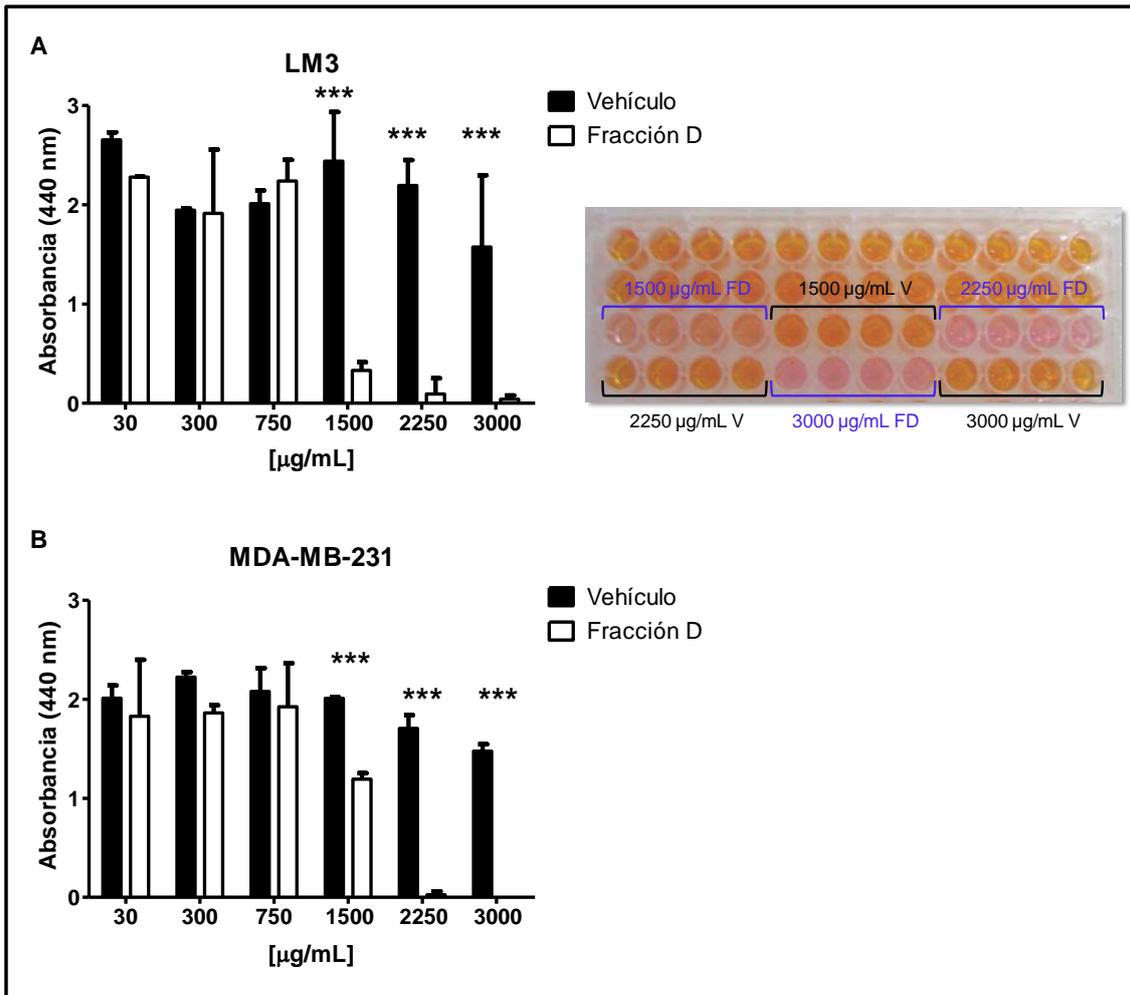


Figura 16. Efecto de la Fracción D de Maitake sobre la viabilidad celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231 evaluado por ensayo colorimétrico de WST-1. Células LM3 (A) y MDA-MB-231 (B) tratadas con las concentraciones indicadas de Fracción D de Maitake por 24 h. Luego de 1 h de incubación con el reactivo WST-1, se midió la absorbancia a 440 nm. Media de cuatro réplicas \pm SD. El ensayo fue repetido dos veces para cada línea celular. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$. Se muestra imagen de uno de los ensayos de WST-1 correspondiente a la línea celular LM3, previo a la medición de la absorbancia. Sobre el plato de cultivo sólo se indican las concentraciones que resultaron significativas (FD = Fracción D; V = Vehículo)

II.I.II- Estudio en células mamarias no malignas.

Las células epiteliales mamarias HC11 originadas a partir de ratones BALB/c en mitad de la gestación (Williams et al, 2009) representan una contraparte no maligna de la línea tumoral LM3, originada también a partir de ratones BALB/c. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la Fracción D de Maitake disminuyó la viabilidad de las células tumorales LM3, decidimos evaluar si el

proteoglucano ejerce un efecto diferencial sobre la viabilidad de células no malignas. Para ello, células HC11 fueron tratadas con las mismas concentraciones de Fracción D: 30, 300, 750, 1500, 2250 y 3000 $\mu\text{g/mL}$ y durante los mismos tiempos de tratamiento: 24, 48, 72 h que en el caso de las células tumorales. Nuevamente, se comenzó evaluando el efecto por conteo manual en cámara de Neubauer y se prosiguió con el ensayo colorimétrico.

Como se observa en la Figura 17, luego de 24 horas de tratamiento, sólo la mayor concentración de Fracción D evaluada (3000 $\mu\text{g/mL}$) disminuyó significativamente el número de células HC11 con respecto al control. Para este tiempo de tratamiento, la IC_{50} resultante en la línea no maligna fue 1819,5 $\mu\text{g/mL}$, es decir 3,19 veces mayor que la IC_{50} correspondiente para las células tumorales LM3. Esto demuestra un potencial efecto diferencial de la Fracción D de Maitake entre células tumorales y células no malignas. Para 48 y 72 h de tratamiento, la IC_{50} resultante fue de 478,8 $\mu\text{g/mL}$ y 279 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

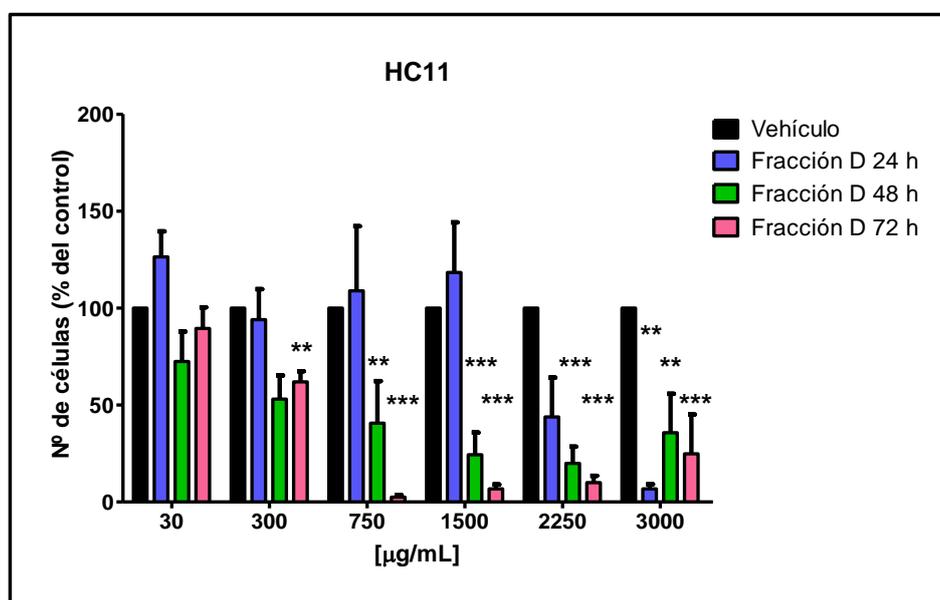


Figura 17. Efecto de la Fracción D de Maitake sobre la viabilidad celular de la línea no maligna HC11 evaluado por conteo manual en cámara de Neubauer. Células HC11 tratadas con distintas concentraciones de Fracción D de Maitake y por distintos tiempos. El número de células fue obtenido por conteo manual en cámara de Neubauer y expresado como porcentaje del respectivo control. Media de al menos dos experimentos independientes

realizados por cuadruplicado \pm SEM. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

El ensayo colorimétrico de WST-1 reveló la misma tendencia en el efecto de la Fracción D sobre la viabilidad de las células no malignas HC11 que la detectada por conteo manual bajo Cámara de Neubauer (Figura 18).

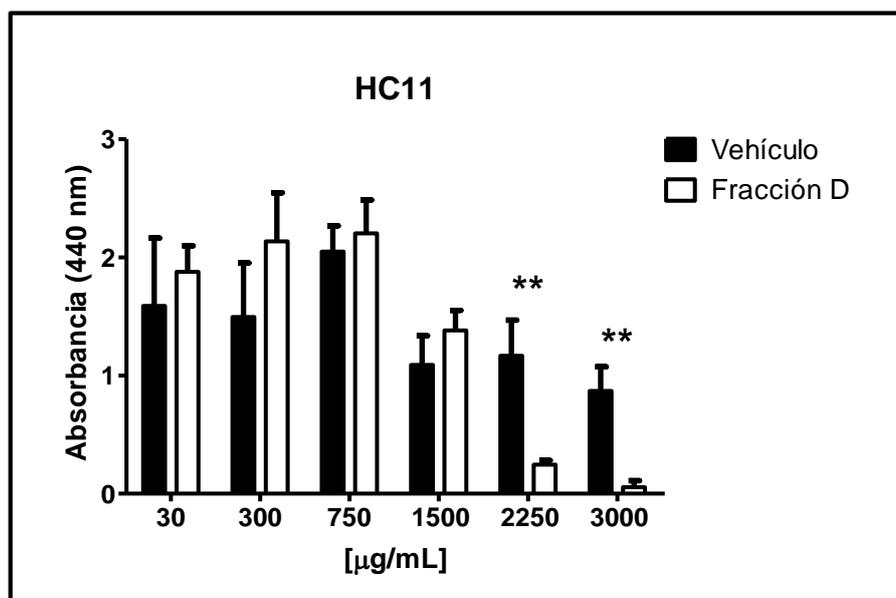


Figura 18. Efecto de la Fracción D de Maitake sobre la viabilidad celular de la línea HC11 evaluado por ensayo colorimétrico de WST-1. Células HC11 tratadas con las concentraciones indicadas de Fracción D de Maitake por 24 h. Luego de 1 h de incubación con el reactivo WST-1 se midió la absorbancia a 440 nm. Media de cuatro réplicas \pm SD. El ensayo fue repetido dos veces. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. ** $p < 0,01$.

II.II- Efecto de la Fracción D sobre la progresión del ciclo celular.

La progresión del ciclo celular es un evento biológico que se encuentra altamente regulado en las células normales, pero se convierte en un evento aberrante o desregulado en las células neoplásicas (Singh & Agarwal, 2006). Mientras que las células normales sólo son capaces de abandonar un estado quiescente (reposo) e ingresar en un estado de proliferación activa luego de recibir una señal mitogénica, las células tumorales proliferan descontroladamente tras adquirir autonomía proliferativa e insensibilidad a las señales de salida del ciclo celular (dos capacidades adquiridas) (Hanahan & Weinberg, 2000). En este contexto interrumpir la progresión del ciclo celular

es una estrategia efectiva para limitar el crecimiento tumoral (Benada & Macurek, 2015).

Teniendo en cuenta que la Fracción D de Maitake disminuyó la viabilidad de las células tumorales LM3 y MDA-MB-231, nos propusimos investigar si este efecto era producto de un arresto del ciclo celular. Para ello, analizamos por citometría de flujo la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo usando la tinción con IP. El tratamiento de las células LM3 con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 24 h) produjo una disminución del número de células en fase G_0/G_1 en comparación con el vehículo (Fracción D = 41,89 % vs vehículo = 58,65 %). Esta disminución fue acompañada por un aumento del número de células en fase sub G_0/G_1 (Fracción D = 23,91 % vs vehículo = 10,76 %) (Figura 19).

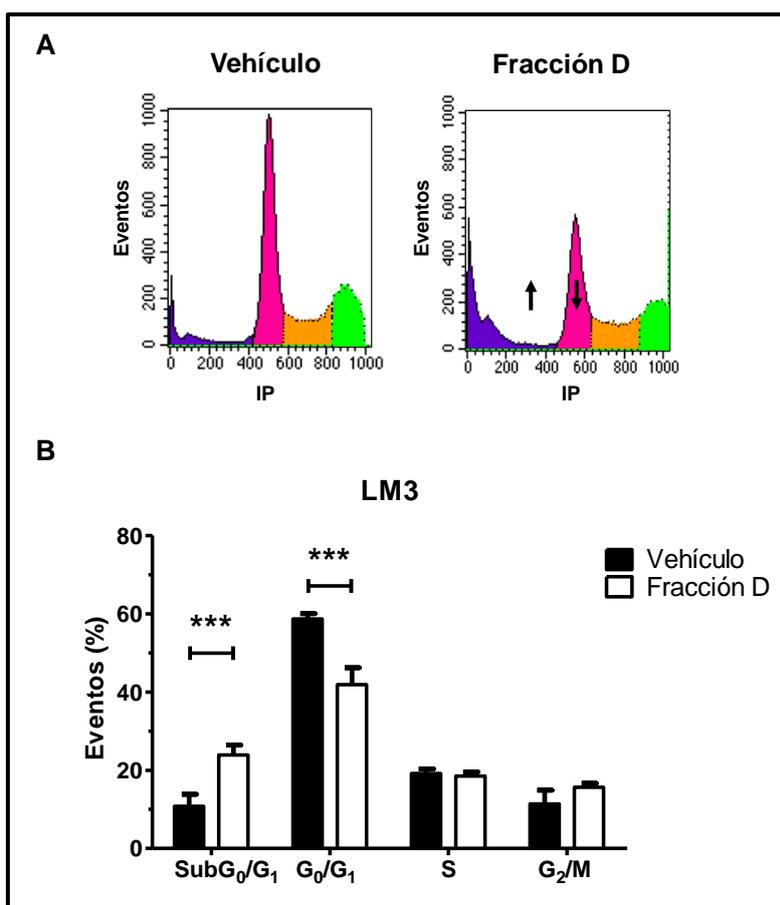


Figura 19. Efecto de la Fracción D sobre el ciclo celular en la línea LM3. Las células fueron tratadas con Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo por 24 h. **A.** Distribución de la población celular analizada por citometría de flujo luego de la tinción con IP. Las flechas indican el incremento de la población celular en fase sub G_0/G_1 y la disminución en fase G_0/G_1 producido

por la Fracción D en comparación con el vehículo. **B.** El gráfico representa el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. El ensayo fue realizado por triplicado. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Sobre las células MDA-MB-231 se observó un efecto similar. El tratamiento de dichas células con la Fracción D (1050 $\mu\text{g/mL}$; 24 h) produjo una disminución del número de células en fase G_0/G_1 (Fracción D = 48,59 % vs vehículo = 75,41 %) acompañada de un aumento de la población celular en sub G_0/G_1 (Fracción D = 8,92 % vs vehículo = 0,96 %), en comparación con el vehículo (Figura 20).

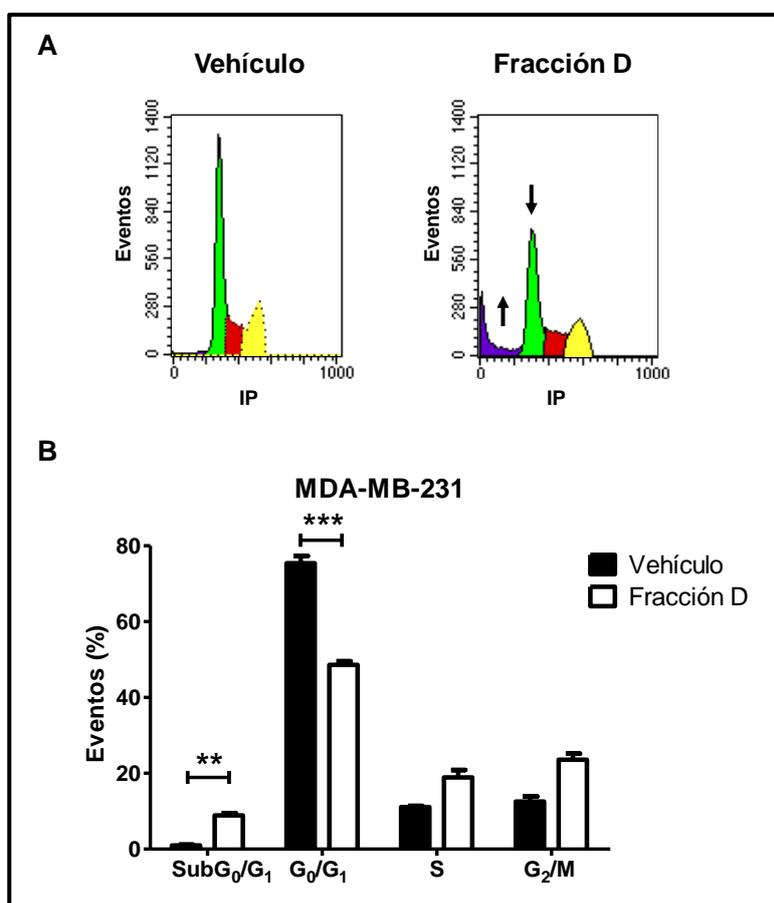


Figura 20. Efecto de la Fracción D sobre el ciclo celular en la línea MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con Fracción D (1050 $\mu\text{g/mL}$) o vehículo por 24 h. **A.** Distribución de la población celular analizada por citometría de flujo luego de la tinción con IP. Las flechas indican el incremento de la población celular en fase sub G_0/G_1 y la disminución en fase G_0/G_1 producido por la Fracción D en comparación con el vehículo. **B.** El gráfico representa el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. El ensayo fue realizado por triplicado. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A pesar de que este análisis del ciclo celular por medio de la técnica de citometría de flujo no mostró indicios de que el tratamiento con la Fracción D del Maitake esté afectando la proliferación celular, igualmente se decidió evaluar el efecto de dicho extracto sobre el nivel de expresión de dos ciclinas importantes en la regulación del ciclo celular como son la Ciclina D y E. Observamos que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con el proteoglucano (1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no afecta la expresión de la ciclina D, en comparación con el vehículo (Figura 21). En cuanto a la ciclina E, se detectó una disminución de su expresión a las 24 h de tratamiento con la Fracción D (Figura 21). Al igual que en las células MDA-MB-231, en las células LM3 el tratamiento con la Fracción D produjo una disminución en los niveles de ciclina E, sin afectar los niveles de ciclina D (gráficos no presentados). Sin embargo, como ya se describió, la disminución en los niveles de ciclina E observada en ambas líneas celulares, no se tradujo en un cambio en la proliferación celular tal como fue estudiada por citometría de flujo.

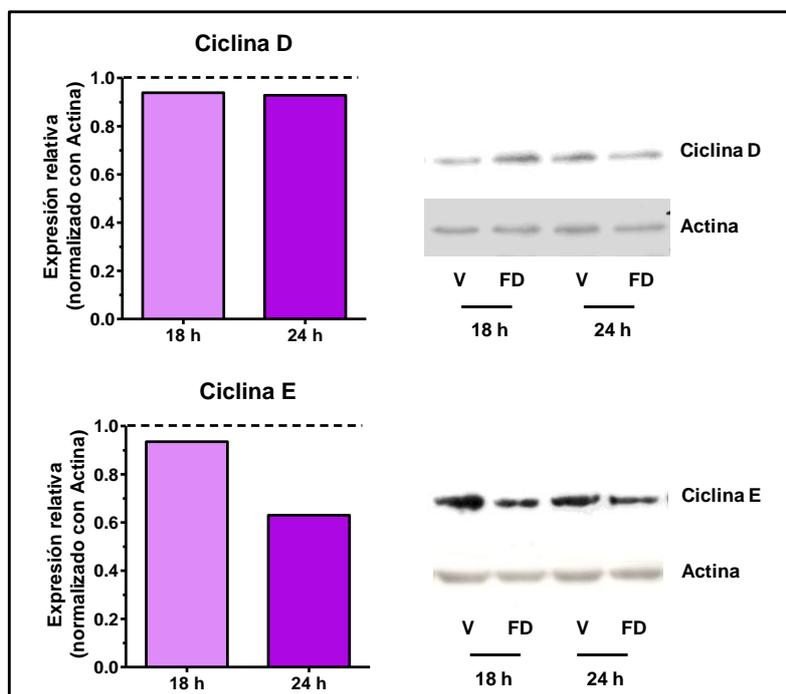


Figura 21. Efecto de la Fracción D sobre la expresión de ciclinas en la línea célula MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con Fracción D (1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo por 18 y 24 h. Se evaluó por WB la expresión de Ciclina D y Ciclina E. El gráfico de barras muestra la correspondiente densitometría de bandas. Los resultados fueron normalizados con actina y se expresan en relación al control (línea punteada). V = vehículo; FD= Fracción D.

Estos resultados demuestran que la disminución de la viabilidad celular producida por la Fracción D de Maitake en las líneas LM3 y MDA-MB-231 no es producto de un arresto del ciclo celular (disminución de la proliferación). En su lugar, el análisis de ciclo celular sugiere que la Fracción D aumenta la muerte celular en ambas líneas tumorales.

II.III- Efecto de la Fracción D sobre la muerte celular.

Con el objeto de corroborar si el incremento de la población celular en subG₀/G₁ producido por el tratamiento con la Fracción D es consecuencia de un aumento de muerte celular por apoptosis, comenzamos realizando una marcación de las células con AV para su cuantificación por microscopía de fluorescencia. Para ello, células LM3 fueron tratadas con la Fracción D (570,6 µg/mL) o vehículo por 24 h, y teñidas con AV. Al realizar la cuantificación, se observó que el tratamiento con la Fracción D incrementó el número de células AV+, en comparación con el vehículo (Figura 22).

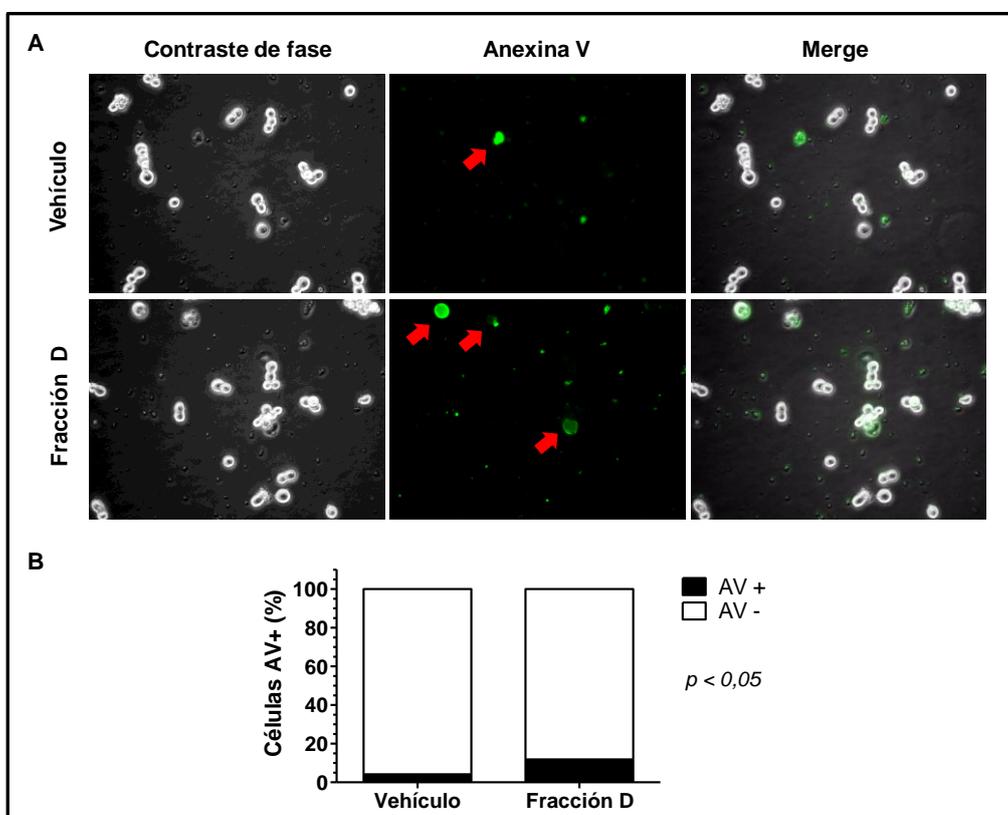


Figura 22. Cuantificación por microscopía de fluorescencia de las células LM3 marcadas con AV. Las células LM3 fueron tratadas con la Fracción D (570,6 µg/mL) o vehículo por 24 h.

A. Fotos representativas del ensayo mostrando el aumento células AV+ luego del tratamiento con la Fracción D, en comparación con el vehículo. Aumento 400x. **B.** El gráfico muestra el porcentaje de células con marcación positiva y negativa para AV luego del tratamiento con la Fracción D y el vehículo. Test Chi- cuadrado. * $p < 0,05$.

Para confirmar este último resultado, las células LM3 fueron tratadas bajo las mismas condiciones pero en esta ocasión marcadas con AV más IP para su análisis por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 23 la población apoptótica (AV+ / IP-) incrementó de 4,38 % en las células tratadas con el vehículo a 11,45 % en las células tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h. Estos resultados muestran que la Fracción D de Maitake disminuye la viabilidad celular mediante la inducción de apoptosis.

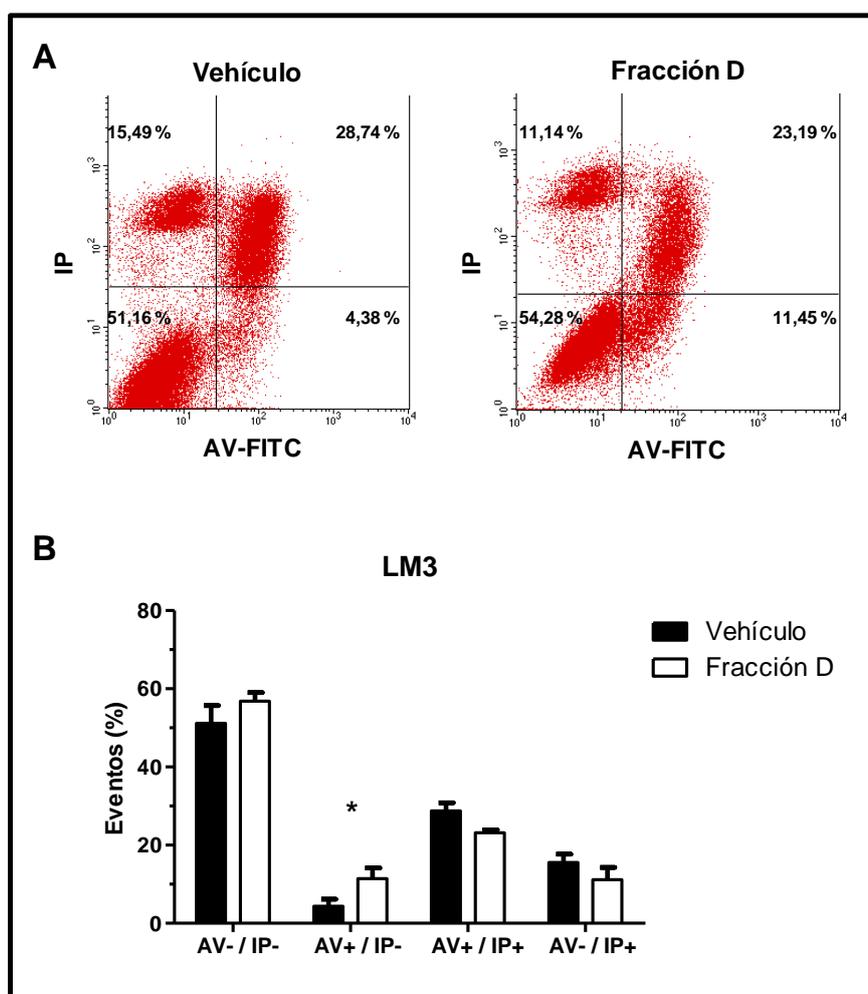


Figura 23. Cuantificación de células marcadas con AV e IP por citometría de flujo. Las células LM3 fueron tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo por 24 h. **A.** Distribución de las células marcadas con AV e IP por citometría de flujo. **B.** El gráfico

representa el porcentaje de células con las marcaciones indicadas. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones \pm SD. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. * $p < 0,05$.

II.IV- Efecto de la Fracción D sobre la capacidad celular metastásica.

La capacidad de metastatizar es otra de las habilidades adquiridas por las células tumorales. El proceso metastásico es un proceso activo, continuo, complejo y multiescalonado. Conceptualmente, se lo puede dividir en dos grandes etapas denominadas invasión primaria e invasión secundaria. La invasión primaria consiste en la migración activa de células tumorales desde su lugar de origen, a través de las matrices extracelulares, hasta alcanzar los vasos por los cuales viajarán rumbo un tejido distante. La invasión secundaria comprende desde la extravasación de las células tumorales hasta la colonización del nuevo tejido e implantación del foco metastásico (Román Curto, 1999; Chaffer & Weinberg, 2011).

En función a esto, para estudiar el efecto de la Fracción D sobre la capacidad metastásica de las células tumorales decidimos comenzar evaluando su efecto sobre la migración celular.

II.IV.I- Efecto de la Fracción D sobre la migración celular.

II.IV.I.I- Estudio en células de adenocarcinoma mamario.

El efecto de la Fracción D sobre la migración de las células LM3 y MDA-MB-231 se evaluó mediante el ensayo de cierre de la herida (*wound healing*) como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Ante el tratamiento con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$) las células LM3 sufrieron una disminución de su capacidad migratoria. Tal efecto se observó a partir de las 16 horas de tratamiento, cuando el área de la herida en las células tratadas con la Fracción D fue del 46,94 % (con respecto a el área inicial), contra un área del 23,20 % en las células tratadas con el vehículo (Figura 24 A

y C). En las células MDA-MB-231 la Fracción D (1050 $\mu\text{g/mL}$) también produjo una disminución de la capacidad migratoria, pero en esta línea celular dicho efecto se observó más temprano en comparación con las LM3. A partir de las 8 horas de tratamiento, se detectó una diferencia significativa entre el área de la herida bajo tratamiento con la Fracción D (72,04 %) y el área de la herida vehículo (35,47 %) (Figura 24 B y D).

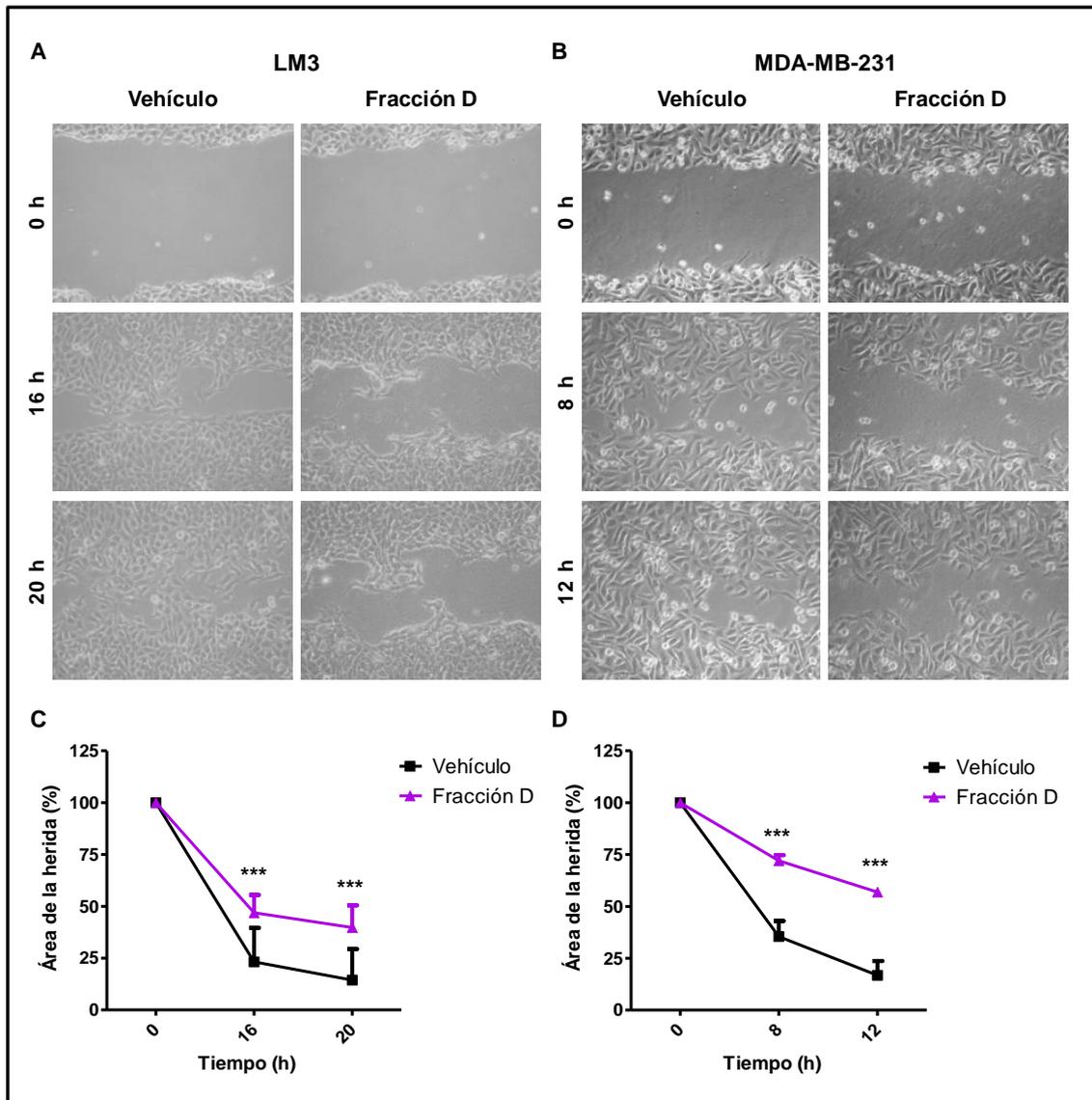


Figura 24. Efecto de la Fracción D sobre la migración celular en las líneas LM3 y MDA-MB-231. Sobre una monocapa de células **A)** LM3 y **B)** MDA-MB-231 se realizó una herida con un tip (0 horas). Las células fueron tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$ y 1050 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) o vehículo y se determinó el área de la herida a diferentes tiempos. Se muestran fotos representativas de la herida a los distintos tiempos analizados. Los gráficos indican las medias del área de la herida (%) para cada tiempo analizado en la línea LM3 **C)** y MDA-MB-231 **D)**, tomando como 100 % el área de la herida a las 0 h. Media \pm SD de un

experimento representativo. El ensayo fue repetido al menos dos veces para cada línea celular. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

Es importante considerar que para validar el efecto de la Fracción D de Maitake sobre la capacidad migratoria de las células LM3 y MDA-MB-231 se determinó, por un lado el T_2 de cada línea (Figura 25 A) y por otro lado se realizaron ensayos de viabilidad tiempo respuesta empleando la misma concentración de Fracción D utilizada en el ensayo de migración de cada línea celular (Figura 25 B). De esta manera, trabajando con tiempos inferiores al T_2 se logró minimizar la proliferación durante el ensayo. Por el otro lado, los ensayos de viabilidad nos permitieron descartar que la disminución de la capacidad migratoria observada bajo el tratamiento con la Fracción D sea consecuencia de una disminución de la viabilidad celular inducida por el proteoglicano.

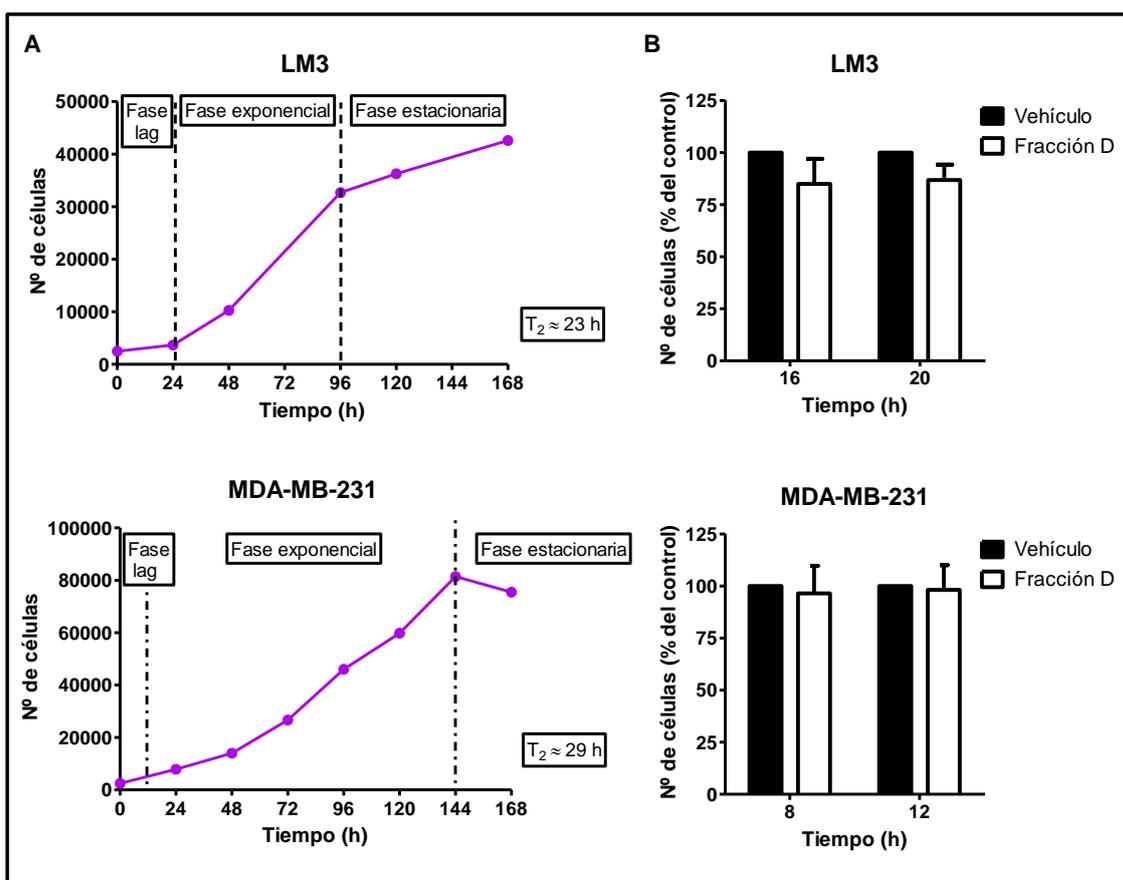


Figura 25. Validación del efecto de la Fracción D sobre la capacidad migratoria de las células LM3 y MDA-MB-231. A. Tasa de proliferación celular de las líneas LM3 y MDA-MB-231. Las células fueron sembradas y contadas manualmente cada 24 h y por 7 días. $T_2 =$

tiempo de duplicación celular. **B.** Ensayo de viabilidad tiempo respuesta para cada una de las líneas tumorales. Las células LM3 y MDA-MB-231 fueron tratados con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) o vehículo y cuantificadas manualmente a los tiempos en que se observó una disminución de la capacidad migratoria. El ensayo fue repetido al menos dos veces para cada línea celular. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni.

II.IV.I.II- Estudio en células mamarias no malignas.

Una vez evaluado el efecto de la Fracción D sobre la capacidad migratoria de las líneas tumorales, decidimos evaluar dicho efecto sobre células no malignas. Teniendo en cuenta que la viabilidad de las células HC11 resultó disminuida solo bajo el tratamiento con la máxima concentración de Fracción D evaluada (3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 24 h) y considerando que son la contraparte no maligna de las células LM3, decidimos trabajar con la concentración de Fracción D ensayada para estas últimas.

La capacidad migratoria de las células no malignas HC11 resultó disminuida por el tratamiento con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en comparación con el vehículo. El efecto se observó a partir de las 8 horas de tratamiento (Figura 26 A y B). En este horario el área de la herida bajo tratamiento con la Fracción D fue del 62,77 % (con respecto a el área inicial), mientras que el área de la herida control fue del 40,66 %. En este caso también se determinó el T_2 , el cual resultó ser de aproximadamente 17 h para las células HC11 (Figura 26 C).

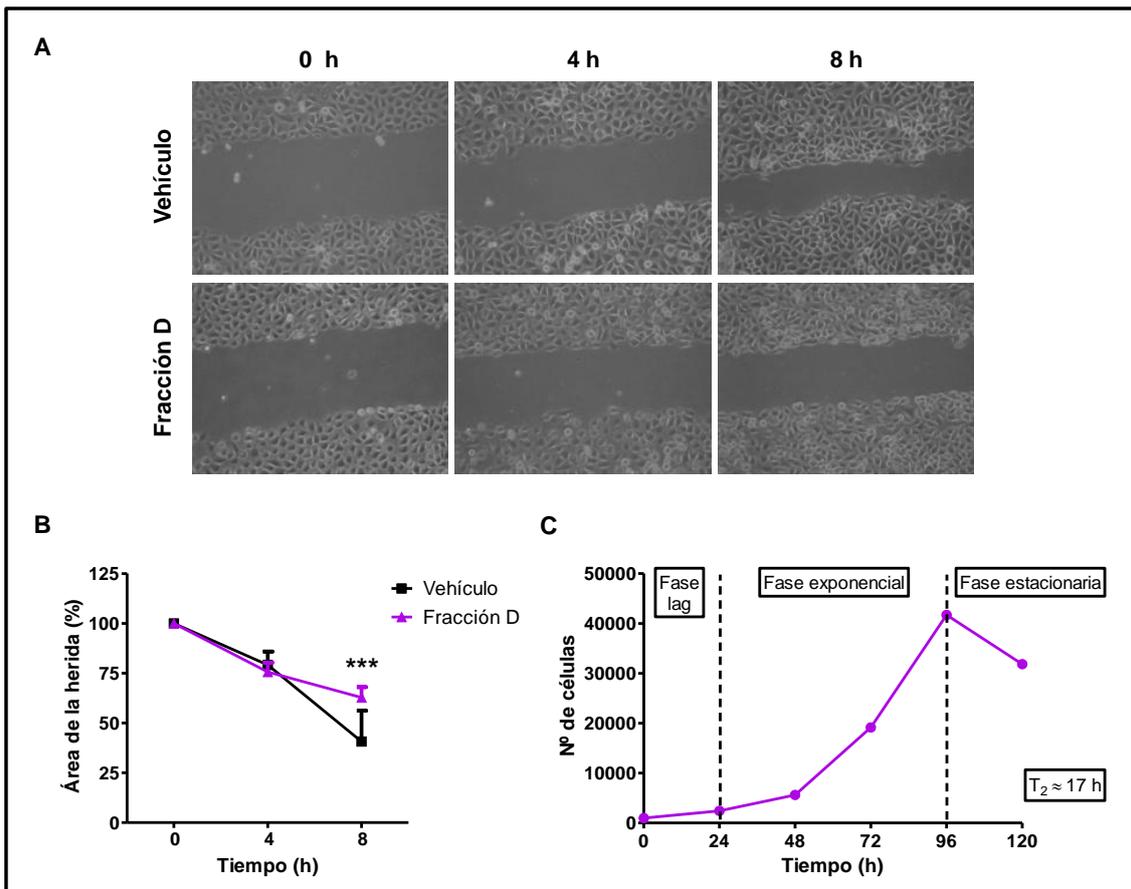


Figura 26. Efecto de la Fracción D sobre la migración celular en la línea HC11. Sobre una monocapa de células se realizó una herida con un tip (0 horas). Las células fueron tratadas con la Fracción D (570,6 µg/mL) o vehículo y se determinó el área de la herida a diferentes tiempos. **A.** Se muestran fotos representativas de la herida a los distintos tiempos analizados. **B.** El gráfico indica las medias del área de la herida (%) para cada tiempo analizado, tomando como 100 % el área de la herida a las 0 h. Media ± SD de un experimento representativo. El ensayo fue repetido al menos dos veces para cada línea celular. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. *** $p < 0,001$. **C.** Tasa de proliferación celular de la línea HC11. Las células fueron sembradas y contadas manualmente cada 24 h y por 5 días. T_2 = tiempo de duplicación celular.

A partir de este resultado podemos decir que la Fracción D de Maitake desencadena un efecto sobre la capacidad migratoria de células no malignas HC11 en un tiempo menor que en su contraparte tumoral (células LM3).

II.IV.II- Efecto de la Fracción D sobre la reorganización del citoesqueleto de actina.

En prácticamente todos los tipos de migración celular, el citoesqueleto de actina es dinámicamente remodelado, originando protrusiones

citoplasmáticas y generando fuerzas intracelulares necesarias para la translocación. Los lamelipodios y filopodios son protrusiones formadas por actina que típicamente se asocian con la migración celular (Lambrechts et al, 2004; Yamazaki et al, 2005). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la Fracción D disminuyó la capacidad migratoria de las células tumorales LM3 y MDA-MB-231, decidimos evaluar si el proteoglicano afecta la organización del citoesqueleto de actina de dichas células. Para ello los filamentos de actina fueron marcados con faloidina rodaminada.

Observamos que el número de células LM3 con protrusiones citoplasmáticas, lamelipodios/filopodios, disminuyó de 47,86 % \pm 5,31 % a 29,55 % \pm 1,09 % ($p < 0,05$) luego de 12 h de tratamiento con la Fracción D de Maitake (570,6 μ g/mL), en comparación con el vehículo (Figura 27). A su vez, las células tratadas con la Fracción D presentaron una disposición cortical de los filamentos de actina. En su conjunto, estos resultados son indicativos de una disminución de la motilidad celular inducida por la Fracción D de Maitake.

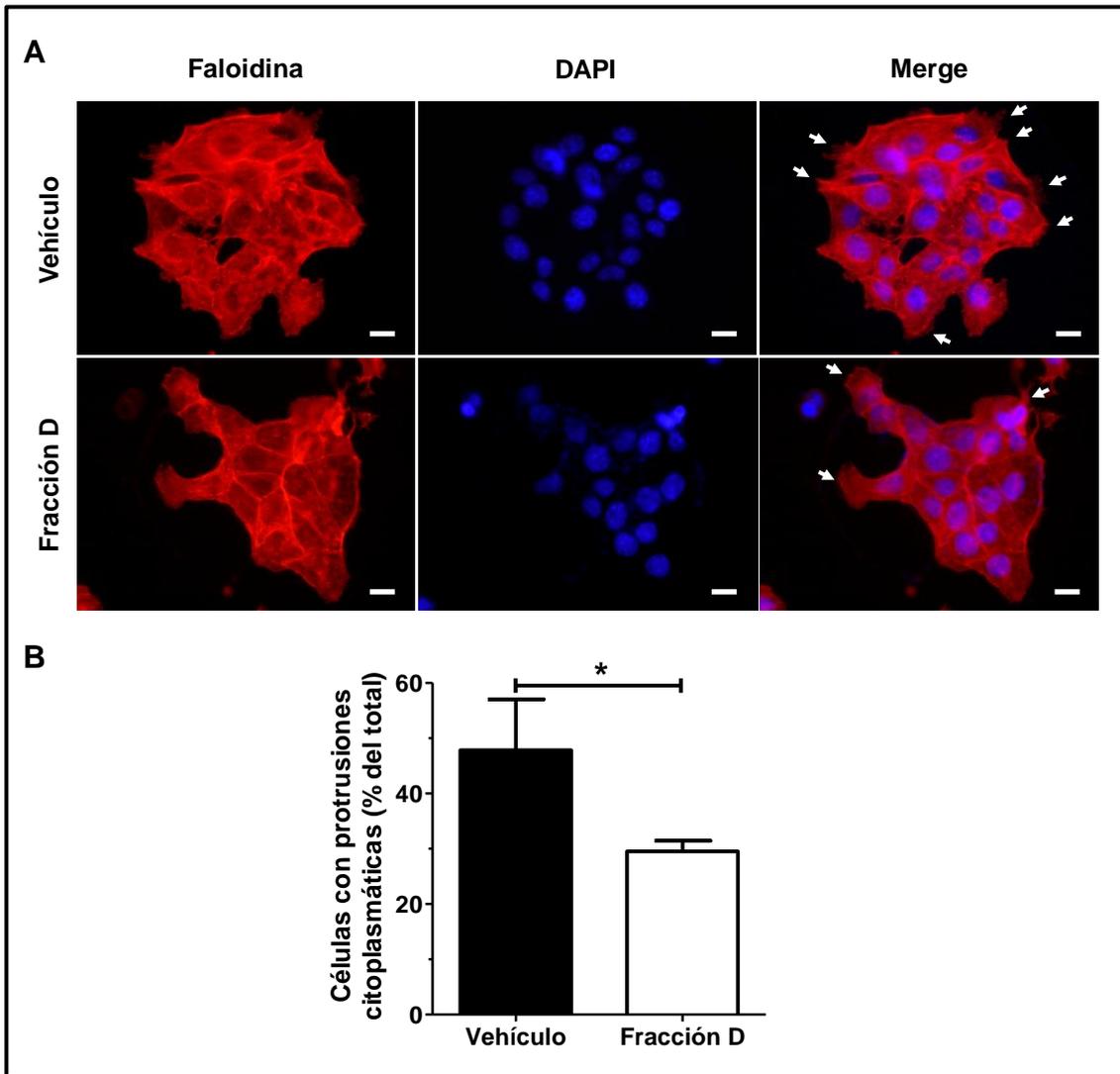


Figura 27. La Fracción D de Maitake disminuye el número de células LM3 con protrusiones citoplasmáticas. Células LM3 fueron tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$) o vehículo durante 12 h. Luego, fueron fijadas y teñidas con faloidina rodaminada. **A.** Fotos representativas del ensayo adquiridas con microscopio de fluorescencia. Las flechas blancas indican protrusiones citoplasmáticas (lamelipodios/filopodios) de las células ubicadas en la periferia de la colonia. Núcleos en azul (DAPI) y filamentos de actina en rojo (faloidina). Magnificación: 400x, barra de escala: 20 μm . **B.** Cuantificación de las células con protrusiones citoplasmáticas. Se analizaron 10 campos al azar con 15-20 células por campo, para cada condición. El ensayo se realizó por triplicado. Los valores graficados representan la media \pm SD de un ensayo representativo. Test de Student, * $p < 0,05$.

Al evaluar la citoarquitectura de los filamentos de actina en las células MDA-MB-231 tratadas con la Fracción D (1050 $\mu\text{g/mL}$) o vehículo por 12 h, el cambio más evidente fue a nivel de las fibras de estrés. Al igual que los lamelipodios y filopodios, las fibras de estrés son estructuras basadas en

filamentos de actina que contribuyen con la migración celular (Ebeling et al, 2014). Estas fibras de estrés surgen por reorganización del citoesqueleto de actina a partir su disposición cortical (Chan et al, 2014). Como se aprecia en la Figura 28 A, las células tratadas con la Fracción D presentaron un citoplasma libre de fibras de estrés, a diferencia de las células control en las cuales se observaron numerosas de estas fibras atravesando su citoplasma. De esta manera, mientras que la mayoría de las células tratadas con el vehículo presentaron fibras de estrés (96,73 % \pm 0,31), el tratamiento con la Fracción D de Maitake produjo una fuerte reducción del número de células que presentaban dichas fibras (4,95 % \pm 1,12) (Figura 28 B).

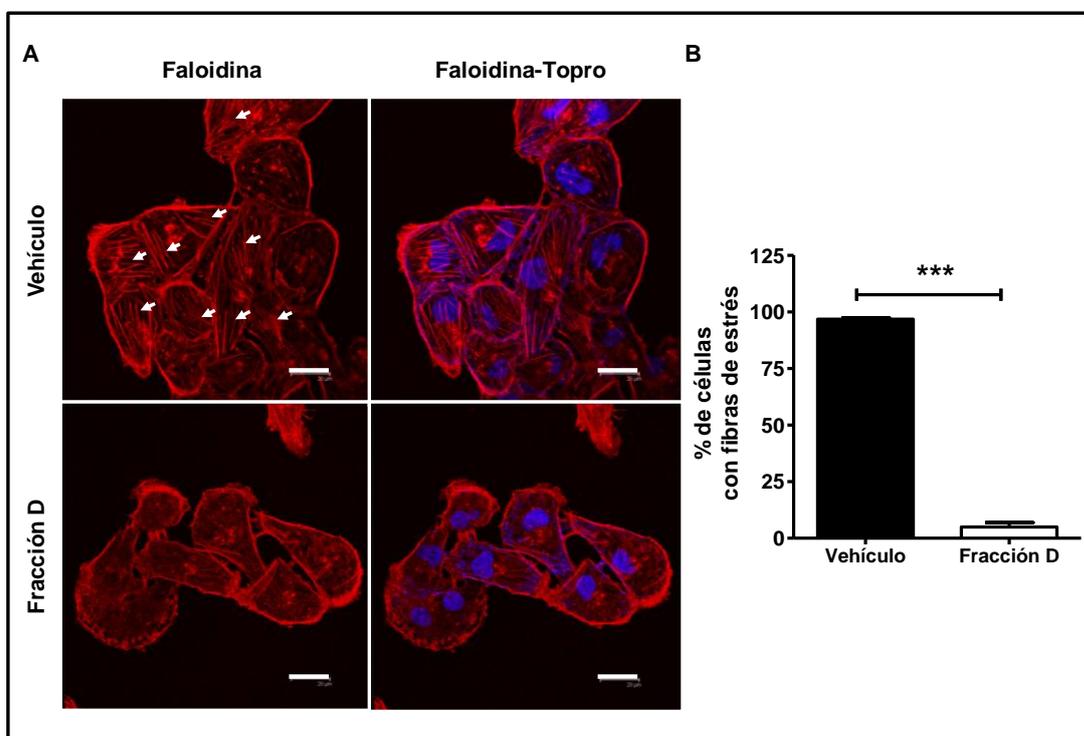


Figura 28. La Fracción D de Maitake disminuye el número de células MDA-MB-231 con fibras de estrés. Células MDA-MB-231 fueron tratadas con la Fracción D (1050 μ g/mL) o vehículo durante 12 h. Luego, fueron fijadas y teñidas con faloidina rodaminada. **A.** Fotos representativas del ensayo adquiridas con microscopia confocal. Las flechas blancas indican las fibras de estrés. Núcleos en azul (Topro) y filamentos de actina en rojo (faloidina). Magnificación: 630x, barra de escala: 20 μ m. **B.** Cuantificación de las células con fibras de estrés. Se analizaron 10 campos al azar para cada condición. El ensayo se realizó por triplicado. Los valores graficados representan la media \pm SD de un ensayo representativo. Test de Student, *** $p < 0,001$.

De esta manera se puede decir que la Fracción D de Maitake reorganiza el citoesqueleto de actina en ambas líneas tumorales disminuyendo la motilidad celular. Estos resultados explican, al menos en parte, la disminución de la capacidad migratoria inducida por la Fracción D observada en los “ensayos de la herida”.

II.IV.III- Efecto de la Fracción D sobre la degradación de la matriz extracelular.

La MEC, en condiciones normales, no posee vías de paso por las cuales las células puedan desplazarse. Es por ello que la motilidad celular por sí sola, no es suficiente para explicar el proceso invasivo (Román Curto, 1999). Las células tumorales invasivas son capaces de degradar la MEC y abrirse paso a través de ella mediante la secreción de diferentes proteasas tales como MMP, serina proteasas y catepsinas entre otras (Bonnans et al, 2014).

Con el objetivo de determinar si la Fracción D de Maitake podría afectar la degradación de la MEC modulando la actividad de algunas de las proteasas vinculadas al proceso de invasión de las células tumorales mamarias estudiadas en esta tesis, evaluamos mediante la técnica de zimografía la actividad proteolítica (gelatinasa) de MMP-2 y MMP-9 liberada por las células LM3 y MDA-MB-231 luego del tratamiento con dicha fracción. Como se puede observar en la Figura 29, detectamos una disminución del 40 % de la actividad de MMP-2 en los medios condicionados provenientes de las células LM3 tratadas con la Fracción D (570,6 µg/mL) durante 6 h, en comparación con el control. Un tratamiento más prolongado (12 h), disminuyó de manera similar la actividad de dicha proteasa. Con respecto a la actividad de MMP-9 en los medios condicionados de las células LM3, si bien se detectó una clara disminución luego de 6 h de tratamiento con la Fracción D, la leve intensidad de las bandas no permitió su cuantificación (Figura 29).

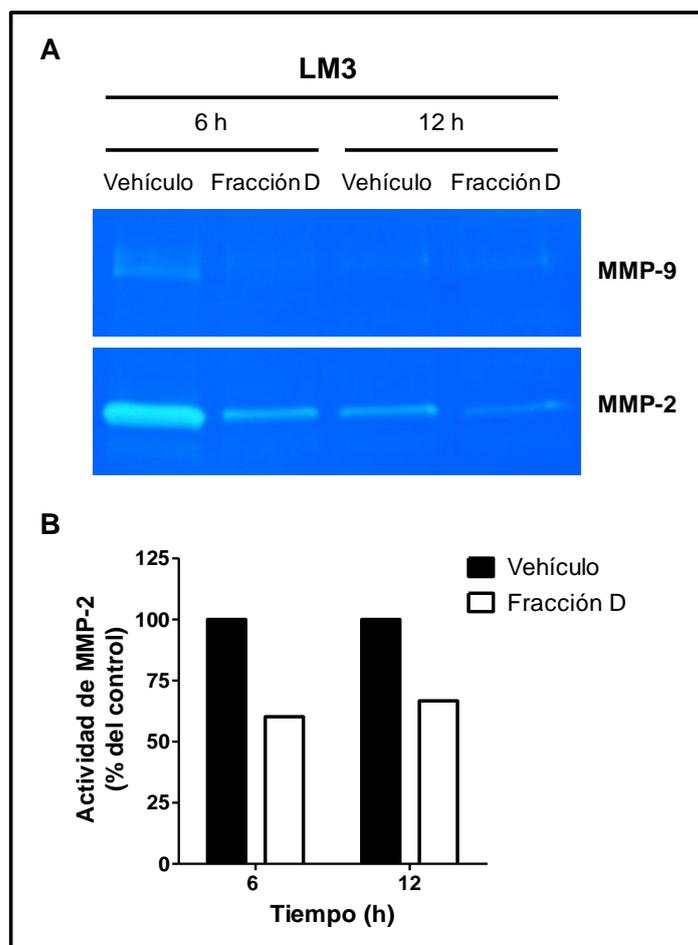


Figura 29. La Fracción D de Maitake disminuye la actividad de MMP-2 secretada por las células LM3. **A.** Zimografía realizada con el medio condicionado del cultivo de células LM3 tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$) o vehículo durante 6 y 12 h. Visualización de la actividad de MMP-2 y MMP-9. **B.** Las bandas fueron cuantificadas usando el software Fiji y normalizadas con la cantidad de células por pocillo. La actividad se graficó como porcentaje respecto al control, considerándose este el 100 %.

A partir de los medios condicionados provenientes de las células MDA-MB-231 pudimos observar que ante un tratamiento de 6 h con la Fracción D (1050 $\mu\text{g/mL}$), la actividad de MMP-2 disminuye un 53,6 % respecto al control (Figura 30). Observamos también, que al incrementar el tiempo de tratamiento con la Fracción D (12 h) dicha disminución se pierde pero en su lugar disminuye la actividad de MMP-9 en comparación al control (Figura 30).

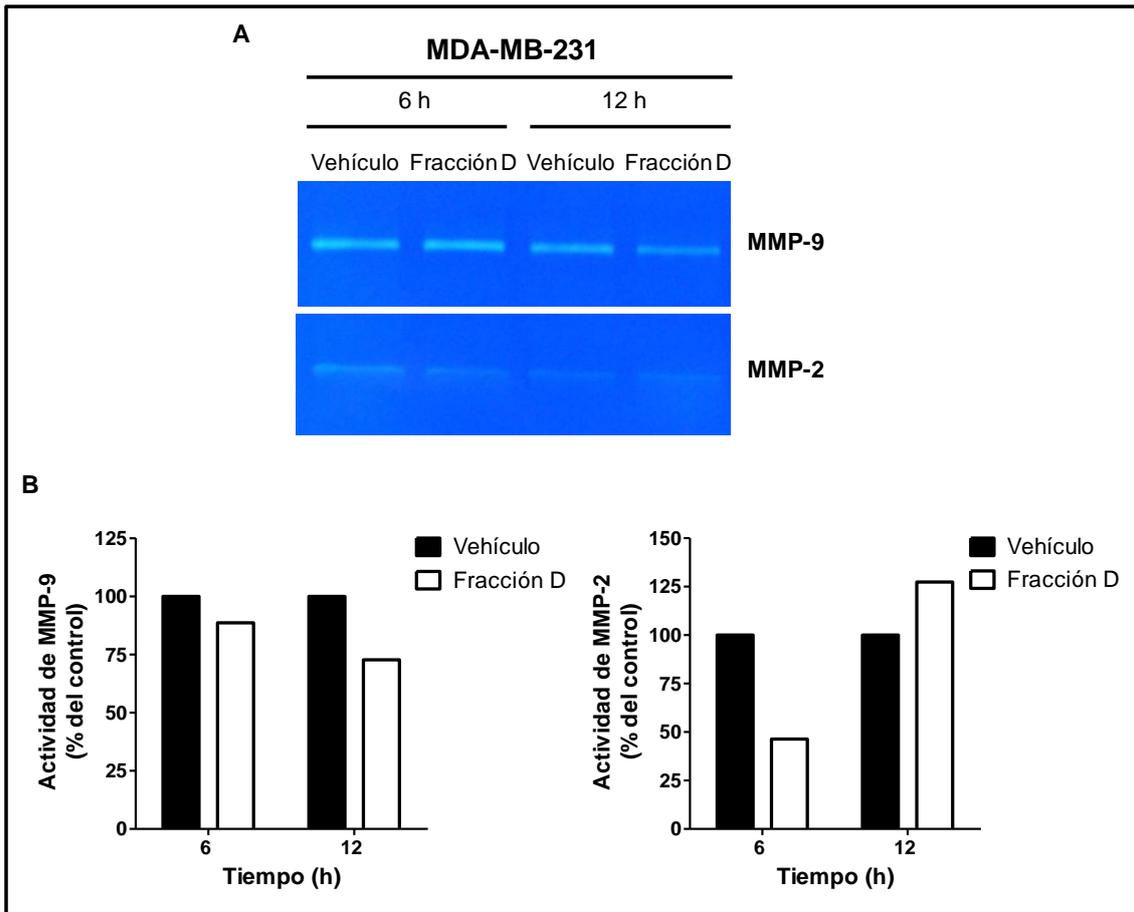


Figura 30. La Fracción D de Maitake disminuye la actividad de MMP-9 y MMP-2 secretada por las células MDA-MB-231. A. Zimografía realizada con el medio condicionado del cultivo de células MDA-MB-231 tratadas con la Fracción D (1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o vehículo durante 6 y 12 h. Visualización de la actividad de MMP-2 y MMP-9. **B.** Las bandas fueron cuantificadas usando el software Fiji y normalizadas con la concentración de proteína total. La actividad se graficó como porcentaje respecto al control, considerándose este el 100 %.

Estos resultados indican que la Fracción D de Maitake es capaz de modular la actividad de importantes MMP-s liberadas por las células tumorales LM3 y MDA-MB-231, con lo cual reduciría la capacidad invasiva de dichas células.

II.IV.IV- Efecto de la Fracción D sobre la adhesión celular.

La adhesión celular involucra tanto a la interacción célula-componentes de la MEC como a la interacción célula-célula, y es la principal responsable de mantener la arquitectura tisular (Gueron et al, 2014). Se ha demostrado que alteraciones en las propiedades de adhesión de las células neoplásicas

desempeñan un rol fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer (Okegawa et al, 2004; Ramirez et al, 2011). En este contexto, decidimos investigar si la Fracción D de Maitake afecta la adhesión de las células tumorales LM3 y MDA-MB-231.

Por un lado, evaluamos el efecto de la Fracción D sobre la adhesión de las células al sustrato. Para ello, células LM3 y MDA-MB-231 pre-tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$ o 1050 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) o vehículo durante 12 h fueron sembradas en igual cantidad en placa de 96 pocillos e incubadas por distintos tiempos para permitir su adhesión al plástico. Como se observa en la Figura 31 las células pre-tratadas con la Fracción D de Maitake presentaron mayor adhesión en comparación con el vehículo. En el caso de las células LM3 la Fracción D incrementó aproximadamente 4 veces el número de células

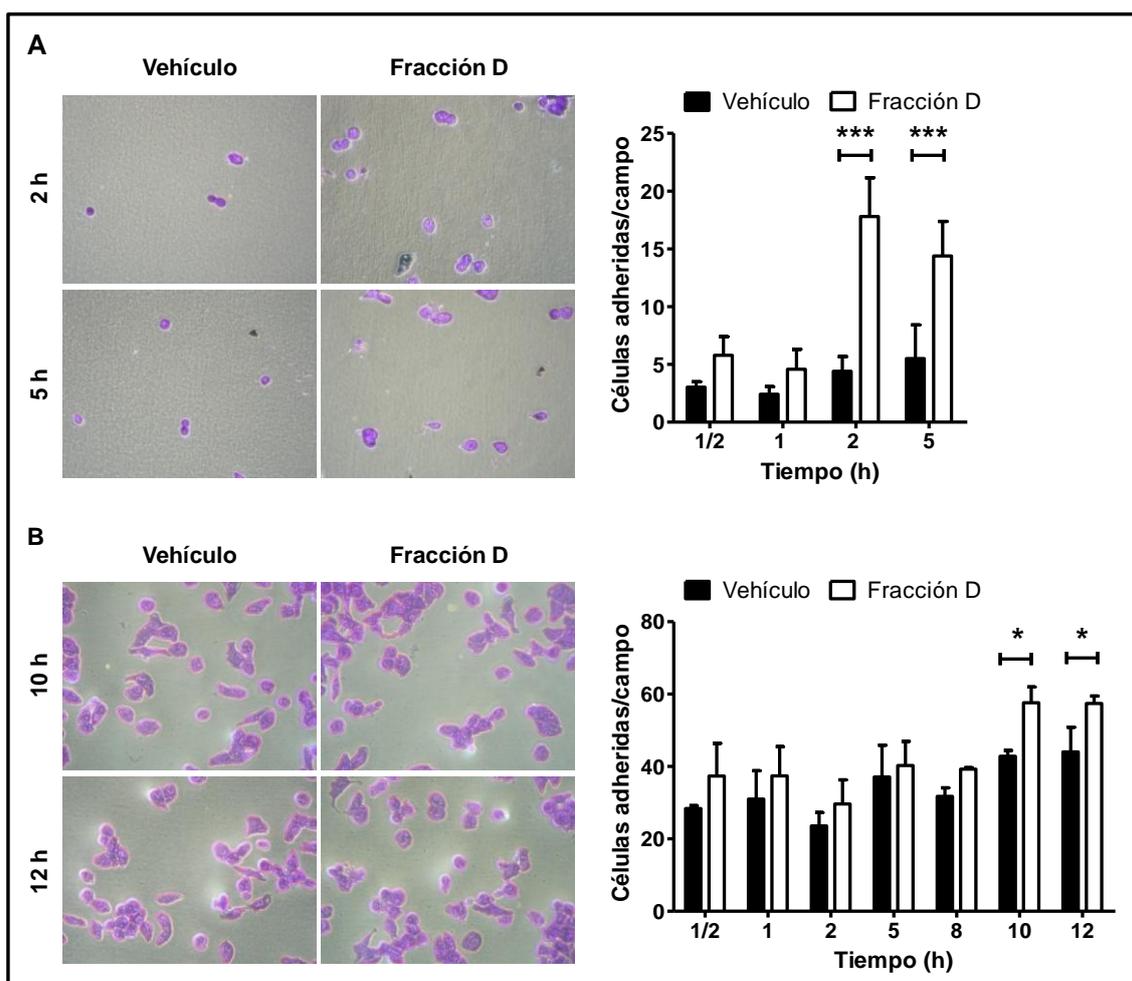


Figura 31. La Fracción D de Maitake aumenta la adhesión de las células LM3 y MDA-MB-231. Células LM3 y MDA-MB-231 fueron tratadas con las Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$ o 1050

$\mu\text{g/mL}$ respectivamente) o vehículo por 12 h. Luego fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas por distintos tiempos. Fotos representativas del ensayo de adhesión para las células **A)** LM3 y **B)** MDA-MB-231. Magnificación: 400x. Los gráficos representan el número de células adheridas luego del tratamiento con la Fracción D o vehículo para cada línea celular. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los valores graficados representan la media \pm SD de un ensayo representativo. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

adheridas tras 2 h de incubación, observándose también un aumento significativo a las 5 h (Figura 31 A). En cuanto a las células MDA-MB-231, la Fracción D también aumentó significativamente la adhesión celular, pero en este caso el efecto se observó tras 10 h de incubación (Figura 31 B).

Por otro lado, evaluamos el posible efecto de la Fracción D sobre la adhesión intercelular. Es sabido que las principales moléculas de adhesión a nivel de las uniones adherentes entre las células epiteliales son la E-cadherina y la β -catenina (Baum & Georgiou, 2011). Además y en relación en su función, se ha demostrado que estas moléculas juegan un rol importante en la Transición Epitelio-Mesenquimática (TEM), proceso que promueve el desarrollo de metástasis en cáncer (Thiery et al, 2009; Mallini et al, 2014).

Teniendo esto en mente y como una forma indirecta de evaluar si la Fracción D podría actuar sobre la adhesión célula-célula y afectar la capacidad metastásica de las células tumorales estudiadas en esta tesis, se analizó mediante ensayo de WB, el efecto de la Fracción D sobre la expresión de E-cadherina y β -catenina en las células LM3 y MDA-MB-231. Se pudo detectar que el tratamiento de las células LM3 con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 h no afecta significativamente la expresión de E-cadherina ni β -catenina en comparación con el vehículo (Figura 32 A). En cambio, en las células MDA-MB-231, el tratamiento con la Fracción D (1050 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 h aumenta significativamente la expresión de E-cadherina en comparación con el vehículo; sin producir cambios significativos en la expresión de β -catenina (Figura 32 B).

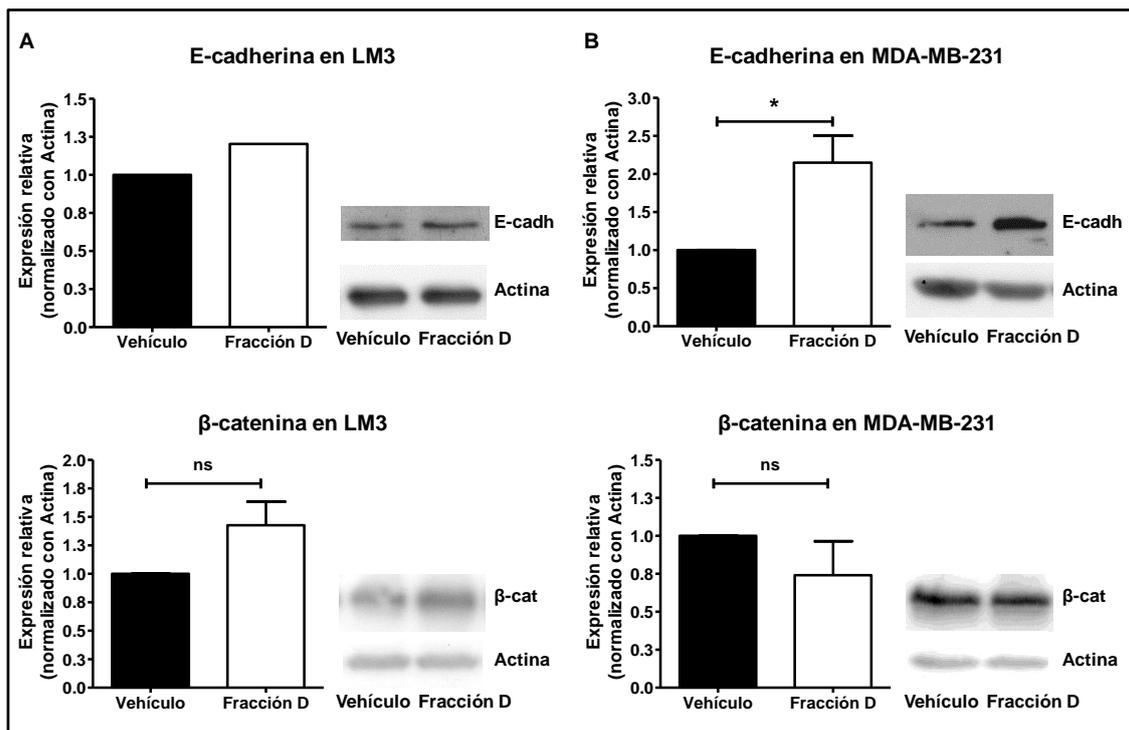


Figura 32. Efecto de la Fracción D sobre la expresión las moléculas de adhesión intercelular E-cadherina y β -catenina. Células LM3 y MDA-MB-231 fueron tratadas con las Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$ o 1050 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) o vehículo por 12 h. Por WB se evaluó la expresión de E-cadherina y β -catenina. **A.** Niveles de expresión de E-cadherina (E-cadh) y β -catenina (β -cat) en las células LM3. **B.** Niveles de expresión de E-cadherina (E-cadh) y β -catenina (β -cat) en las células MDA-MB-231. Los gráficos representan la media \pm SD de al menos dos ensayos independientes. Test de Student, * $p < 0,05$.

II.IV.V- Efecto de la Fracción D sobre la invasión celular.

II.IV.V.I- Estudio en células de adenocarcinoma mamario.

Los resultados anteriores demuestran que *in cultivo* la Fracción D de Maitake disminuye la motilidad de células tumorales mamarias LM3 y MDA-MB-231, disminuye la actividad de importantes MMP-s liberadas por dichas células, incrementa la adhesión celular, y al menos en las células MDA-MB-231 induce un aumento de la expresión d E-cadherina. Esto sugiere que la Fracción D podría estar afectando las distintas fases de la invasión primaria del proceso metastásico: *adhesión* de las células tumorales a la MEC, *degradación* local de esta matriz por parte proteasas y *motilidad* de las células tumorales. En este contexto, decidimos investigar el efecto global de la Fracción D sobre el

proceso invasivo. Para ello, empleamos insertos de membrana de policarbonato, cuya superficie superior fue cubierta con Matrigel® como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, el tratamiento de las células LM3 con la Fracción D de Maitake (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12 h, disminuyó la capacidad invasiva de las células en comparación con el vehículo. Tal como se puede observar en la Figura 33 A, bajo tratamiento con la Fracción D fue significativamente menor el número de células capaces de degradar el modelo de MEC y migrar a la cara inferior del inserto (media del vehículo = $65,77 \pm 2,1$ vs media de Fracción D = $58,17 \pm 2,332$; $p < 0,05$). La capacidad invasiva de las células MDA-MB-231 también fue disminuida significativamente por el tratamiento con la Fracción D (1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 12h) en comparación con el vehículo (media del vehículo = $67,03 \pm 1,913$ vs media de Fracción D = $24,37 \pm 1,261$; $p < 0,001$) (Figura 33 B).

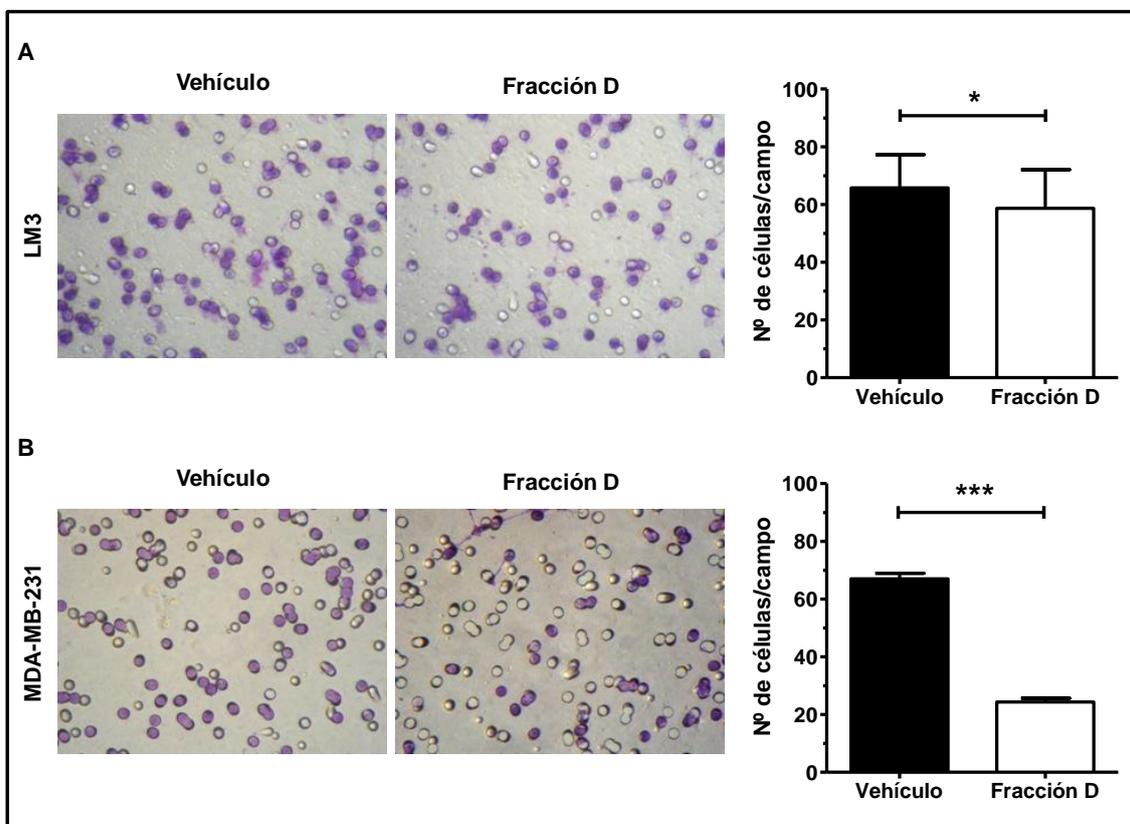


Figura 33. La Fracción D de Maitake disminuye la capacidad invasiva de las células LM3 y MDA-MB-231. Células LM3 y MDA-MB-231 fueron tratadas con las Fracción D (570,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) o vehículo por 12 h y se evaluó la capacidad invasiva

empleando insertos de membrana de policarbonato recubiertos con Matrigel®. **A.** Imágenes representativas del ensayo de invasión mostrando las células LM3 que atravesaron la capa de Matrigel®. El gráfico muestra la media \pm SD del número de células LM3 invasivas por campo luego del tratamiento con la Fracción D o vehículo. **B.** Imágenes representativas del ensayo de invasión mostrando las células MDA-MB-231 que atravesaron la capa de Matrigel®. El gráfico muestra la media \pm SD del número de células MDA-MB-231 invasivas por campo luego del tratamiento con la Fracción D o vehículo. En ambos casos, el ensayo se realizó por triplicado y se analizaron diez campos al azar de cada condición. Test de Student, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Magnificación: 400x.

II.IV.V.II- Estudio en células mamarias no malignas.

Considerando que el tratamiento con la Fracción D disminuyó la migración de las células HC11, decidimos estudiar el efecto del proteoglicano sobre la invasión de estas células no malignas. En este caso, las células HC11 fueron tratadas con la Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$) o vehículo durante 16 h. La concentración fue establecida en base a la empleada en la línea tumoral LM3 y el tiempo en función a literatura previa. Como se observa en la Figura 34, el tratamiento de las células HC11 con la Fracción D no afectó significativamente la capacidad invasiva de las mismas, en comparación con el vehículo (media del vehículo = $48,62 \pm 3,934$ vs media de Fracción D = $53,27 \pm 1,906$).

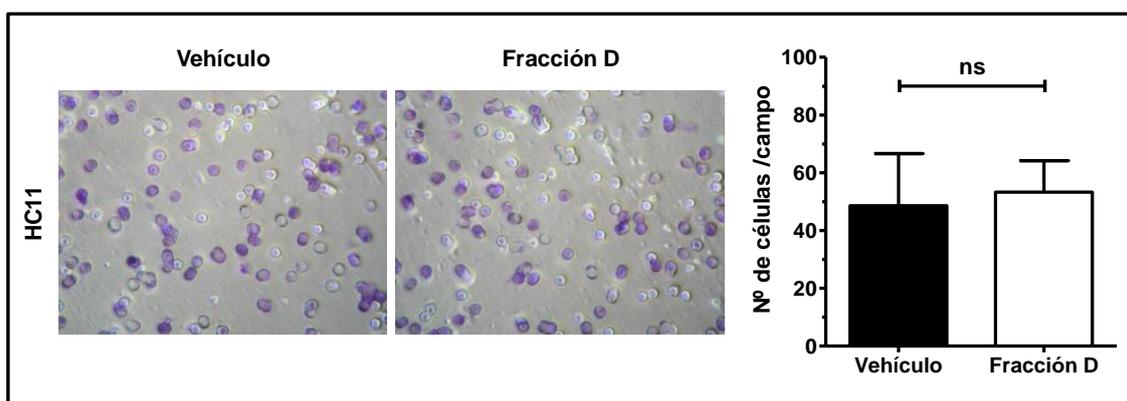


Figura 34. La Fracción D de Maitake no afecta la capacidad invasiva de las células no malignas HC11. Células HC11 fueron tratadas con las Fracción D (570,6 $\mu\text{g/mL}$) o vehículo por 16 h y se evaluó la capacidad invasiva empleando insertos de membrana de policarbonato recubiertos con Matrigel®. Imágenes representativas del ensayo de invasión mostrando las células HC11 que atravesaron la capa de Matrigel®. Magnificación: 400x. El gráfico muestra la media \pm SD del número de células HC11 invasivas por campo luego del tratamiento con la

Fracción D o vehículo. El ensayo se realizó por triplicado y se analizaron diez campos al azar de cada condición. Test de *Student*.

Capítulo III- La Fracción D y sus efectos antitumorales in vivo.

Dado los efectos antitumorales de la Fracción D de Maitake observados *in cultivo* sobre las células LM3 y MDA-MB-231, nos propusimos evaluar si la Fracción D era capaz de desarrollar efectos semejantes *in vivo* sobre los correspondientes modelos murinos de cáncer.

III.I- Efecto de la Fracción D sobre un modelo de xenotrasplante con células MDA-MB-231.

Como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, células MDA-MB-231 derivadas de un cáncer de mama humano triple negativo fueron implantadas en ratones inmunodeprimidos N:NIH(S)-*Fox1^{nu}*. En este modelo animal, observamos que el comportamiento de los tumores establecidos no fue el esperado ya que se desarrollaron como una masa muy dispersa cuyo tamaño incrementaba solo ligeramente con el paso del tiempo. Pese a esto los ratones comenzaron a ser tratados con la Fracción D (21 mg/Kg) o vehículo subcutáneamente a nivel de la periferia tumoral. En primer término se evaluó el

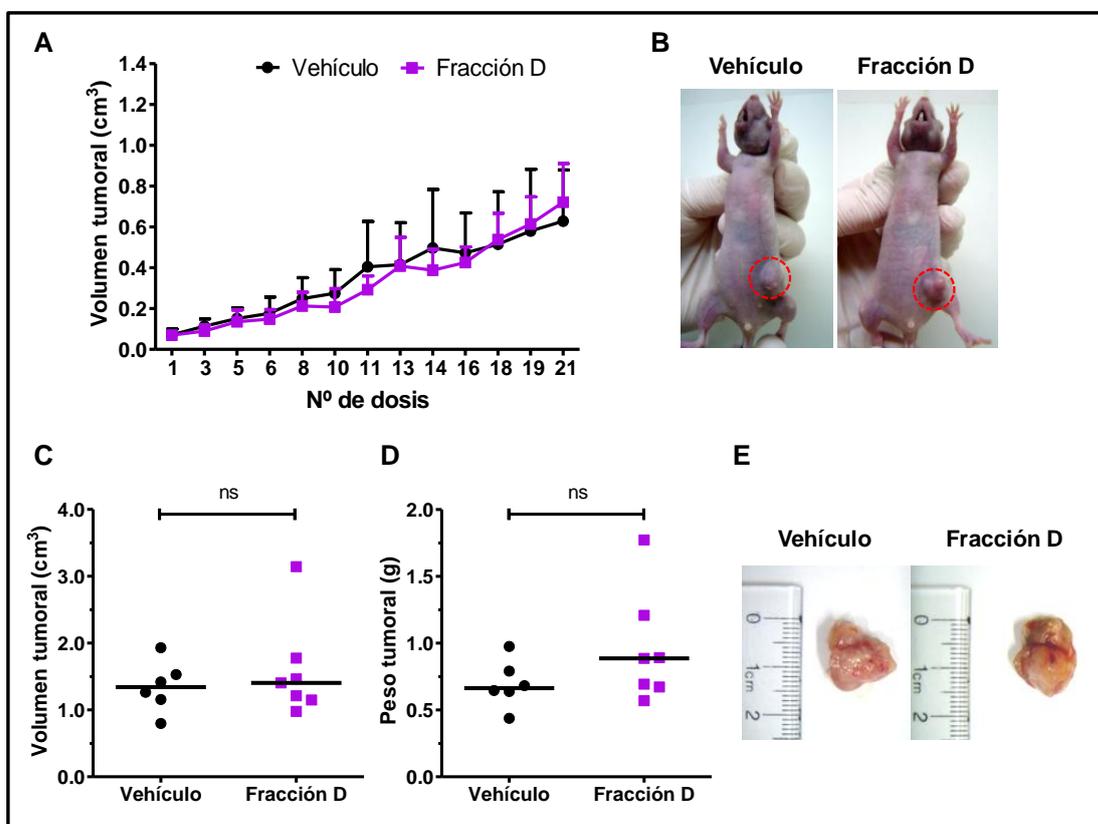


Figura 35. La Fracción D de Maitake no afecta la carga tumoral en un modelo murino

xenotrasplante con células MDA-MB-231. Hembras de la cepa N:NIH(S)-*Fox1^{nu}* portadoras de tumores fueron tratadas con la Fracción D (21 mg x Kg⁻¹ x dosis⁻¹; n=7) o vehículo (n=6). **A.** El gráfico muestra la cinética de crecimiento tumoral. El volumen tumoral fue calculado como $\pi / 6 \times A \times B^2$, siendo A el largo y B el ancho del tumor. Media del volumen tumoral de cada grupo experimental \pm SD. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. AS* = antes del sacrificio. **B.** Imágenes representativas de los tumores *in vivo* desarrollados en los ratones tratados con la Fracción D o vehículo. **C.** El gráfico muestra el volumen tumoral de cada ratón determinado *ex vivo* como $\pi / 6 \times A \times B \times C$, siendo A, B y C las tres dimensiones del tumor. Se muestra la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann-Whitney. **D.** El gráfico muestra el peso tumoral de cada ratón. Se muestra la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann-Whitney. **E.** Imágenes representativas del tamaño tumoral en los ratones tratados con la Fracción D o vehículo.

efecto de la Fracción D sobre el tumor primario. Como se observa en la Figura 35, en este modelo animal, la administración de 21 dosis de Fracción D no produjo cambios significativos en la carga tumoral de los ratones en comparación con el vehículo. No obstante continuamos evaluando si la proliferación celular del tumor había resultado afectada por el tratamiento con el proteoglucano. La cuantificación de figuras mitóticas en cortes teñidos con H&E no reveló diferencias significativas en el nivel de proliferación de los tumores tratados con la Fracción D en comparación con el vehículo (Figura 36).

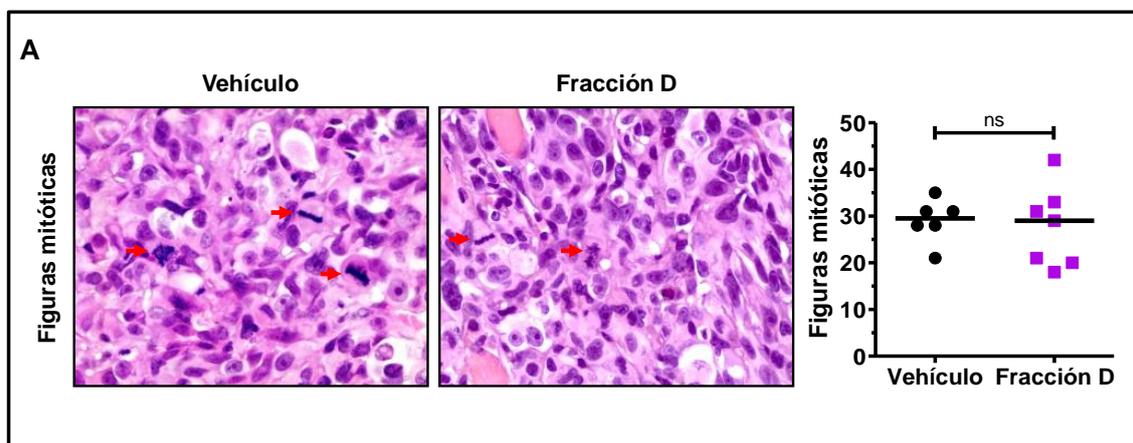


Figura 36. La Fracción D de Maitake no afecta el índice mitótico en los tumores primarios de un modelo murino de xenotrasplante con células MDA-MB-231. Fotomicrografías representativas del tumor primario teñido con H&E mostrando las figuras mitóticas. Magnificación: 400x. El gráfico muestra el número de figuras mitóticas cuantificadas por ratón en 10 campos consecutivos; se marca la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann Whitney.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la generación de metástasis espontáneas a pulmón ha sido reportada en el modelo de xenotrasplante con células MDA-MB-231 (Rose et al, 1994; Loganathan et al, 2014) decidimos examinar los pulmones de los ratones de este modelo experimental. Al observar bajo lupa los pulmones fijados en Bouin, fue posible advertir la presencia de metástasis, sin detectarse variación entre el número de focos desarrollados en los ratones tratados con la Fracción D y el vehículo (Figura 37 A). La naturaleza de los focos metastásicos fue confirmada por análisis histológico (Figura 37 B).

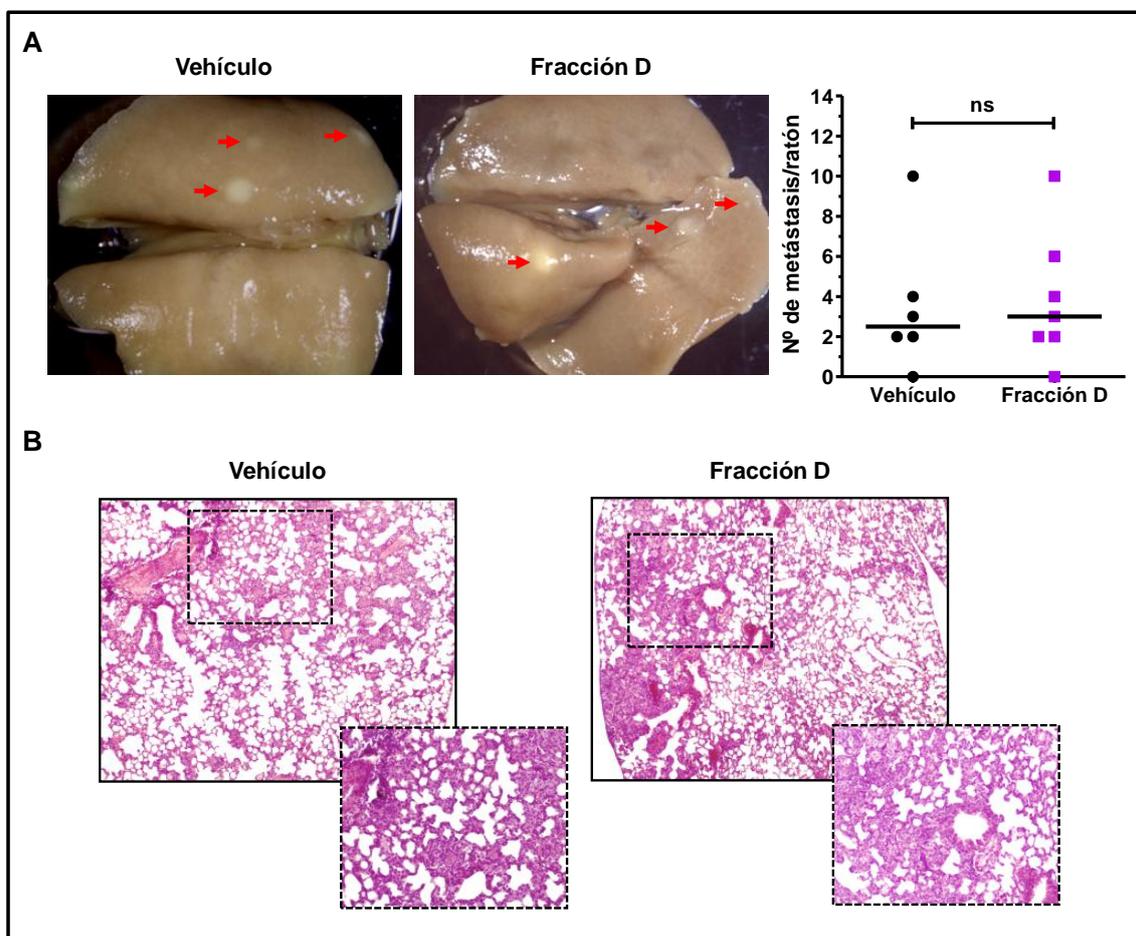


Figura 37. La Fracción D no afecta el número de metástasis pulmonares en un modelo murino de xenotrasplante con células MDA-MB-231. Al momento del sacrificio de los animales los pulmones fueron removidos y fijados en Bouin para su posterior análisis. **A.** Fotos representativas de los focos metastásicos observados macroscópicamente en los pulmones de los ratones tratados con la Fracción D y vehículo. El gráfico muestra la cuantificación macroscópica del número de metástasis pulmonares por ratón. Se marca la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann Whitney. **B.** Microfotografías representativas de los focos

metastásicos observados en un corte de pulmón teñido con H&E. Magnificación: 40x, inserto 100x.

III.II- Efecto de la Fracción D sobre un modelo de trasplante singenético con células LM3.

El modelo murino de trasplante singenético con células LM3 (Urtreger et al, 1997) fue empleando en dos situaciones. En la primera de ellas para evaluar el efecto antitumoral de la Fracción D de Maitake sobre tumores mamarios establecidos. Posteriormente, también se lo empleó para evaluar el potencial efecto preventivo del proteoglicano en cáncer de mama.

III.II.I- Efecto antitumoral de la Fracción D sobre tumores mamarios establecidos.

Teniendo en cuenta los efectos que produjo la Fracción D de Maitake sobre la viabilidad y los indicadores celulares de capacidad metastásica de las células LM3, decidimos evaluar el efecto del proteoglicano sobre dichas células *in vivo*. Para ello, como se comentó anteriormente, utilizamos un modelo murino de trasplante singenético con células LM3 (Urtreger et al, 1997).

En primer término se evaluó el efecto de la Fracción D sobre la carga del tumor primario. Tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos, una vez que los ratones desarrollaron un tumor apto de medirse con precisión comenzaron a ser tratados con la Fracción D (15,63 mg/Kg) o vehículo subcutáneamente a nivel de la periferia tumoral. Como se observa en la Figura 38 A y 38 B, la Fracción D de Maitake disminuyó el crecimiento tumoral en comparación con el vehículo. Luego de 18 dosis recibidas, los ratones tratados con la Fracción D presentaron tumores significativamente más pequeños que los ratones tratados con el vehículo (Fracción D = $0,6640 \text{ cm}^3$ vs vehículo = $1,389 \text{ cm}^3$, $p < 0,01$). Reforzando este resultado, el volumen de los tumores determinado *ex vivo* (Figura 38 C) y el peso de los mismos (Figura 38 D) fueron significativamente reducidos por el tratamiento con la Fracción D en

comparación con el vehículo (0,99 cm³ vs 1,81 cm³, $p < 0,05$ y 0,94 g vs 1,69 g, $p < 0,05$ respectivamente) (Figura 38 E).

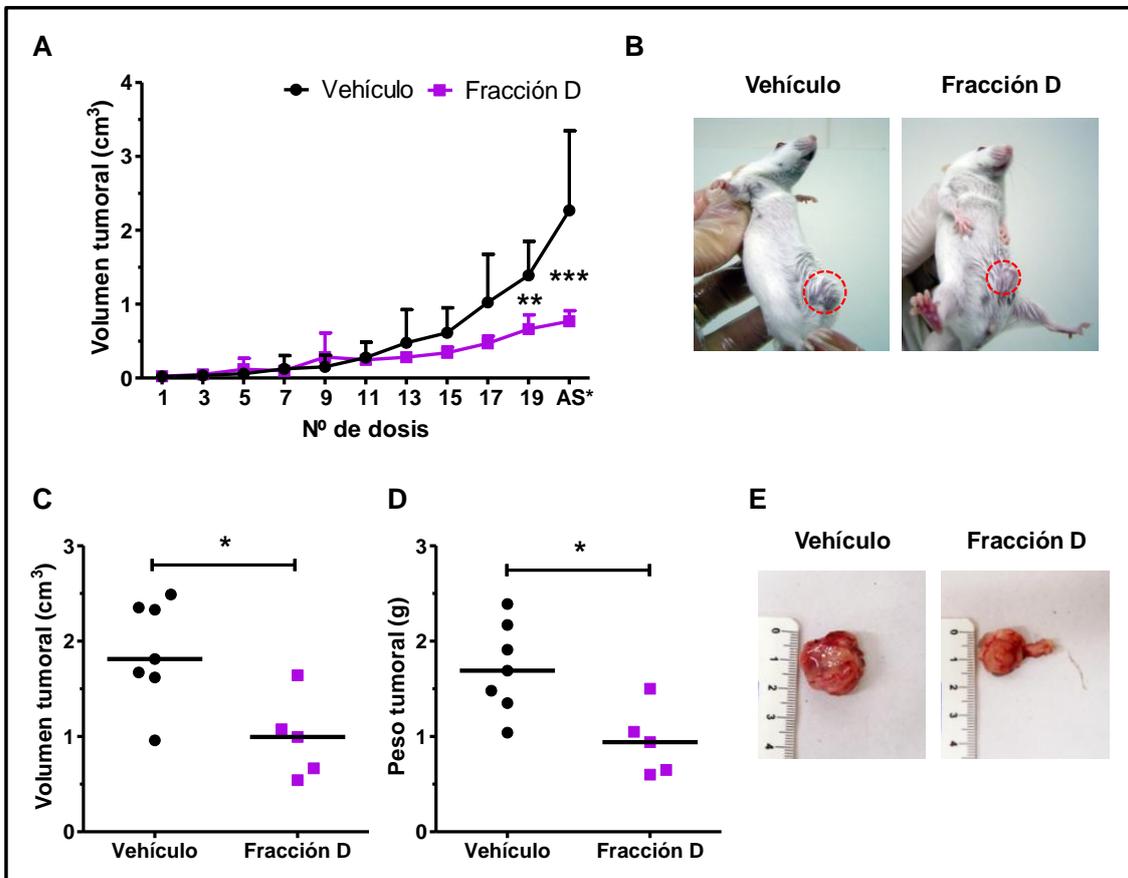


Figura 38. La Fracción D de Maitake disminuye el tamaño tumoral en un modelo murino de trasplante singénico con células LM3. Hembras BALB/c portadoras de tumores fueron tratadas con la Fracción D (15,63 mg x Kg⁻¹ x dosis⁻¹; n=5) o vehículo (n=7). **A.** El gráfico muestra la cinética de crecimiento tumoral. El volumen tumoral fue calculado como $\pi / 6 \times A \times B^2$, siendo A el largo y B el ancho del tumor. Media del volumen tumoral de cada grupo experimental \pm SD. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. AS* = antes del sacrificio. **B.** Imágenes representativas de los tumores *in vivo* desarrollados en los ratones tratados con la Fracción D o vehículo. **C.** El gráfico muestra el volumen tumoral de cada ratón determinado *ex vivo* como $\pi / 6 \times A \times B \times C$, siendo A, B y C las tres dimensiones del tumor. Se muestra la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann-Whitney. **D.** El gráfico muestra el peso tumoral de cada ratón. Se muestra la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann-Whitney. **E.** Imágenes representativas del tamaño tumoral en los ratones tratados con la Fracción D o vehículo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dada la reducción del tamaño tumoral observada bajo el tratamiento con la Fracción D de Maitake, decidimos estudiar si el proceso de proliferación y/o

apoptosis habían sido afectados en los tumores primarios. Para evaluar la proliferación celular, se cuantificó el número de figuras mitóticas en cortes teñidos con H&E y se analizó la expresión de Ki-67 por IHQ. Para evaluar el proceso apoptótico se analizó la expresión de Bax también, por IHQ. Observamos que, ni el número de figuras mitóticas (mediana del número de figuras mitóticas presentes en 10 campos consecutivos de 400x de los tumores de los animales tratados con la Fracción D = 50 vs mediana del número de figuras mitóticas presentes en los tumores de los animales tratados con el vehículo = 70) ni la expresión de Ki-67 (mediana del score promedio, obtenido a partir de 10 campos al azar de 400x, de cada ratón tratado con la Fracción D = 0,125 vs mediana del score promedio de cada ratón tratado con el vehículo = 0,2) variaron significativamente entre los ratones tratados con la Fracción D y los tratados con el vehículo (Figura 39). Por lo contrario, la expresión de Bax fue significativamente mayor en los tumores primarios de los ratones tratados con la Fracción D, en comparación con el vehículo (mediana del IRS promedio, obtenido a partir de 10 campos al azar de 400x, de cada ratón tratado con la Fracción D = 1,9 vs mediana del IRS promedio de cada ratón tratado con el vehículo = 0,4; $p < 0,05$, Figura 39). En concordancia con los resultados obtenidos *in cultivo*, esto sugiere que la Fracción D impide el crecimiento tumoral mediante la inducción de apoptosis.

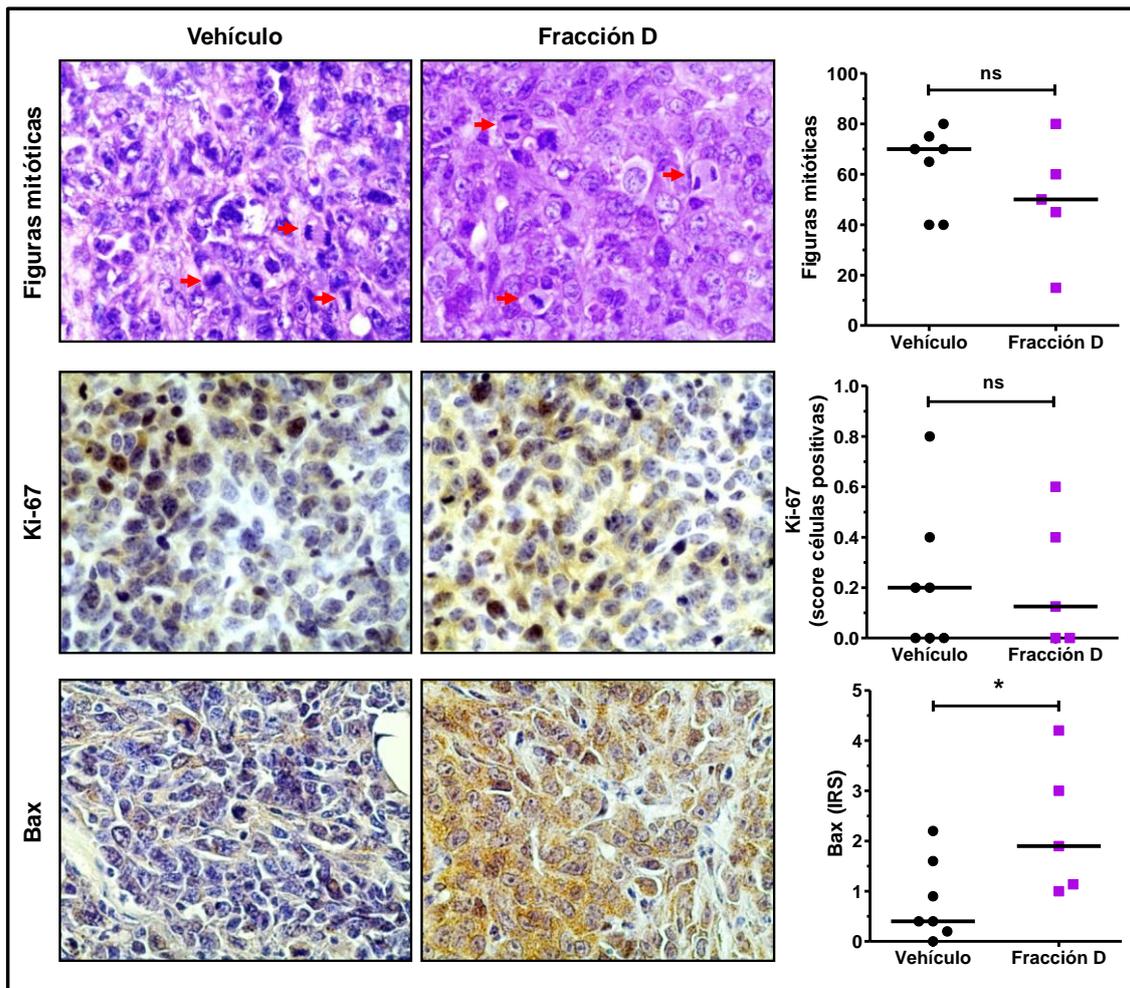


Figura 39. La Fracción D de Maitake no afecta el índice mitótico ni la expresión de Ki-67 pero incrementa la expresión de Bax en los tumores primarios de un modelo murino de trasplante singenético con células LM3. Fotomicrografías representativas del tumor primario teñido con H&E mostrando las figuras mitóticas e inmunomarcación de Ki-67 y Bax. Magnificación: 400x. Los gráficos muestran las respectivas cuantificaciones; se marca la mediana de cada grupo experimental. En todos los casos se aplicó el test de Mann Whitney. * $p < 0,05$.

Por otro lado, los tumores, al igual que los tejidos normales, requieren nutrientes y oxígeno para poder crecer y sobrevivir, así como también presentan la necesidad de evacuar sus desechos metabólicos y CO_2 . Estas demandas son satisfechas por la neovascularización asociada al tumor, generada mediante el proceso de angiogénesis. Es por ello que la estimulación de la angiogénesis es considerada una de las capacidades adquiridas por las células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011). En este contexto, decidimos investigar si el tratamiento de los ratones con la Fracción D de Maitake había afectado la formación de nuevos vasos en el tumor primario de los animales. Mediante

tinción con Tricrómico de Masson cuantificamos los vasos de pequeño calibre (de formación reciente) presentes en los tumores y detectamos que la Fracción D no produjo cambios significativos en la neoangiogenesis del tumor primario en el modelo murino de trasplante singenético con células LM3, en comparación con el vehículo (Figura 40).

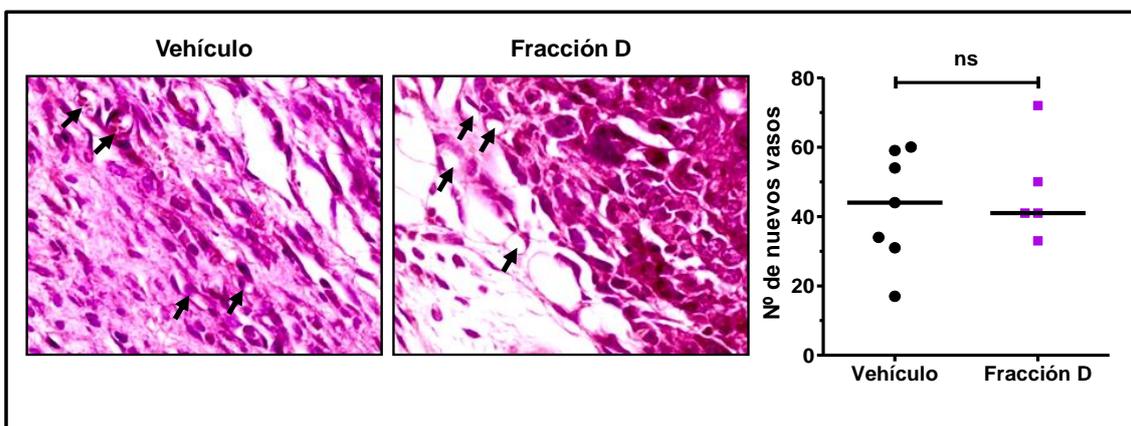


Figura 40. La Fracción D no afecta la neoangiogénesis del tumor primario en el modelo murino de trasplante singenético con células LM3. Microfotografías representativas del tumor primario teñido con Tricrómico de Masson identificando vasos de pequeño calibre. Magnificación: 400x El gráfico muestra el número de nuevos vasos cuantificados en ocho campos consecutivos del tumor primario de cada ratón. Se marca la mediana de cada grupo experimental. Test de Mann Whitney.

Como se demostró en el Capítulo II, la Fracción D de Maitake afectó ciertas capacidades de las células LM3 que son requeridas por toda célula tumoral para llevar a cabo las distintas etapas del proceso metastásico. Con estos resultados presentes y gracias a que el modelo murino de trasplante singenético con células LM3 produce metástasis pulmonares (Urtreger et al, 1997), nos propusimos evaluar el efecto de la Fracción D sobre el proceso metastásico *in vivo*. Para ello, los pulmones removidos de los ratones al momento del sacrificio fueron fijados en Bouin tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Inicialmente, las metástasis pulmonares fueron cuantificadas bajo lupa (Figura 41 A). Se observó que el tratamiento de los ratones con la Fracción D redujo significativamente la cantidad de metástasis pulmonares (mediana del número de metástasis por ratón = 0, rango 0 - 1) en comparación al vehículo (mediana del número de metástasis por ratón = 2, rango 0 - 12) ($p < 0,05$). Posteriormente, sobre cortes de los

de E-cadherina y β -catenina en los tumores primarios del modelo animal. Como mencionamos en el Capítulo II, estas proteínas participan en la adhesión célula-célula y la pérdida de su expresión ha sido asociada con un fenotipo metastásico (Kozłowski et al, 2015). En relación a esto, observamos que el tratamiento de los animales con la Fracción D no produjo cambios significativos en la expresión de E-cadherina (mediana del IRS promedio, obtenido a partir de 10 campos al azar de 400x, de cada ratón tratado con la Fracción D = 2 vs mediana del IRS promedio de cada ratón tratado con el vehículo = 0,3) ni β -catenina (mediana del IRS promedio, obtenido a partir de 10 campos al azar de 400x, de cada ratón tratado con la Fracción D = 0,6 vs mediana del IRS promedio de cada ratón tratado con el vehículo = 0,3) en los tumores primarios, en comparación con el vehículo (Figura 42). Sin embargo, pese a la falta de significancia estadística detectada, se evidenció una tendencia de mayor expresión de E-cadherina en los tumores primarios de los ratones tratados con la Fracción D (Figura 42).

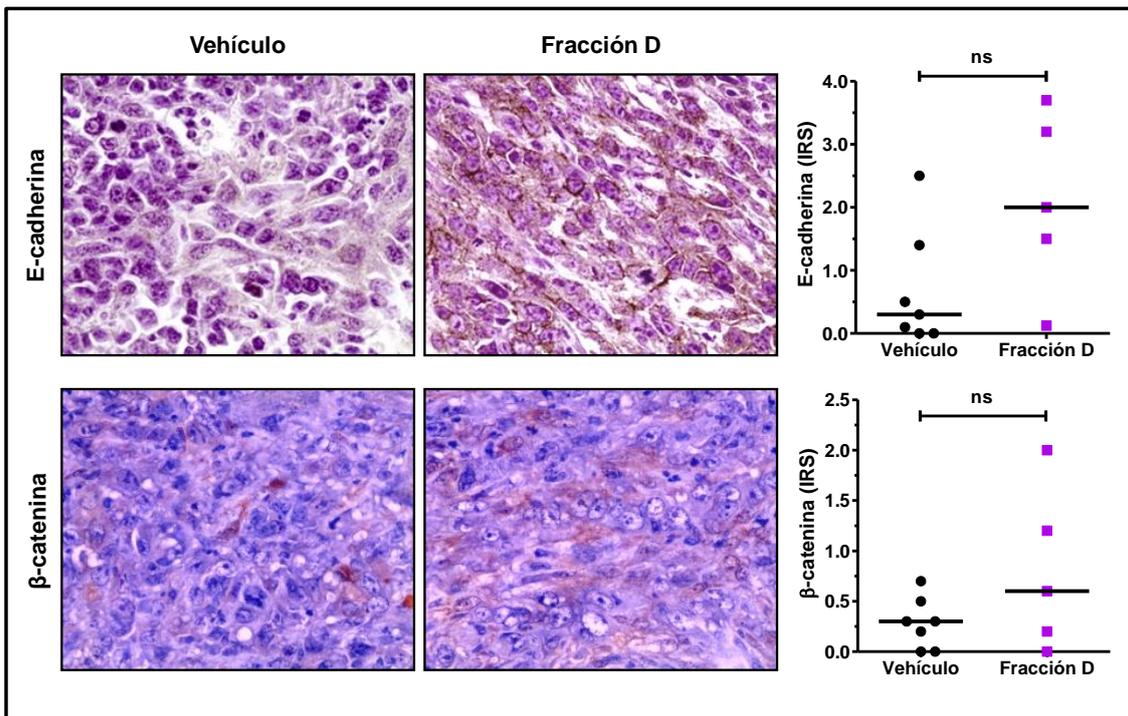


Figura 42. La Fracción D de Maitake no afecta la expresión de E-cadherina y β -catenina en los tumores primarios de un modelo murino de trasplante singenético con células LM3. Fotomicrografías representativas del tumor primario mostrando la inmunomarcación de E-cadherina y β -catenina. Magnificación: 400x. Los gráficos muestran las respectivas cuantificaciones; cada punto representa el IRS promedio obtenido a partir de 10 campos al azar

en el tumor primario de cada ratón. Se marca la mediana de cada grupo experimental. En ambos casos se aplicó el test de Mann Whitney.

III.II.I.I- Evaluación de signos de toxicidad e inmunoestimulación.

Con el fin de determinar si la Fracción D de Maitake administrada a los ratones BALB/c genera en ellos algún efecto secundario o tóxico indeseable se monitoreo el peso corporal de los animales a lo largo del ensayo, y una vez finalizado el mismo se llevó a cabo el análisis histológico a nivel de hígado y riñón.

En cuanto al peso corporal de los ratones, como se puede observar en la Figura 43 A, no se detectaron variaciones significativas entre el peso promedio de los animales tratados con la Fracción D de Maitake y los animales tratados con el vehículo.

Por otro lado, el hígado y el riñón son tejidos asociados clásicamente al a las funciones de detoxificación y metabolismo de fármacos. Es por ello que al momento del sacrificio de los animales, dichos órganos fueron colectados para su análisis histopatológico. En ninguno de los ratones tratados con la Fracción D se observaron lesiones histológicas a nivel de hígado y riñón, en comparación con los controles (Figura 43 B).

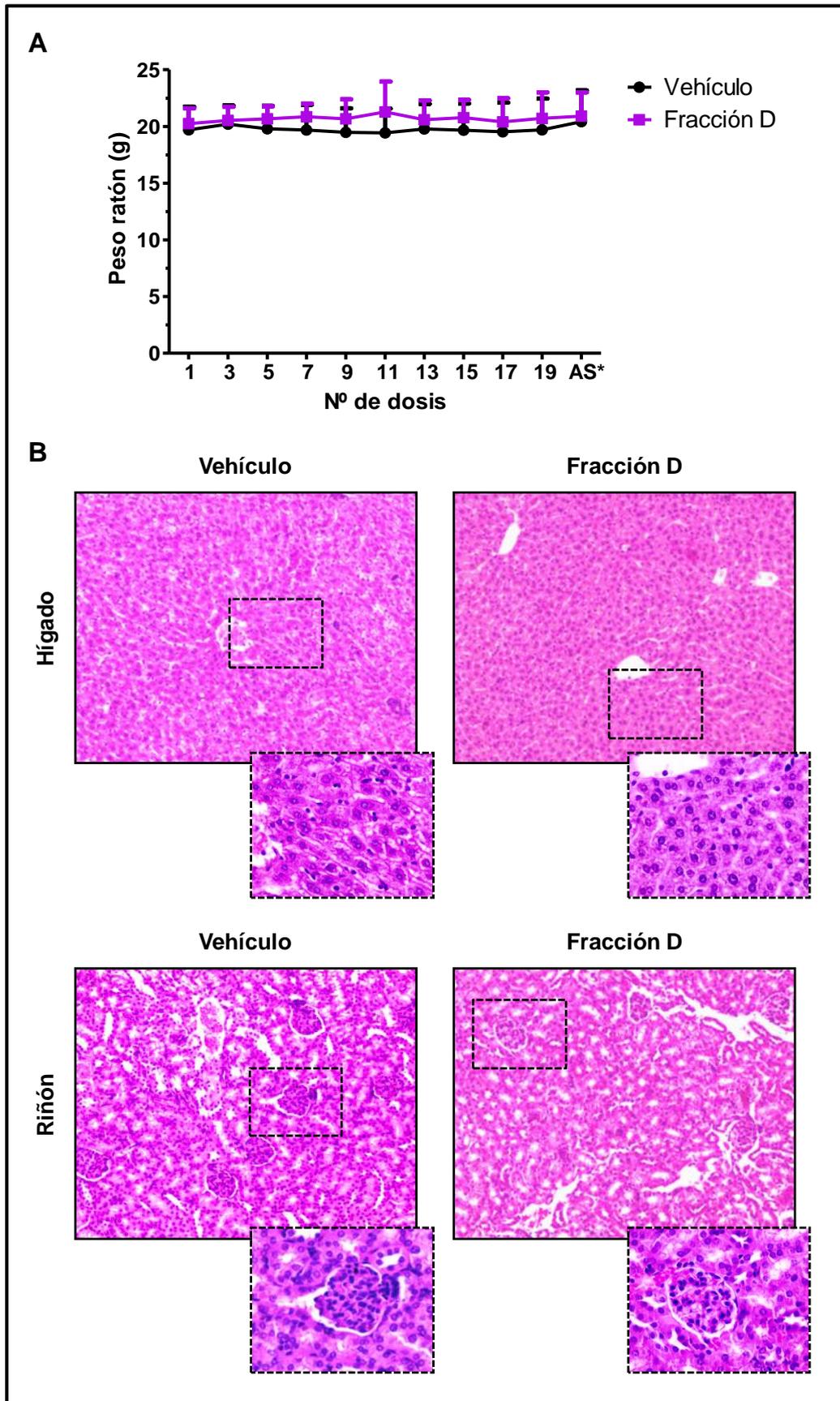


Figura 43. El tratamiento con la Fracción D de Maitake no genera signos de toxicidad en ratones BALB/c portadores de tumores. A. El peso corporal de los animales fue registrado

periódicamente previo a la aplicación de las dosis. El gráfico muestra las variaciones en el peso de los animales tratados con la Fracción D o vehículo. Media de cada grupo \pm SD. ANOVA de dos vías, con posterior test de Bonferroni. AS* = antes del sacrificio. **B.** Microfotografías de hígado y riñón (tinción con H&E) representativas de animales tratados con la Fracción D y vehículo. Magnificación: 100x, inserto 400x.

Todos estos resultados, aportan evidencia de la inocuidad de la Fracción D de Maitake para los animales, administrada en una dosis de 15,63 mg/Kg, 5 veces a la semana, durante 4 semanas (total de dosis = 20).

Por otro lado, teniendo en cuenta que tal como se describió en la Introducción de esta tesis, la Fracción D presenta una capacidad inmunoestimuladora ampliamente reportada, consideramos de importancia evaluar el bazo de los ratones del modelo experimental. A nivel del peso del órgano, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones tratados con la Fracción D y el vehículo (Figura 44 A). Sin embargo, el análisis histológico reveló un aumento de pulpa blanca en el bazo de los ratones tratados con la Fracción D en comparación con la pulpa blanca presente en el bazo de los ratones control (Figura 44 B). Recordemos que la pulpa blanca es la región del bazo que actúa como una fuente de linfocitos y anticuerpos para la defensa del organismo. De modo tal que el aumento de pulpa blanca detectado podría ser indicio del accionar inmunoestimulador de la Fracción D.

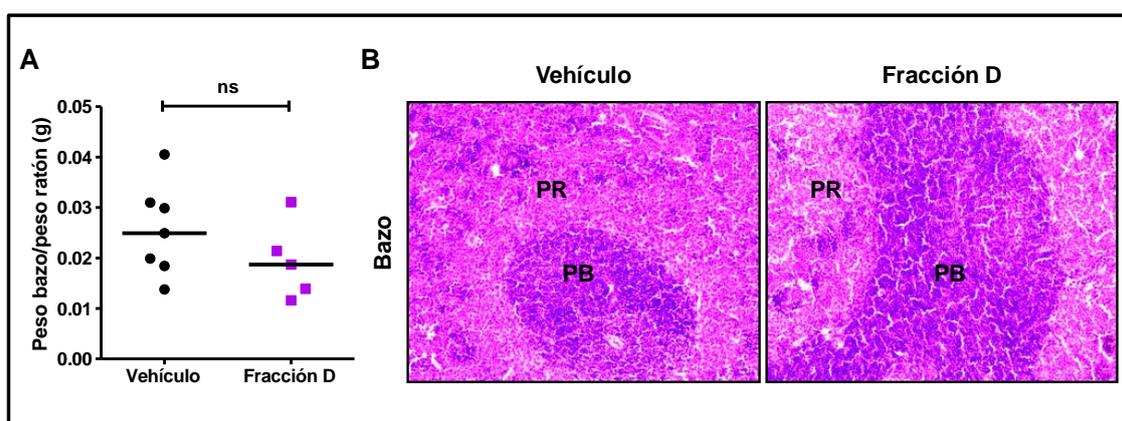


Figura 44. El tratamiento con la Fracción D de Maitake afecta la histología del bazo de ratones BALB/c portadores de tumores. **A.** El gráfico muestra el peso del bazo de cada ratón normalizado respecto a su peso corporal, para cada grupo experimental. Se muestran las medianas y se aplicó el test de Mann Whitney. **B.** Microfotografías de bazo (tinción con H&E)

representativas de animales tratados con la Fracción D y vehículo. Se indica la pulpa roja (PR) y la pulpa blanca (PB) del órgano. Magnificación: 100x.

III.II.II- Efecto de la Fracción D en la prevención del desarrollo tumoral mamario.

Habiendo observado que la Fracción D de Maitake ejerce efectos antitumorales cuando se administra en ratones BALB/c portadores de tumores singenéticos de células LM3, decidimos evaluar el efecto antitumoral de la Fracción D administrada previamente a la exposición de un desafío tumoral, imitando un tratamiento preventivo.

Para evaluar si la Fracción D es capaz de prevenir el desarrollo tumoral, hembras BALB/c sanas fueron tratadas diariamente, de manera intraperitoneal, con la Fracción D ($1,5 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$; $5 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$) o con su control durante 15 días. Finalizado el tratamiento preventivo, los ratones fueron desafiados con un implante de células LM3. A partir de entonces, los ratones fueron examinados diariamente para registrar el momento de la aparición tumoral. Como se observa en la Figura 45 A, cinco de los seis ratones controles presentaron desarrollo del tumor diez días después del implante de las células LM3; en el ratón control restante el tumor se manifestó a los doce días. Esto nos indicó que el tiempo necesario para la formación tumoral en el modelo murino de trasplante singenético con células LM3 fue de aproximadamente 10 días. En comparación al control, el pre-tratamiento de los ratones con la menor dosis de Fracción D ($1,5 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$; $n = 5$) llegó a duplicar el tiempo requerido para la aparición tumoral, ya que un ratón desarrolló el tumor luego de catorce días y el segundo luego de veinte días de la implantación celular (Figura 45 A). En función a la calidad de vida de los animales portadores de tumores, luego de 30 días de la implantación celular se decidió poner punto final al ensayo, momento

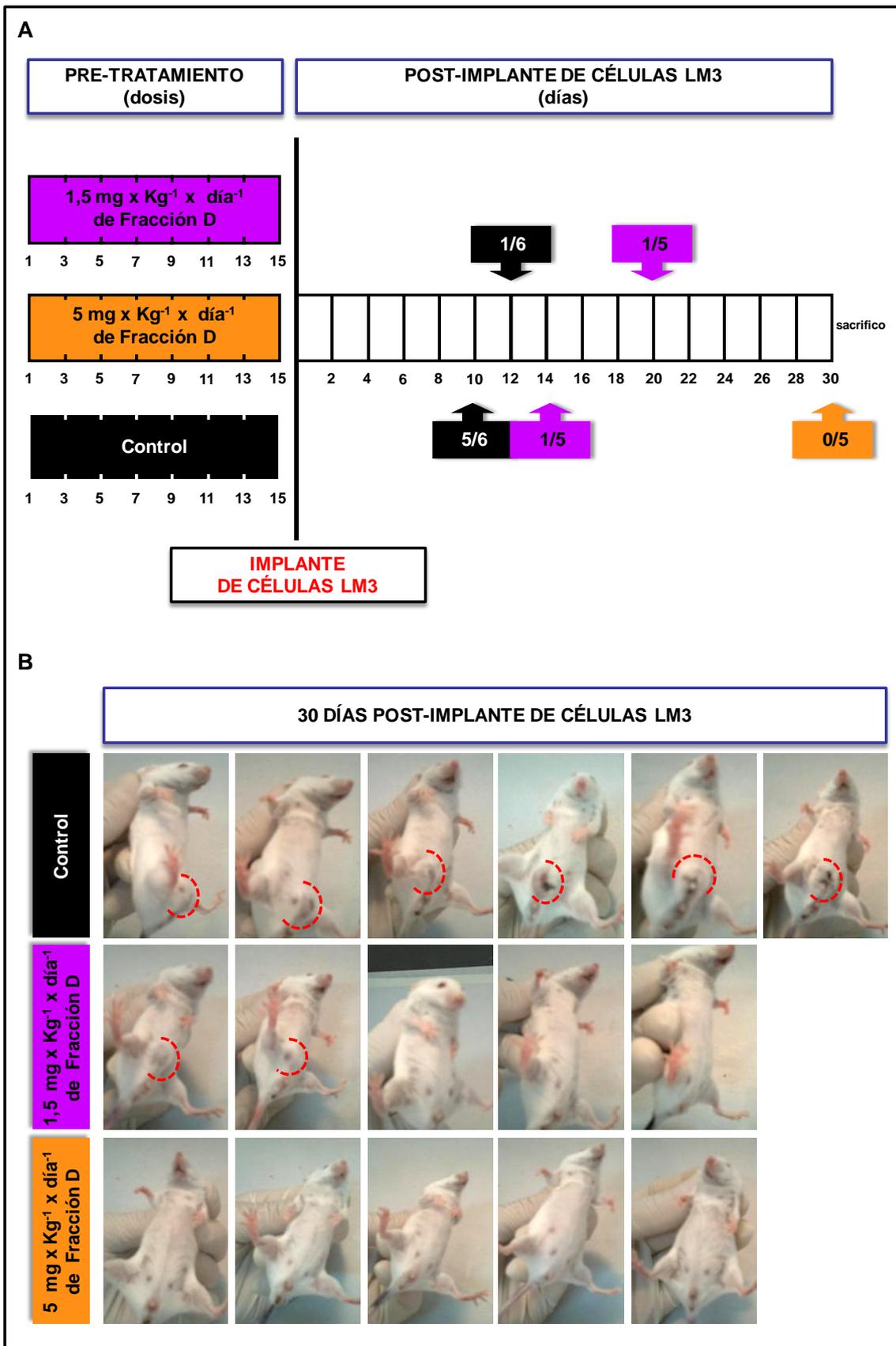


Figura 45. Efecto del pre-tratamiento de ratones BALB/c con la Fracción D de Maitake sobre el tiempo requerido para el establecimiento del tumor y la incidencia tumoral. A. Ratones BALB/c fueron pre-tratados con distintas dosis de Fracción D (1,5 mg x Kg⁻¹ x día⁻¹ o 5

mg x Kg⁻¹ x día⁻¹) o con su control durante 15 días y sometidos luego a la implantación de células tumorales LM3. En la escala de tiempo se indica el momento (día) posterior al implante de las células LM3 en que los ratones pertenecientes a los distintos grupos experimentales manifestaron el establecimiento del tumor. **B.** Fotos de cada uno de los ratones pertenecientes a los distintos grupos experimentales a los 30 días de la implantación de las células LM3. Se evidencia la presencia/ausencia de tumor en cada ratón a ese momento.

en el cual ninguno de los ratones pre-tratados con 5 mg x Kg⁻¹ (n = 5) manifestaron desarrollado tumor (Figura 45 A). Por lo tanto, en este experimento se pudo observar que el pre-tratamiento de los ratones con la Fracción D de Maitake produjo tanto un retraso en el comienzo del desarrollo de los tumores como así también una diferencia en la incidencia. Con respecto a este último punto, mientras que en el grupo control se observó una incidencia tumoral del 100 % (6/6 ratones) a los 30 días del implante celular, en el grupo pre-tratado con 1,5 mg x Kg⁻¹ de Fracción D la incidencia tumoral fue del 40 % (2/5 ratones), y al aumentar la dosis de Fracción D a 5 mg x Kg⁻¹ la incidencia tumoral se hizo nula (0/5 ratones) (Figura 45 B).

Estos resultados indican que el pre-tratamiento con la Fracción D de Maitake en ratones sanos que van a ser sometidos a un desafío tumoral logra un retraso y/o una prevención del desarrollo tumoral durante los 30 días posteriores al desafío.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como se comentó en la Introducción de esta tesis, los compuestos naturales han sido y son de gran importancia para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. Existe evidencia de que la Fracción D, proteoglucano obtenido del hongo *Grifola frondosa* (Maitake), presenta efectos anticancerígenos en las distintas etapas de la progresión tumoral. Sin embargo, estos efectos han sido poco explorados en el caso del cáncer de mama. Es por ello que en la presente tesis nos interesamos en investigar el potencial efecto terapéutico de la Fracción D de Maitake en este tipo de cáncer.

Como también fue descrito en la sección de Introducción, los efectos antitumorales de la Fracción D han sido atribuidos exclusivamente a su capacidad inmunoestimuladora. Sin embargo, recientemente se ha comenzado a observar que la Fracción D podría actuar también sobre las células tumorales de manera independiente del sistema inmune. Por esta razón es que también nos propusimos evaluar dicho accionar del proteoglucano sobre células tumorales mamarias e identificar los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la Fracción D sería capaz de ejercer un efecto antitumoral independiente del sistema inmune.

Por lo tanto, al postular en esta tesis que parte de la potencialidad de la Fracción D de Maitake para actuar como un agente terapéutico en el cáncer de mama es atribuida a sus efectos independientes del sistema inmunológico resultó necesario demostrar que efectivamente la Fracción D por sí misma es capaz de influir sobre las células tumorales e inducir en ellas algún tipo de cambio. Tal influencia fue ampliamente demostrada al evidenciar que el tratamiento de células tumorales mamarias con el proteoglucano *in cultivo*, y por lo tanto en ausencia de la acción del sistema inmune, indujo cambios en el nivel de expresión de un grupo importante de genes.

A partir de los genes que resultaron diferencialmente expresados en las células tumorales mamarias luego de la exposición al proteoglicano y teniendo en cuenta las funciones biológicas con las cuales resultaron vinculados, fue posible visualizar el potencial mecanismo de acción del proteoglicano. Es probable que la Fracción D active un receptor de superficie celular desencadenando una transducción de señales que lleve a la regulación de la transcripción génica. Recordemos que muchos genes vinculados a tales funciones resultaron diferencialmente expresados por el proteoglicano. A su vez, el hecho de que genes vinculados a diversas tareas esenciales para el mantenimiento de las células tales como el metabolismo, la síntesis, el transporte, el procesamiento del ARN entre otras, hayan visto su expresión modulada da indicio de la amplitud del efecto del proteoglicano sobre la célula tumoral. Por último, y no por ello menos importante, detectamos que muchos genes diferencialmente expresados por la Fracción D de Maitake se encontraban vinculados a procesos celulares y moleculares cuya desregulación conduce al desarrollo y la progresión del cáncer. Entre ellos detectamos: el crecimiento y proliferación celular, la apoptosis, la adhesión celular, migración e invasión, la formación de metástasis y la supresión tumoral.

El hecho de que genes con funciones opuestas hayan resultado sobreexpresados creemos que podría estar reflejando estímulos opuestos: uno de ellos dictado por la Fracción D sobre la célula tumoral, y el segundo producido por la célula tumoral en respuesta y tendiente a lograr sobrevivir y diseminarse. El efecto final va a estar dado por lo tanto por el estímulo que resulte predominante.

Es por ello que habiendo demostrado que la Fracción D de Maitake tiene la capacidad de ejercer efectos directos sobre la expresión de genes y que los productos de muchos de ellos están vinculados con procesos cuya desregulación está implicada en el desarrollo y progresión del cáncer, la pregunta que nos formulamos entonces es cuál sería el efecto final desencadenado por el proteoglicano sobre tales procesos. Es decir, determinar si luego de la modulación génica, se alcanza un efecto antitumoral

que sugiera el potencial empleo de la Fracción D como agente terapéutico en cáncer de mama.

Con tal fin, realizamos ensayos *in cultivo* trabajando con células de adenocarcinoma mamario murino (LM3) y humano (MDA-MB-231). Observamos que la Fracción D de Maitake es capaz de actuar, independientemente del sistema inmunológico, sobre dichas células tumorales modulando diferentes capacidades celulares implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer.

Particularmente demostramos que la Fracción D de Maitake disminuye la viabilidad de las células LM3 y MDA-MB-231 de manera dependiente de la concentración y el tiempo de tratamiento, mediante la inducción de apoptosis y sin afectar la progresión del ciclo celular. Como se detalló en la Introducción, algunas líneas celulares han sido reportadas como resistentes al tratamiento con la Fracción D, lo cual sugiere que el efecto del proteoglicano, al menos a nivel de viabilidad celular, podría ser específico del tipo de cáncer. En este contexto, los resultados de esta tesis aportan evidencia que células tumorales mamarias, tanto murinas como humanas, *in cultivo* responden al tratamiento con la Fracción D de Maitake.

Más aún, teniendo en cuenta la heterogeneidad de esta patología es interesante destacar que demostramos que el efecto exhibido por la Fracción D sobre la viabilidad celular ocurre en ausencia de receptores hormonales e incluso en células triples negativas. Si a esto, le sumamos el efecto de la Fracción D sobre las células MCF-7 anteriormente reportado por nuestro grupo de investigación (Soares et al, 2011), se puede decir que la Fracción D ejerce su efecto independientemente del estado de receptores hormonales de las células tumorales. En este aspecto, no son muchos los extractos de hongos comestibles capaces de desplegar tal efecto. De 38 extractos evaluados sobre células MCF-7, BT-20 y MDA-MB-231, sólo tres de ellos fueron capaces de afectar la viabilidad de estas tres líneas tumorales mamarias (Gu & Leonard, 2006). Por el contrario, lo más frecuente es que los extractos fúngicos disminuyan la viabilidad de las células RE+ inhibiendo la actividad de la

aromatasa (Grube et al, 2001; Petrova et al, 2005; Zaidman et al, 2005; Jafaar et al, 2014). Los resultados de esta tesis adquieren una mayor relevancia dada la necesidad actual de desarrollar nuevos agentes terapéuticos que permitan el tratamiento de los carcinomas de mama negativos para receptores hormonales y más aún de los triples negativos.

Por otro lado, se ha sugerido que la Fracción D de Maitake podría exhibir un efecto antiproliferativo o citotóxico dependiente del tipo cáncer. Nuestros resultados obtenidos sobre las líneas LM3 y MDA-MB-231 estarían indicando que en cáncer de mama la Fracción D disminuye la viabilidad de las células tumorales sin afectar su proliferación. En su lugar, y en concordancia con lo reportado para las células MCF-7 (Soares et al, 2011) la disminución de la viabilidad sería producto de la inducción de apoptosis producida por el proteoglicano.

Aproximadamente, el 90 % de las muertes por cáncer son causadas por la diseminación metastásica de la enfermedad. Pese a la relevancia clínica que tiene este proceso y a los avances logrados en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, actualmente carecemos de terapias efectivas para prevenir el desprendimiento de las células tumorales del foco primario e impedir su establecimiento en un órgano secundario (Christofori, 2006; Quintela-Fandino et al, 2010). Debido a esto resulta interesante evaluar el potencial efecto antimetastásico de la Fracción D en el cáncer de mama.

Como hemos comentado anteriormente, el proceso metastásico es un proceso complejo y multiescalonado, por lo que al momento de evaluar el efecto antimetastásico de un agente resulta importante estudiarlo sobre las distintas etapas, considerando que las células tumorales deben superar cada una de ellas para lograr metastatizar.

El proceso metastásico comienza con un invasión primaria o local, en la cual la célula tumoral migra activamente desde su lugar de origen, a través de la MEC, hasta alcanzar los vasos por los cuales viajará rumbo a un tejido distante. En esta tesis demostramos que el tratamiento de las células

tumorales LM3 y MDA-MB-231 con la Fracción D disminuyó significativamente la capacidad migratoria de ambas líneas. Es sabido que alteraciones en la adhesión célula-célula y célula-componentes de la MEC tienen un rol central en facilitar la migración celular, y por consiguiente promover la invasión y la diseminación metastásica. En este trabajo demostramos que la Fracción D aumenta significativamente la expresión de E-cadherina al menos en las células MDA-MB-231. Considerando que esta proteína participa de la adhesión intercelular a nivel de las uniones adherentes de las células epiteliales (Christofori, 2006; Baum & Georgiou, 2011) es probable que el incremento de su expresión inducida por el proteoglicano contribuya a mantener a las células de los carcinomas firmemente unidas a sus vecinas, disminuyendo la probabilidad del desprendimiento de las mismas para comenzar a migrar. Considerando también que la pérdida de expresión de E-cadherina es considerada un *hallmark* del proceso de TEM (Mallini et al, 2014), este es un resultado alentador por comenzar a estudiar la influencia de la Fracción D sobre dicha transición.

Por otro lado, es sabido que para liberarse y migrar las células tumorales dependen también de la interacción con la MEC. Mientras que adhesiones fuertes a la MEC impiden la migración, adhesiones transitorias o débiles son un prerrequisito para la misma (Christofori, 2006). En este aspecto, la Fracción D de Maitake aumentó significativamente la adhesión de las células tumorales al plástico, siendo dicho efecto más pronunciado en las células LM3 en comparación con las MDA-MB-231. Es probable que esta mayor adhesión al sustrato que dificulta la migración de las células tumorales se deba a un aumento de la expresión de fibronectina inducida por el proteoglicano en las células tumorales mamarias. La fibronectina es una glicoproteína de la MEC que presenta un rol clave en el comportamiento adhesivo y migratorio de las células. Se ha observado que el potencial metastásico de células tumorales mamarias se encuentra inversamente correlacionado con la expresión de fibronectina (Urtreger et al, 1998). Más aún se ha determinado que sólo la secreción de fibronectina, independientemente de su ensamblaje en la MEC, es suficiente para incrementar la capacidad de adhesión de las células, disminuir su capacidad migratoria *in vitro* y disminuir el potencial metastásico *in vivo*

(Urtreger et al, 1998). En concordancia con esto, se ha postulado que la fibronectina podría actuar como un gen supresor de metástasis en cáncer de mama (Urtreger et al, 2006). Apoyando esta idea, observamos que el gen *FNDC3B* codificante de la fibronectina resultó sobreexpresado en las células tumorales luego del tratamiento con la Fracción D de Maitake.

En este trabajo demostramos también que el tratamiento de las células tumorales LM3 y MDA-MB-231 con la Fracción D de Maitake afecta la organización del citoesqueleto de actina, siendo esto último parte del proceso de motilidad celular (Yamazaki et al, 2005). Observamos que en el caso de las células LM3, la Fracción D disminuyó la formación de lamellipodios y filopodios, mientras que en las células MDA-MB-231 lo que se observó fue una disminución de la formación de fibras de estrés. Muchas de las modificaciones del citoesqueleto de actina que son necesarias para la migración celular están mediadas por distintas GTPasas de la familia Rho (Guo & Giancotti, 2004). Particularmente, Rho induce la formación de fibras de estrés, Rac1 la formación de lamellipodios y Cdc42 la formación de filopodios (Christofori, 2006; Quintela-Fandino et al, 2010; Schenk 2015). Teniendo en cuenta esto, es factible pensar que la Fracción D podría estar afectando la organización del citoesqueleto de actina mediante distintas Rho GTPasas en las células LM3 y MDA-MB-231.

Además de disminuir la capacidad migratoria de las células tumorales LM3 y MDA-MB-231, la Fracción D de Maitake demostró también disminuir la actividad de MMP-s vinculadas al proceso invasivo de células tumorales mamarias. Es sabido que las MMP-s tienen la capacidad de degradar prácticamente todos los componentes de la MEC (Yadav et al, 2014), con lo cual su actividad favorece la migración e invasión de células tumorales y por consiguiente la diseminación metastásica de las mismas (Roy & Walsh, 2014). En este trabajo de tesis, detectamos una marcada disminución de la actividad de MMP-2 liberada por ambas líneas celulares. En el caso de las células MDA-MB-231 también se detectó una disminución posterior de la actividad de MMP-9. Se ha sugerido que la modulación de la expresión, secreción y/o activación de la MMP-2 podría proveer de nuevas estrategias para el tratamiento del

cáncer de mama (Duffy et al, 2000; Jezierska & Motyl, 2009). Particularmente, y en concordancia con el estado de receptores hormonales de las líneas tumorales LM3 y MDA-MB-231, se demostró que bajos niveles de MMP-2 se asocia con un pronóstico favorable en pacientes con tumores mamarios negativos para receptores hormonales (Talvensaari-Mattila et al, 2003). En este contexto la Fracción D podría potencialmente ser utilizada como inhibidor de la actividad de MMP-2 e incluso como inhibidor de su secreción, mediado esto último por la sobreexpresión génica de *CAV1* (gen codificante de Caveolina 1) detectada en las células tumorales tratadas con la Fracción D de Maitake. En relación a ello, se ha demostrado que la expresión de *CAV1* en células tumorales mamarias altamente metastásicas disminuye la secreción de MMP-2 y MMP-9, y consecuentemente la capacidad invasiva de las células *in cultivo* y su potencial metastásico *in vivo* resultan disminuidos (Williams et al, 2004; Jezierska & Motyl, 2009).

En el caso de las células MDA-MB-231 también detectamos una disminución de la actividad de MMP-9. Si bien, la Fracción D aumentó la expresión génica de *MMP9* podría ser que pese al aumento de su expresión la MMP no sea secretada por las células o bien no resulte activada como fue demostrado mediante zimografía.

En conjunto, todos estos resultados obtenidos *in cultivo* nos sugieren que la Fracción D podría afectar las distintas fases de la invasión primaria del proceso metastásico: adhesión de las células tumorales, degradación local de la MEC por parte de proteasas y motilidad de las células tumorales. A su vez, el acoplamiento de estos efectos explica la disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales, observada en los ensayos con Matrigel, producida por la Fracción D de Maitake.

Los potentes efectos antitumorales de la Fracción D observados *in cultivo* sobre células de adenocarcinoma mamario murino y humano le confieren al proteoglicano la potencialidad para actuar como agente terapéutico en cáncer de mama. A su vez, es sabido que una característica deseada en todo compuesto con potencial efecto terapéutico antineoplásico es

que presente un accionar diferencial entre las células tumorales y las células normales.

En este sentido, demostramos que la Fracción D presenta un efecto diferencial sobre la viabilidad de células no malignas HC11 afectándolas en menor medida que a su contraparte tumoral, recordemos que la IC_{50} para las células no malignas resultó ser más de 3 veces superior a la IC_{50} de las células tumorales LM3. Sin embargo, la Fracción D disminuyó la capacidad migratoria de las células no malignas HC11, siendo este efecto más rápido que el observado en la contraparte tumoral LM3. En cuanto a la capacidad invasiva de las células HC11, demostramos que esta no resultó afectada por el proteoglicano.

Demostrados los efectos antitumorales de la Fracción D *in cultivo* sobre las células LM3 y MDA-MB-231 continuamos profundizando los ensayos preclínicos *in vivo* a fin de corroborar si la Fracción D era capaz de desarrollar efectos semejantes sobre los correspondientes modelos murinos de cáncer.

En el modelo murino de trasplante singenético con células LM3 utilizado en esta tesis demostramos que el tratamiento de los ratones con la Fracción D de Maitake disminuye la carga tumoral, siendo esta disminución detectada tanto durante el tratamiento como *ex vivo* a nivel del peso y volumen tumoral. El aumento de la expresión de Bax en los tumores de los ratones tratados con la Fracción D, sugiere que la disminución de la carga tumoral observada podría deberse a la inducción de apoptosis, tal como fue demostrado *in cultivo*. Más aún demostramos que el tratamiento de los ratones con la Fracción D de Maitake disminuye el número de metástasis pulmonares. Es probable que el incremento de la adhesión, la disminución de la motilidad, migración e invasión producido por la Fracción D sobre las células LM3 *in cultivo*, hayan permitido alcanzar este efecto antimetastásico *in vivo*. El aumento de la expresión de E-cadherina inducida por la Fracción D en las células LM3 *in cultivo* fue muy marcada en estos tumores *in vivo*, con lo cual es probable que la Fracción D haya permitido mantener las características epiteliales normales y disminuido la magnitud del proceso metastásico. Sin embargo, teniendo en cuenta lo que se

sabe sobre la acción de la Fracción D sobre el sistema inmunológico, no se puede descartar la posibilidad que esta disminución de las metástasis sea debida, al menos parcialmente, a la estimulación de dicho sistema por parte del proteoglucano. De todas formas existe una clara correlación entre los efectos antitumorales de la Fracción D observados *in cultivo* sobre las células LM3 y los efectos observados *in vivo* sobre el modelo animal de carcinoma mamario. También es importante destacar que hasta donde pudo ser investigado en esta tesis no se obtuvo evidencia de que la Fracción D resulte tóxica para los ratones.

En el caso de las células MDA-MB-231, los efectos antitumorales de la Fracción D observados *in cultivo* no se repitieron en el ensayo *in vivo*. Esto es especialmente importante ya que dichas células derivan de tumores humanos. Creemos que este resultado puede estar influido por falencias que presentó el modelo murino de xenotrasplante con células MDA-MB-231. En ocasiones este modelo muestra una eficiencia de desarrollo tumoral prácticamente nula. Si bien en nuestro experimento, no se observó baja eficiencia de desarrollo tumoral sí se pudo advertir que el comportamiento de los tumores no fue el esperado ya que se desarrollaron como una masa muy dispersa cuyo tamaño se incrementó solo ligeramente con el paso del tiempo, tanto en los animales tratados como en los controles. Estas características del modelo dificultaron la decisión del momento de inicio del tratamiento y entorpecieron la medición de los parámetros de desarrollo tumoral.

Por otra parte también es lamentable que no se hayan observado efectos antitumorales en este modelo ya que la detección de los mismos hubiera permitido descartar, al menos parcialmente, el efecto estimulador de la Fracción D sobre el sistema inmunológico ya que como se sabe, los ratones nude son inmunodeficientes.

Dada la importancia que tiene poder comprobar el efecto antitumoral de la Fracción D en un modelo animal que utilice células tumorales humanas y como continuación de este proyecto de investigación, nos proponemos intentar mejorar este modelo y/o trabajar con otros modelos murinos tales como

ratones SCID o ratones *Rag-knockout* en los que el implante tumoral resulte más efectivo y nos permita fehacientemente contrastar los resultados obtenidos *in cultivo* con un ensayo *in vivo*. A su vez, estos últimos modelos nos permitirían demostrar *in vivo* la acción antitumoral de la Fracción D independiente del sistema inmunológico.

Además del efecto antitumoral y antimetastásico ejercido por la Fracción D de Maitake en ratones BALB/c portadores de tumores singenéticos de células LM3, demostramos que si estos mismos animales son tratados con la Fracción D previamente a exponerlos al desafío tumoral de implantación de células LM3, se logra retrasar y/o prevenir el desarrollo tumoral. Previamente, la capacidad anticarcinogénica de la Fracción D había sido demostrada en ratones expuestos a NDBA (Nanba, 1995) y 3-MCA (Nanba & Kubo, 1997). Sin embargo, a diferencia de estos trabajos, nosotros no evaluamos la transformación de células normales en tumorales por acción de un carcinógeno, sino que evaluamos la respuesta del organismo no tratado y tratado con la Fracción D ante la implantación de un tumor.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan evidencia de que la Fracción D, proteoglucano obtenido del hongo *Grifola frondosa*, posee actividad antitumoral sobre células derivadas de carcinomas mamarios murino y humano. La Fracción D actúa sobre las células tumorales mamarias, independientemente del sistema inmune, modulando su perfil de expresión génica y afectando diferentes capacidades celulares implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer. La Fracción D disminuyó la viabilidad las células tumorales mediante la inducción de apoptosis, ejerciendo un efecto diferencial sobre células no malignas. Dicha fracción aumentó la adhesión de las células tumorales, tanto a nivel intercelular como célula-matriz, y disminuyó la actividad de MMP-s secretadas por las células neoplásicas. Esto influyó en la disminución de la migración e invasión celular lograda por la Fracción D de Maitake. Es de suponer que tales efectos detectados *in cultivo* son responsables, al menos en parte, del efecto antitumoral y antimetastásico ejercido por la Fracción D de Maitake *in vivo* sobre tumores singenéticos de células LM3. Por otro lado, la Fracción D ejerció un efecto protector en ratones

BALB/c, retrasando y/o previniendo el desarrollo tumoral luego de la implantación de células LM3. Estos resultados apoyan el potencial empleo de la Fracción D de Maitake como agente terapéutico en cáncer de mama, y dan muestra de nuevos procesos celulares y moleculares por los cuales el proteoglicano estaría ejerciendo su efecto antitumoral. Próximos ensayos *in vivo*, nos permitirán continuar evaluando los efectos de la Fracción D sobre las células tumorales humanas e investigar qué parte de este efecto puede ser atribuido a la acción del sistema inmune y cuánto es independiente de él.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 2007, 43(8): 597-606.

Alexander B, Fishman AI, Eshghi M, Choudhury M, Konno S. Induction of cell death in renal cell carcinoma with combination of D-fraction and vitamin C. *Integr Cancer Ther*, 2013, 12(5): 442-448.

Babu MM. An Introduction to Microarray Data Analysis. In Computational Genomics: Theory and Application. Edited by Richard P. United Kingdom: *Horizon Bioscience*, 2004: 225-249.

Baum B, Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*, 2011, 192(6): 907-917.

Benada J, Macurek L. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules*, 2015, 5(3): 1912-1937.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(12): 786-801.

Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ, Gershwin ME. The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233(3): 259-276.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol*, 2005, 7(4): 471-479.

Carlson RW, Allred DC, Anderson BO, Burstein HJ, Carter WB, Edge SB, Erban JK, Farrar WB, Goldstein LJ, Gradishar WJ, Hayes DF, Hudis CA, Jahanzeb M, Kiel K, Ljung BM, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Nabell

LM, Pierce LJ, Reed EC, Smith ML, Somlo G, Theriault RL, Topham NS, Ward JH, Winer EP, Wolff AC; NCCN Breast Cancer Clinical Practice Guidelines Panel. Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 2009, 7(2): 122-192.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011, 331(6024): 1559-1564.

Chan E, Saito A, Honda T, Di Guglielmo GM. The acetylenic tricyclic bis(cyano enone), TBE-31 inhibits non-small cell lung cancer cell migration through direct binding with actin. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(7): 727-737.

Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*, 2009, 2:25.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis*, 2010, 32(1-2): 35-48.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.

Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature*, 2006, 441(7092): 444-450.

Cooper CS. Applications of microarray technology in breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 2001, 3(3): 158-175.

de Matos DC, de Ribeiro LC, Tansini A, Ferreira LS, Placeres MC, Colombo LL, Carlos IZ. Immunological response in mice bearing LM3 breast tumor undergoing pulchellin treatment. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12:107.

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.

Degen M, Alexander B, Choudhury M, Eshghi M, Konno S. Alternative therapeutic approach to renal-cell carcinoma: induction of apoptosis with combination of vitamin K3 and D-fraction. *J Endourol*, 2013, 27(12): 1499-1503.

Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, 2000, 2(4): 252-257.

Ebeling S, Naumann K, Pollok S, Wardecki T, Vidal-Y-Sy S, Nascimento JM, Boerries M, Schmidt G, Brandner JM, Merfort I. From a traditional medicinal plant to a rational drug: understanding the clinically proven wound healing efficacy of birch bark extract. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86147.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(6): 1471-1474.

Eisner T, Niemeyer H. Fármacos naturales. *Rev. Cien. Hoy*, 1996, 6(33): 1-5.

Ferreira IC, Vaz JA, Vasconcelos MH, Martins A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(5): 424-436.

Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S. Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide). *Mol Urol*, 2000, 4(1): 7-13.

Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*, 1972, 3:1-103.

Grant GM, Fortney A, Gorreta F, Estep M, Del Giacco L, Van Meter A, Christensen A, Appalla L, Naouar C, Jamison C, Al-Timimi A, Donovan J, Cooper J, Garrett C, Chandhoke V. Microarrays in cancer research. *Anticancer Res*, 2004, 24(2A): 441-448.

Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. *J Nutr*, 2001, 131(12): 3288-3293.

Gu YH, Leonard J. In vitro effects on proliferation, apoptosis and colony inhibition in ER-dependent and ER-independent human breast cancer cells by selected mushroom species. *Oncol Rep*, 2006, 15(2): 417-423.

Gueron G, Giudice J, Valacco P, Paez A, Elguero B, Toscani M, Jaworski F, Leskow FC, Cotignola J, Marti M, Binaghi M, Navone N, Vazquez E. Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 2014, 5(12): 4087-4102.

Guo B, Fedorova ND, Chen X, Wan CH, Wang W, Nierman WC, Bhatnagar D, Yu J. Gene expression profiling and identification of resistance genes to *Aspergillus flavus* infection in peanut through EST and microarray strategies. *Toxins (Basel)*, 2011, 3(7): 737-753.

Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 816-826.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 309-322.

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 Lett*, 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). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1988, 36(5): 1819-1827.

Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, Xing PX, Cheung NK, Ross GD. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol*, 2004, 173(2): 797-806.

IARC: International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimates of the incidence of, mortality and prevalence worldwide in 2012 (en línea). Fecha de consulta: 2 Noviembre 2015. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/>.

Illana-Esteban C. The fungus maitake (*Grifola frondosa*) and its therapeutic potential. *Rev Iberoam Micol*, 2008, 25(3): 141-144.

Inoue A, Kodama N, Nanba H. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion. *Biol Pharm Bull*, 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. *Int J Oncol*, 2014, 44(4): 1365-1375.

Jeziarska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit*, 2009, 15(2): RA32-40.

Kim EJ, Choi MR, Park H, Kim M, Hong JE, Lee JY, Chun HS, Lee KW, Yoon Park JH. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(4): R78.

Kodama N, Asakawa A, Inui A, Masuda Y, Nanba H. Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Oncol Rep*, 2005, 13(3): 497-502.

Kodama N, Harada N, Nanba H. A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice. *Jpn J Pharmacol*, 2002 (B), 90(4): 357-360.

Kodama N, Kakuno T, Nanba H. Stimulation of the natural immune system in normal mice by polysaccharide from maitake mushroom. *Mycoscience*, 2003 (A), 44: 257-261.

Kodama N, Komuta K, Nanba H. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *J Med Food*, 2003 (B), 6(4): 371-377.

Kodama N, Komuta K, Sakai N, Nanba H. Effects of D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells. *Biol Pharm Bull*, 2002 (A), 25(12): 1647-1650.

Kodama N, Yamada M, Nanba H. Addition of Maitake D-fraction reduces the effective dosage of vancomycin for the treatment of *Listeria*-infected mice. *Jpn J Pharmacol*, 2001, 87(4): 327-332.

Konno S. Effect of various natural products on growth of bladder cancer cells: two promising mushroom extracts. *Altern Med Rev*, 2007, 12(1): 63-68.

Konno S. Maitake D-Fraction: A promising natural agent for alternative cancer treatment. *The Original Internist*, 2002: 44-49.

Konno S. Potential growth inhibitory effect of maitake D-fraction on canine cancer cells. *Vet Ther*, 2004, 5(4): 263-271.

Konno S. Synergistic potentiation of D-fraction with vitamin C as possible alternative approach for cancer therapy. *Int J Gen Med*, 2009, 2: 91-108.

Konno S, Alexander B, Freilich D, Choudhury M. Improved anticancer effects on various cancers with combinations of chemotherapeutic drugs or Vitamin C and D-Fraction. *Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4, 843-850.

Kozłowski J, Kozłowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015, 69: 447-451.

Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(10): 1890-1909.

Lanari C, Wargon V, Rojas P, Molinolo AA. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready?. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(3): R35-50.

Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*, 1997, 57(15): 3071-3078.

Liefers GJ, Tollenaar RA. Cancer genetics and their application to individualised medicine. *Eur J Cancer*, 2002, 38(7): 872-879.

Loganathan J, Jiang J, Smith A, Jedinak A, Thyagarajan-Sahu A, Sandusky GE, Nakshatri H, Sliva D. The mushroom *Ganoderma lucidum* suppresses breast-to-lung cancer metastasis through the inhibition of pro-invasive genes. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 2009-2015.

Louie B, Rajamahanty S, Won J, Choudhury M, Konno S. Synergistic potentiation of interferon activity with maitake mushroom d-fraction on bladder cancer cells. *BJU Int*, 2010, 105(7): 1011-1015.

Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm*, 2005, 2005(2): 63-80.

Mallini P, Lennard T, Kirby J, Meeson A. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(3): 341-348.

Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential. *Altern Med Rev*, 2001, 6(1): 48-60.

Nanba H, Kubo K. Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 833: 204-207.

Nanba H. Activity of maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 768: 243-245.

Nanba H. Maitake D-fraction: healing and preventive potential for cancer. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 1997, 12(1), 43:49.

National Cancer Institute: Comprehensive Cancer Information (on line). Fecha de consulta: 28 Enero 2016. Disponible en: <http://www.cancer.gov>.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, 2007, 70(3): 461-477.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 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 (Auckl)*, 2015, 9(Suppl 2): 17-34.

Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh JT. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol*, 2004, 51(2): 445-457.

Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2012, 2(1): 1-15.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752.

Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Vallés AM. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol*, 2000, 148(5): 957-970.

Petrova RD, Wasser SP, Mahajna J, Denchev CM, Nevo E. Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. *Int J Med Mushr*, 2005, 7, 141-155.

Pizarro SC, Ronco AMM, Gotteland MR. β -glucans: what types exist and what are their health benefits?. *Rev Chil Nutr*, 2014, 41(3): 439-446.

Pyo P, Louie B, Rajamahanty S, Choudhury M, Konno S. Possible immunotherapeutic potentiation with D-fraction in prostate cancer cells. *J Hematol Oncol*, 2008, 1:25.

Quintela-Fandino M, González-Martín A, Colomer R. Targeting cytoskeleton reorganisation as antimetastatic treatment. *Clin Transl Oncol*, 2010, 12(10): 662-669.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 120(2): 293-308.

Ramirez NE, Zhang Z, Madamanchi A, Boyd KL, O'Rear LD, Nashabi A, Li Z, Dupont WD, Zijlstra A, Zutter MM. The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 226-237.

Román Curto C. El proceso metastásico. I: invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermosifiliogr*, 1999, 90:143-155.

Rose DP, Connolly JM, Liu XH. Effects of linoleic acid on the growth and metastasis of two human breast cancer cell lines in nude mice and the invasive capacity of these cell lines in vitro. *Cancer Res*, 1994, 54(24): 6557-6562.

Roy DM, Walsh LA. Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 2014, 6: 81-91.

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. *J Exp Clin Cancer Res*, 2001, 20(4): 591-597.

Schenk M, Aykut B, Teske C, Giese NA, Weitz J, Welsch T. Salinomycin inhibits growth of pancreatic cancer and cancer cell migration by disruption of actin stress fiber integrity. *Cancer Lett*, 2015, 358(2): 161-169.

Singh RP, Agarwal R. Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(3): 345-354.

Smadelli G, Freddo J, Giordo P, Sensuke K. Safety of Maitake D-Fraction in healthy patients. Assessment of common hematologic parameters. *Altern Comp Ther*, 2004, 10: 228-230.

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. *J Med Food*, 2011, 14(6): 563-572.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10869-10874.

Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. *Ten Speed Press*, Berkeley, California. 3rd edition, 2000.

Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)*, 2010, 4:35-41.

Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M, Yadomae T. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1989, 37(2): 410-413.

Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 2003, 89(7): 1270-1275.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.

Urtreger A, Ladedá V, Puricelli L, Rivelli A, Vidal M, Delustig E, Joffe E. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *Int J Oncol*, 1997, 11(3): 489-496.

Urtreger A, Porro F, Puricelli L, Werbajh S, Baralle FE, Bal de Kier Joffé E, Kornblihtt AR, Muro AF. Expression of RGD minus fibronectin that does not form extracellular matrix fibrils is sufficient to decrease tumor metastasis. *Int J Cancer*, 1998, 78(2): 233-241.

Urtreger AJ, Werbajh SE, Verrecchia F, Mauviel A, Puricelli LI, Kornblihtt AR, Bal de Kier Joffé ED. Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential. *Oncol Rep*, 2006, 16(6): 1403-1410.

Volman, JJ. Immune modulation by dietary glucans from oat and mushrooms; results from *in vitro*, animal and human studies (Thesis). University Pers Maastricht, 2009. ISBN 978-90-5278-911-8.

Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol*, 2012, 91(2): 299-309.

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 Res*, 2009, 11(3):R26.

Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem*, 2004, 279(49): 51630-51646.

Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3): 1085-1091.

Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci*, 2005, 96(7): 379-386.

Yan J, Allendorf DJ, Brandley B. Yeast whole glucan particle (WGP) beta-glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(5): 691-702.

Zaidman BZ, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(4): 453-468.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Las investigaciones realizadas para este trabajo de Tesis han dado origen a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

I- Publicaciones.

Genes related to suppression of malignant phenotype induced by Maitake D-Fraction in breast cancer cells. Alonso EN, Orozco M, Eloy Nieto A, Balogh GA. *J Med Food*, 2013, 16(7): 602-617.

Antitumoral effects of D-Fraction from *Grifola frondosa* (Maitake) mushroom in breast cancer. Alonso EN, Ferronato MJ, Gandini NA, Fermento ME, Obiol DJ, López Romero A, Arévalo J, Villegas ME, Facchinetti MM, Curino AC. *Nutrition and Cancer: An International Journal*. Enviado el 26 de Noviembre de 2016.

II- Presentaciones a congresos.

Genomics changes induced by Maitake D-Fraction in the suppression of breast cancer phenotype. G. Balogh and E. Alonso. The 18th Congress of the International Society for Mushroom Science. Beijing, China. Agosto, 2012.

Could Maitake D-Fraction inhibits the malignant phenotype in breast cancer?. E. Alonso, D. Obiol and G. Balogh. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA). Rosario. Argentina. 22 y 23 de Noviembre de 2012.

Role of β -glucans in the prevention of mammary tumorigenesis. D. Obiol, E. Alonso, E. Fermento, G. Balogh. II Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA). Rosario. Argentina. 22 y 23 de Noviembre de 2012.

Antitumoral effects of *Grifola frondosa* (Maitake) D Fraction in breast cancer. A.C. Curino, M.J. Ferronato, N.A. Gandini, D.J. Obiol, M.E. Fermento, M.M. Facchinetti, A. López Romero, E.N. Alonso. III South American Symposium in Signal Transduction and Molecular Medicine (SISTAM). Bariloche. Argentina. 1-6 de Abril de 2015.

Efectos antitumorales de la Fracción D del Maitake (*Grifola frondosa*) en cáncer de mama. E.N. Alonso, D.J. Obiol, M.J. Ferronato, M.E. Fermento, D.G. Salomón, N.A. Gandini, A. López Romero, M.M. Facchinetti, A.C. Curino. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. Argentina. 19-22 de Noviembre de 2014.

Efectos antitumorales de la Fracción D de Maitake (*Grifola frondosa*) en cáncer de mama. E.N. Alonso, M.J. Ferronato, N.A. Gandini, M.E. Fermento, D.J. Obiol, J. Arévalo, M.M. Facchinetti, A.C. Curino. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata. Argentina. 18-21 de Noviembre de 2015. **Modalidad de la presentación:** oral.