



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Efecto de la Fracción D del hongo *Grifola frondosa* (Maitake), rica en beta-glucanos, sobre la carcinogénesis mamaria

N° 618

Agustina Roldán Deamicis

Director: Dr. Tomás Santa Coloma  
Co-Directora: Dra. Gabriela A. Balogh  
BIOMED-UCA-CONICET

Departamento de Investigaciones  
Diciembre 2013

Universidad de Belgrano  
Zabala 1837 (C1426DQ6)  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina  
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533  
e-mail: [invest@ub.edu.ar](mailto:invest@ub.edu.ar)  
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>



## AGRADECIMIENTOS

A mi Director, Dr. Tomás Santa Coloma, Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, CONICET) y del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Católica Argentina, por haberme recibido en el Laboratorio y en su equipo de trabajo, y por su muy generosa y paciente orientación.

A mi Codirectora, Dra. Gabriela Andrea Balogh, quien me permitió sumarme a su proyecto de investigación y me guio día tras día con amabilidad, entusiasmo y dedicación.

A la Dra. María Marta Corte, por su ayuda desinteresada con los estudios histológicos.

A mis compañeros del Laboratorio, Lic. Mariángeles Clauzure, Lic. María Macarena Massip Copiz, Dr. Ángel Gabriel Valdivieso, Dr. Cristian Asensio y Dr. Edgardo Kolkowski, de quienes también he aprendido en un clima de alegría y cordialidad.

A Luciana Moverer y María de los Ángeles Aguilar, por su ayuda con el manejo de los animales.

A las instituciones sin cuyo marco este trabajo no hubiera sido posible. A la Universidad Católica Argentina, por haberme permitido desarrollar este trabajo y por haber financiado parte del proyecto. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) cuya financiación de parte del proyecto ha sido de gran importancia para su concreción.

A la Universidad de Belgrano, por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mis padres, Helena y Juan Pablo, por haberme apoyado incondicionalmente en todo momento, por su amor y cariño.

A mis hermanos Ana y Juan Pablo, por estar conmigo y acompañarme siempre.

A mis amigos, especialmente a Eric y a Sofía, con quienes nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional, por compartir los buenos y malos momentos.

A todos aquellos que no nombré y que participaron directa o indirectamente e hicieron posible la elaboración de esta tesina.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - ATP binding cassette  
ADN- Acido desoxirribonucleico  
APC – Células presentadoras de antígenos  
ARN- Acido ribonucleico  
BBN - N-butil-N'-butanolnitrosoamina  
BRM - Modificadores de la respuesta biológica  
CMH I - Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I  
CUL3 - Cullin3  
DEPC - dietil pirocarbonato  
EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético  
EPO – Peróxido de ergosterol  
ER – Receptor de estrógenos  
ERK - Quinasa regulada por señales extracelulares  
HER2 - Receptor del factor del crecimiento epidérmico humano 2  
ICAM-1 - Molécula de adhesión intercelular 1  
IFN- $\gamma$  – Interferón  $\gamma$   
IGF - Factor de crecimiento insulínico  
IGFBPs - Proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina  
IGIF - Factor inductor de IFN-  $\gamma$   
IL – Interleuquina  
iNOS – Sintetasa óxido nítrico inducible  
IP – Intraperitoneal  
LB – Linfocitos B  
LT – Linfocitos T  
MEC – Matriz extracelular  
MEM - Minimum Essential Medium  
MRB- modificadores de la respuesta biológica  
NK –Células Natural killer  
NO – Óxido nítrico  
PBS – Buffer fosfato salino  
PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinasa  
PR - Receptor de progesterona  
ROS – Especies reactivas de oxígeno  
RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa  
SFB – Suero fetal bovino  
SPARC - Proteína secretada acídica y rica en cisteínas  
Tc – Célula T citotóxica  
Th – Célula T helper  
TLR – Toll-like receptors  
TNF- $\alpha$  - Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular  
VEGFR – Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres y la principal causa de muerte entre la población femenina mundial. Recientemente, diversos estudios han demostrado cómo se regula la respuesta inmune en el microambiente tumoral y el potencial que esto tiene sobre la terapia contra el cáncer. Sin embargo, no está claro cómo los tumores son capaces de inducir una tolerancia a la respuesta inmune y cómo se activan las vías regulatorias negativas que lo protegen del hospedador. El entendimiento de los mecanismos moleculares que conducen a la tolerancia inmune en el microambiente tumoral es fundamental para prevenir el desarrollo del cáncer o para aplicarlo en inmunoterapia contra el cáncer. Los tratamientos convencionales contra el cáncer de mama implican cirugía, seguida de radiación y terapia hormonal y/o quimioterapia. Algunos de estos tratamientos tienen efectos secundarios tóxicos. Las drogas usadas en la quimioterapia afectan en diversos grados tanto a las células cancerosas como a las normales. Actualmente se está investigando el desarrollo de drogas “dirigidas”, que sólo ataquen a las células cancerosas, sin afectar a las células normales. Una aproximación a esto es buscar compuestos que sean más selectivos y específicos, que solo destruyan las células tumorales y prevengan la metástasis sin dañar a las células normales.

Por miles de años, se han usado hongos medicinales debido a sus propiedades curativas. Una amplia tradición ha transmitido el conocimiento de las propiedades de los hongos de generación en generación, particularmente en Japón y China. Además, estos países cuentan con el apoyo de décadas de investigación científica en el tema. Actualmente, Maitake (*Grifola frondosa*) se presenta como uno de los hongos medicinales más interesantes y está siendo estudiado arduamente. Un extracto de Maitake, denominado Fracción D, rica en  $\beta$ -glucanos, aparentemente ejerce notables efectos sobre el sistema inmune. Los  $\beta$ -glucanos, son importantes componentes de la pared celular de hongos, levaduras y bacterias. Los provenientes de hongos y levaduras consisten en una cadena lineal polimérica de D-glucosa unidas mediante enlace  $\beta$ -1,3, y que poseen cadenas laterales de D-glucosa, unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,6.

Los resultados hasta ahora publicados sugieren que la Fracción D de Maitake podría tener actividad anti-carcinogénica, prevenir la oncogénesis y la metástasis en algunos tipos tumorales. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales la Fracción D actúa aún no están definidos. Se ha reportado que los  $\beta$ -glucanos se unen a receptores de CD11b presentes en la membrana externa de macrófagos y otras células sanguíneas incluyendo las “natural killer” (NK) y las células T citotóxicas (Tc). Estas células inmunes son muy importantes en la protección y la lucha contra el cáncer, dado que pueden atacar a las células tumorales. Además de incrementar la habilidad de los macrófagos de fagocitar y destruir células cancerosas, microbios y otras células extrañas, la Fracción D de Maitake estimula la producción de proteínas de señalización del sistema inmune, tales como interleuquinas-1, interleuquinas-2, y otras citoquinas.

En este trabajo de Tesina, demostramos que el tratamiento con la Fracción D de Maitake puede estimular la muerte celular en cultivos de células tumorales LM3. Por otro lado, los resultados sugieren que dicha fracción, administrada a ratones BALB/c, previene el desarrollo de tumorigénesis mamaria, bloquea la invasividad de los tumores, disminuye el proceso de angiogénesis y aumenta la supervivencia de los ratones. Demostramos que 5mg/kg/día de Maitake PRO4X, administrado durante 15 días consecutivos, es capaz de bloquear en más del 40% el proceso de la carcinogénesis mamaria. Este sorprendente resultado nos ha hecho pensar que quizás el componente activo de Maitake pueda ser empleado como agente preventivo de la tumorigénesis mamaria en una población de riesgo. Queda por demostrar cuál es el mecanismo molecular por el cual Maitake Pro4X actúa como bloqueante de la carcinogénesis mamaria en ratones.

En este trabajo también comparamos los efectos de la Fracción D del Maitake, con los de quimioterapia (Doxorrubicina+Ciclofosfamida) en el tratamiento de ratones BALB/c con cáncer de mama y determinamos si existe un efecto co-adyuvante entre Maitake y quimioterapia. Luego de 5 semanas de tratamiento observamos que la Fracción D Pro 4X de Maitake, administrada durante 5 semanas a ratones con tumores de mama, aumenta significativamente la supervivencia total de los animales y disminuye la malignidad de los tumores mamarios.

En un futuro cercano estamos interesados en analizar la composición bioquímica exacta de la Fracción D y realizar estudios de HPLC y espectrometría de masas para determinar cuál de los componentes de dicho extracto es responsable de la actividad biológica demostrada en este trabajo. El impacto socio-económico de este proyecto de investigación podría ser importante, considerando que en Argentina aún

no se han realizado estudios similares empleando compuestos naturales derivados de hongos medicinales para el tratamiento del cáncer. Los efectos benéficos de Maitake, de comprobarse, podrían ser de gran utilidad para el tratamiento de pacientes con cáncer que se encuentren bajo quimioterapia o radiación.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
Incidencia del Cáncer de mama.....	9
Tratamiento del cáncer de mama .....	9
Quimioterapia .....	10
Doxorrubicina .....	10
Ciclofosfamida .....	11
Hongos comestibles y medicinales.....	12
Hongo Maitake ( <i>Grifola frondosa</i> ).....	13
Maitake y cáncer .....	14
Rol de Maitake en la inmunomodulación .....	14
Efectos de extractos de Maitake sobre el sistema inmune innato .....	15
Efectos de Maitake sobre el sistema inmune adaptativo .....	16
Rol de Maitake en la apoptosis .....	16
Efecto de Maitake en la angiogénesis .....	17
Actividad anti-metastásica de Maitake.....	17
Maitake y quimioterapia .....	17
Extractos de Maitake y expresión de genes relacionados con el fenotipo maligno.....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
Objetivo general .....	21
Objetivos específicos .....	21
<b>METODOLOGÍA EMPLEADA</b> .....	21
Materiales .....	21
Fracción D de Maitake .....	21
Cultivos Celulares .....	21
Animales .....	22
Efecto de Maitake o del tratamiento quimioterápico sobre la muerte celular en células tumorales de mama .....	22
Tratamientos .....	22
Determinación de la muerte celular.....	23
Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones .....	24
Diseño experimental .....	24
Tratamiento de ratones con Maitake .....	25
Cuantificación de células LM3 para inducir tumor mamario en ratones.....	26
Observación de tumorigénesis mamaria.....	27
Sacrificio de los animales.....	27
Confección de tacos de parafina.....	27
Cortes histológicos de tejidos.....	27
Índice Angiogénico .....	28
Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la tumorigénesis mamaria y análisis de la coadyuvancia con quimioterapia para el tratamiento de tumores de mama en ratones....	29
Diseño experimental.....	29
Descongelación de las células LM3.....	29
Cambio del medio de cultivo celular.....	30
Congelamiento de células LM3 para conservación de alícuotas .....	30
Expansión de células en cultivo .....	30
Preparación de las células LM3 para inyectar ratones .....	30
Inducción del proceso tumorigénico.....	30
Administración oral de Maitake y quimioterapia.....	31
Chequeos y controles periódicos de los efectos terapéuticos sobre la tumorigénesis mamaria .....	31
Medición de sobrevida de los animales de cada grupo. ....	32
Sacrificio de los animales .....	32

RT-PCR de genes específicos para determinar si existe inhibición del fenotipo tumoral inducida por Maitake en tejido tumoral mamario. ....	32
Aislamiento de ARN a partir de tejido mamario.....	32
Purificación del ARN aislado de tejido mamario.....	33
Cuantificación de ARN por espectrofotometría .....	33
Reacción de RT-PCR .....	33
Gel de agarosa al 3% para visualización de las bandas específicas.....	34
Análisis estadístico .....	35
<b>RESULTADOS</b> .....	35
Efecto de los extractos de Maitake y del tratamiento quimioterápico sobre la muerte celular en células tumorales de mama LM3.....	35
Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones .....	37
Efecto de la Fracción D de Maitake sobre la tumorigénesis mamaria y análisis de la coadyuvancia con quimioterapia para el tratamiento de tumores de mama en ratones .....	47
Efecto de Maitake Pro4X sobre la expresión de genes específicos del fenotipo tumoral inducido por Maitake en tejido tumoral mamario .....	52
<b>DISCUSION</b> .....	54
<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>REFERENCIAS</b> .....	59

## INTRODUCCIÓN

### **Incidencia del Cáncer de mama**

Hoy en día, el cáncer de mama es el segundo tipo más frecuente de cáncer en el mundo y el que tiene mayor incidencia en la población femenina mundial. Es también la principal causa de muerte por cáncer en mujeres [1]. Afecta principalmente a mujeres de alrededor de 50 años de edad; raramente se presenta antes de los 30 años [2]. En las últimas décadas, se ha observado un incremento en la incidencia de cáncer de mama a nivel mundial, en todas las edades.

### **Tratamiento del cáncer de mama**

El tratamiento del cáncer de mama debe ser abordado con una visión integral del paciente, por lo que se requiere un equipo multidisciplinario para llevarlo a cabo [2]. Las modalidades terapéuticas incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia. Para la elección del tratamiento adecuado deben tenerse en cuenta diversos factores, tales como el estadio y tamaño del tumor, tipo y grado histológico, estado ganglionar, niveles de receptores de estrógeno y progesterona en el tejido tumoral, de HER2 (un receptor de la familia del EGF o “Epidermal Growth Factor”), condiciones clínicas y hormonales del paciente [2-4].

Para tumores sin metástasis y localizados suele utilizarse cirugía (tumorectomía o mastectomía). En estos casos, la cirugía va generalmente acompañada de un tratamiento de quimioterapia, hormonoterapia o radioterapia adyuvante, a fin de disminuir el riesgo de desarrollar recurrencias [3]. La radioterapia emplea radiaciones de alta energía emitidas de forma externa o directamente en el tumor para eliminar las células cancerosas [5]. En la hormonoterapia se bloquea la acción de hormonas o se reducen sus niveles, impidiendo el crecimiento de las células. La quimioterapia, generalmente sistémica, es el tratamiento más empleado en combinación con la cirugía. Interrumpe el crecimiento de las células cancerosas y causa su muerte. Las drogas de quimioterapia más empleadas son la Ciclofosfamida, el Metotrexato y la Doxorrubicina.

Cuando se trata de una enfermedad metastásica, el tratamiento persigue fines paliativos. Tiene por objeto mejorar la calidad de vida del paciente y prolongarla. La tasa media de supervivencia es baja en general, aunque algunas mujeres pueden sobrevivir por más tiempo [3]. El tratamiento suele dividirse en quimioterapia estándar y terapia dirigida [6]. La radioterapia y/o la cirugía sólo se utilizan en casos muy concretos, cuando existe una metástasis dolorosa o problemas locales de dolor o hemorragia en la mama. Las terapias dirigidas incluyen hormonoterapia, terapia inmunológica y terapia anti-angiogénica [6].

La hormonoterapia tiene como objetivo bloquear el receptor de estrógenos (ER) o reducir los niveles de estrógenos inhibiendo la enzima aromatasa, encargada de convertir los andrógenos adrenales en estrógenos endógenos. Esta es la única fuente de estrógenos en las mujeres post-menopáusicas [7]. Por ejemplo, el tamoxifeno bloquea el ER. Entre los inhibidores de aromatasa se hallan las drogas letrozole, anastrozole y exemestane [8].

En aquellas pacientes que tienen tumores que sobre-expresan HER2 se emplea Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente HER2 y bloquea la proliferación de los tumores que sobre-expresan HER2 [7]. Este anticuerpo suele utilizarse en combinación con quimioterapia. Por otro lado, Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado del VEGF (“vascular endothelial growth factor”) murino; inhibe la proliferación del endotelio y priva a las células tumorales del suministro de vasos sanguíneos [9, 10].

Aunque la supervivencia de los pacientes ha aumentado gracias a las nuevas terapias, los tumores presentan con frecuencia mecanismos de resistencia a la quimioterapia. La resistencia a múltiples fármacos se presenta en el 30% de los pacientes tratados con agentes antineoplásicos. Se cree que se debe a la sobreexpresión de proteínas del tipo transportadores ABC en la membrana de células cancerosas. Estas proteínas actúan como bombas expulsoras de las drogas, dependientes de ATP [11]. Por este motivo, sumado a los numerosos efectos adversos que tiene el tratamiento, se buscan con insistencia alternativas más benévolas y efectivas para el tratamiento.

## Quimioterapia

El término quimioterapia hace referencia a un tratamiento médico basado en la administración de sustancias químicas. Sin embargo, suele utilizarse con más frecuencia para las drogas empleadas en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas a fin de impedir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea eliminándolas o deteniendo su división [5].

La quimioterapia se utiliza con distintos fines: curar el cáncer; impedir que el cáncer se propague al eliminar las células enfermas que alcanzaron otros órganos; o eliminar los síntomas para mejorar la calidad de vida del paciente, cuando la cura no es posible [12]. Muchas veces se emplea luego de la cirugía para evitar el crecimiento de restos tumorales o evitar la metástasis.

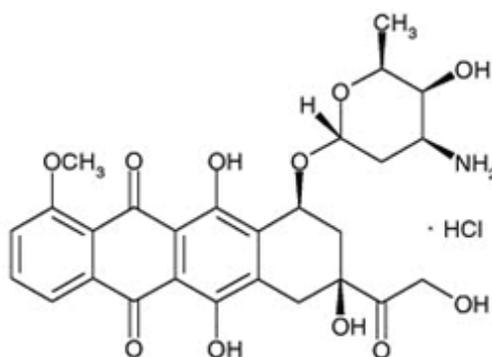
La quimioterapia tiene diversos blancos como ácidos nucleicos y proteínas o procesos celulares, como la división celular. Actúa aprovechando la mayor sensibilidad al tratamiento que tienen las células que se dividen rápidamente, por lo que no sólo afecta a las células cancerosas sino también a células normales en división activa, como las células en la médula ósea, tracto digestivo y folículo piloso [13]. Esto explica algunos de los efectos secundarios comunes como son la mielosupresión, la mucositis y la alopecia [14-16]. Como ya se mencionó, otra limitación, además de la escasa especificidad de la quimioterapia, es la adquisición de resistencia a las drogas por las células a medida que progresa el tratamiento y el tumor se va adaptando.

## Doxorrubicina

La Doxorrubicina es un antibiótico de la familia de las antraciclinas, citotóxico, utilizado como quimioterapéutico en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, entre ellos el de mama. Fue aislado de una mutante de *Streptomyces peucetius* [17, 18]. Tiene un espectro más amplio y mayor eficiencia contra los tumores que su antecesor, la adriamicina. Se metaboliza predominantemente en el hígado a doxorubicinol y varios metabolitos citotóxicos [19]. La Doxorrubicina está compuesta por un grupo cromóforo tetracíclico, la aglicona, asociado a un azúcar, la daunosamina (Figura 1). Inhibe la multiplicación de las células tumorales mediante dos mecanismos que llevan a la disrupción del ADN [12, 17]:

1. El cromóforo se intercala entre pares de bases adyacentes de la doble hélice de ADN (forma complejos), especialmente en las zonas ricas en GC. El azúcar se asocia con las desoxirribosafosfato nucleares. La torsión de la doble hélice del ADN generada impide la replicación del ADN y su transcripción.
2. Inhibe la actividad de la topoisomerasa II, enzima que permite la escisión-reparación temporal de la doble cadena de ADN, esencial para la replicación. Se ha propuesto que la formación de un complejo ternario droga-topoisomerasa II-ADN estabiliza la unión ADN-topoisomerasa II de tal forma que el ADN es clivado [20, 21].

La formación de radicales libres también participa de la ruptura del ADN y en la peroxidación de lípidos celulares. Se alteran las membranas celulares y se activa la proteína quinasa C, que participa induciendo apoptosis [22].



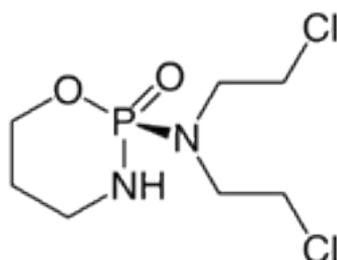
**Figura 1:** Estructura química de la Doxorrubicina.

Como toda droga quimioterapéutica, la Doxorrubicina posee efectos secundarios adversos, de los cuales el más importante es su efecto cardiotoxico dosis dependiente [17, 23, 24]. Su toxicidad está relacionada con la liberación de radicales libres, responsables del estrés oxidativo que provoca la peroxidación de los lípidos de membrana y daño a proteínas, carbohidratos y ADN, entre otros efectos perjudiciales [25].

Las reacciones adversas más frecuentes incluyen [17]: mielosupresión con leucopenia, anemia aplásica, trombocitopenia, cambios electrocardiográficos agudos y transitorios, arritmias cardíacas, insuficiencia ventricular izquierda, cardiotoxicidad crónica relacionada con la dosis arritmias agudas, alopecia completa, amenorrea, oleadas de calor, oligospermia, azoospermia, emesis relacionada con la dosis, anorexia, diarrea, mucositis, estomatitis, esofagitis, ulceración y necrosis intestinal y coloración roja de las orinas hasta dos días después de la administración de la droga.

## Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida es un agente alquilante del grupo de oxazoforinas, con actividades citotóxica e inmunosupresora [21, 26]. Inhibe la multiplicación de las células tumorales, pero también puede actuar sobre a células sanguíneas, produciendo efectos adversos. Se considera que los agentes alquilantes ejercen su actividad inmunosupresora inhibiendo la replicación del ADN nuclear. Sustituyen un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo, preferentemente en el nitrógeno 7 de la guanina. Se bloquean de esta forma la replicación del ADN y su transcripción, conduciendo a la muerte celular [12, 26].



**Figura 2:** Estructura química de la Ciclofosfamida.

La Ciclofosfamida es un compuesto cíclico, que consiste en un anillo de fosforamida con dos grupos cloroetil [27] (Figura 2). Es activada por oxidasas hepáticas; los metabolitos, de los cuales el principal es la mostaza fosforamida, se dirigen a las células neoplásicas por la sangre [27]. No se conoce con certeza la base de la especificidad y selectividad de la Ciclofosfamida para las células cancerosas. Una hipótesis sugiere que las células normales contienen un mayor nivel de enzimas oxidativas, responsables de la detoxificación de los metabolitos de la Ciclofosfamida, que las células cancerosas [26, 27].

La Ciclofosfamida es un carcinógeno, que puede producir tumores secundarios [27]. Se ha demostrado que en las células somáticas produce mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas, micronúcleos e intercambios entre las cromátides hermanas. En células germinales, se ha visto que la Ciclofosfamida induce daño genético, aberraciones estructurales y numéricas en los cromosomas durante la meiosis y eleva la frecuencia de micronúcleos de las espermátides.

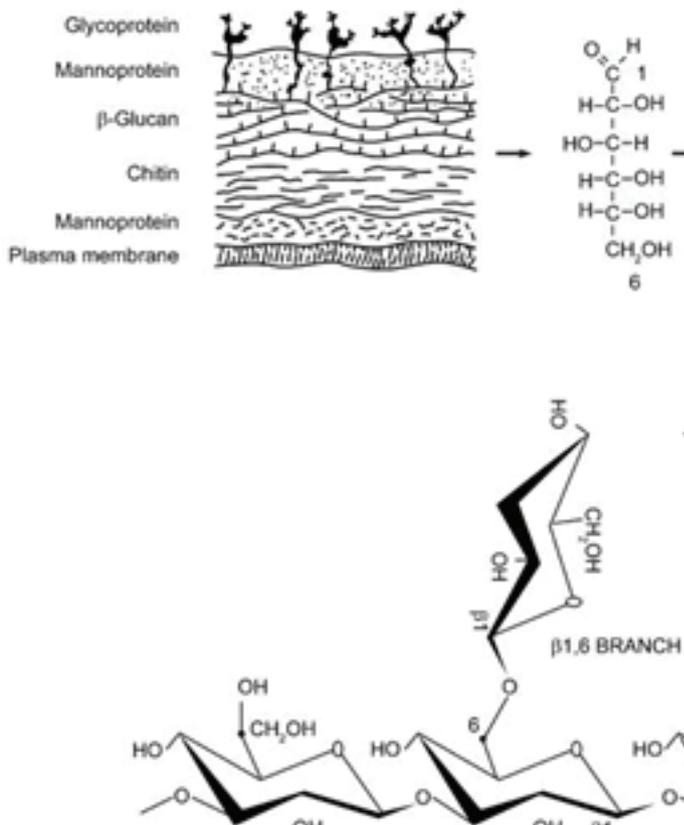
Los efectos adversos de la Ciclofosfamida son más frecuentes si se administra mediante un tratamiento prolongado; la mayoría son reversibles si se detectan tempranamente. Las reacciones adversas más frecuentes son [26]: neoplasias secundarias: (de vejiga, mieloproliferativas o linfoproliferativas) al usarlo solo o con otros antineoplásicos o radioterapia, a veces años después del tratamiento; alérgicas/dermatológicas (alopecia, erupciones exantemáticas, hiperpigmentación cutánea); cardiovasculares (raramente, necrosis cardíaca hemorrágica, hemorragia transmural, vasculitis coronaria con dosis masivas); digestivas (náuseas, vómitos, dolor abdominal, pérdida de apetito, diarrea, estomatitis); vesicales (cistitis hemorrágica aguda, se cree que debido al efecto directo de metabolitos tóxicos en la orina); hepatobiliares (raramente, ictericia); respiratorias (ocasionalmente neumonitis, fibrosis pulmonar, en tratamientos prolongados con dosis altas); hematológicas (mielosupresión debido a la inhibición de las poblaciones celulares de rápida división, leucopenia, anemia, trombopenia), gonadales (azoospermia y amenorrea. En hombres produce,

aplasia de las células de Sertoli y pérdida del revestimiento de epitelio de los túbulos seminíferos. En mujeres, atrofia ovárica, fibrosis y ausencia completa de estructuras foliculares).

### Hongos comestibles y medicinales

Los hongos difieren de las especies de los reinos plantae ni animalia, por lo que se los clasifica dentro de un reino propio, el reino fungi. En Asia, los hongos se han consumido tradicionalmente por sus propiedades nutricionales y medicinales, siendo descritos ya desde el 2700 a.C. [28]. Se cree que solamente se conoce un 10% de las 140.000 especies de hongos estimadas sobre la Tierra. Se estima, además, que solamente el 5% de estas especies presentan propiedades farmacológicas conocidas [29]. La producción por los hongos de metabolitos biológicamente activos constituye un campo de estudio muy amplio y prometedor, que hasta hoy ha sido escasamente estudiado. Entre sus metabolitos se hallan agentes antifúngicos, antimicrobianos, antivirales y citostáticos y enzimas reguladoras de crecimiento [30, 31]. También algunos hongos producen sustancias cancerígenas, como las aflatoxinas [32, 33]. En la medicina tradicional oriental se han empleado por miles de años hongos medicinales como *Grifola frondosa* (Maitake), *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Inonotus obliquus* (Chaga), *Lentinus edodes* (Shiitake), entre otros [29]. En cambio, en Occidente su aceptación es menos frecuente, a causa del posible riesgo de adquirir enfermedades y de su posible toxicidad [34, 35].

Los  $\beta$  glucanos están presentes en la pared celular de hongos, levaduras, cereales y bacterias. Los presentes en hongos son polisacáridos que poseen una cadena lineal central de D-glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,3 con ramificaciones laterales de glucosa  $\beta$ -1,6, de distintos tamaños (Figura 3). Los  $\beta$ -glucanos



**Figura 3:** Estructura química de los beta 1,3 y beta 1,6 glucanos. Figura tomada de Chan, G.C., W.K. Chan, and D.M. Sze, The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. J Hematol Oncol, 2009. 2: p. 25. Utilizada con autorización del titular de los derechos.

ejercen efectos sobre el sistema inmune estimulando la actividad fagocítica, activando leucocitos e induciendo la producción de diversas citoquinas, lo cual les podría conferir su actividad antitumoral [36, 37]. Se ha demostrado que la administración oral de extractos de  $\beta$ -glucanos derivados del hongo medicinal *Grifola frondosa* (Maitake) podría estimular la hematopoyesis y la recuperación post-tratamiento con paclitaxel en modelos animales [38]. En particular los  $\beta$ -glucanos actúan sobre una variedad de receptores relacionados con el sistema inmune, particularmente actúan sobre Decina-1 y CR3, los cuáles disparan un amplio espectro de respuestas inmunes [39]. Las células inmunes blanco de  $\beta$ -glucanos son macrófagos, neutrófilos, monocitos, células NK y células dendríticas [39]. Las funciones inmunomoduladoras inducidas por  $\beta$ -glucanos involucran una respuesta innata y una respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, los mecanismos exactos de activación del sistema inmune mediado por los  $\beta$ -glucanos aún no se conocen y deben ser definidos. En un protocolo clínico prospectivo empleando 23 pacientes con cáncer de mama se ha demostrado que la administración oral de  $\beta$ -glucanos ( $\beta$  1,3 y 1,6 glucanos) logró estimular la proliferación y activación de monocitos de sangre periférica comparado con los controles sin tratar

[36]. No obstante, aún es incierta la exactitud de los beneficios clínicos de estos resultados e incluso han sido cuestionados [39].

En el presente trabajo estudiamos los efectos de la Fracción D de Maitake en la prevención y el tratamiento de la carcinogénesis mamaria en ratones. Maitake es un hongo comestible y medicinal. Su extracto, poseen  $\beta$ -glucanos con distinto grado de purificación y presentan propiedades antitumorales [40].

### Hongo Maitake (*Grifola frondosa*)

*Grifola frondosa*, también conocido como Maitake, es un hongo basidiomicete perteneciente a la familia Meripilaceae del orden Polyporal (Figura 4). Es originario del norte de Japón. Hoy se encuentra en los bosques templados del norte de Asia, Europa y al este de Norteamérica, donde parasita coníferas, robles, olmos, caquis y otros árboles. Forma una masa pesada de hasta 20 kg. Presenta basidiocarpos ramificados anuales de 40-50 cm de ancho hasta 1 m de diámetro [28, 41].



**Figura 4:** *Grifola frondosa*. Fotografía tomada de la página web [www.medicalmushrooms.net](http://www.medicalmushrooms.net). Utilizada con autorización del titular de los derechos.

Con respecto a las propiedades nutricionales de este hongo, los ejemplares frescos de los cuerpos fructíferos constan de un 80% de agua. El 22-27% de su peso seco son proteínas, el 50-60% hidratos de carbono y el 4% grasas. Posee vitaminas B1, B2, B6, niacina, ácido fólico, vitamina C y vitamina D. Los minerales que se encuentran en mayor proporción son potasio, fósforo y magnesio, seguidos del zinc, sodio, hierro y calcio. Trehalosa, glucosa y manitol son los azúcares libres que posee. Durante la formación del cuerpo fructífero contiene los ácidos orgánicos piroglutámico, láctico, acético, fórmico, málico, cítrico, succínico, oxálico y fumárico [28, 42, 43].

A principios de la década de los '80, el micólogo japonés Hiroaki Nanba estudiaba varios hongos medicinales. Llegó a la conclusión de que los polisacáridos de Maitake tenían una estructura única y su actividad antitumoral era la más poderosa. En 1984 identificó una fracción del micelio y el cuerpo fructífero de *Grifola frondosa* que presentaba la mayor actividad antitumoral y tenía un importante efecto inmunomodulador al ser administrado tanto por inyección como en forma oral [40]. La posibilidad de administración oral es una gran ventaja con respecto a los extractos de otros hongos que actuaban óptimamente al ser

inyectados. Dicha fracción se denominó Fracción D [41]. En la década de 1990 Nanba y Kubo realizaron una mayor purificación y llegaron a la fracción MD, más bioactiva [41].

La Fracción D de Maitake, insoluble en ácido, soluble en base y extraíble en agua caliente, está constituida por una mezcla de polisacáridos con una cadena principal de  $\beta$ -(1-6)-glucano con ramificaciones de  $\beta$ -(1,3)-glucano y proteínas, con un peso molecular de aproximadamente 1.000.000 Da [40].

Además de la actividad antitumoral, a la Fracción D de Maitake se le atribuyen otros efectos terapéuticos entre los que podemos mencionar: antifúngico [44], antibacteriano y antiparasítico [44], antiviral (contra virus de la gripe, HIV y hepatitis B) [44-47], anti-hipertensivo [45, 46, 48], anti-colesterolémico [45, 46], anti-hepatitis [42, 44, 46], protector hepático [44], anti-diabetes [45, 46], anti-síndrome de fatiga crónica [46], anti-osteoporosis [46], anti-enfermedad de Alzheimer [46], anti-obesidad [45, 46], anti-estreñimiento [46], anti-artritis reumatoide [46], actividad antioxidante [42] y control de candidiasis vaginal [42]. Esta variedad de efectos sugiere que estas fracciones de Maitake podrían contener diversos principios activos, aparte de los  $\beta$ -glucanos. Por otro lado, no se conoce ningún efecto tóxico del Maitake. Ha sido consumido en Oriente, especialmente en Japón, desde hace cientos de años y se ha usado en la medicina tradicional china. La seguridad en el consumo ha sido confirmada por el Consumer Product Testing Co. (New Jersey, USA) [28, 49].

## Maitake y cáncer

Hoy en día, dadas las limitaciones de las terapias convencionales para reducir la tasa de mortalidad por cáncer, se focalizan muchos esfuerzos en la prevención de la carcinogénesis. Las células cancerosas se desarrollan a partir de células normales que crecen anormalmente y se convierten en malignas, por lo que es difícil que una droga que pretende prevenir la carcinogénesis o inhibir el crecimiento de células tumorales, no afecte también a las células normales. En este contexto, ha ganado protagonismo el empleo de inmunopotenciadores, inmunoiniciadores o modificadores de la respuesta biológica (BRM), capaces de estimular las células inmunes que pueden identificar a las células tumorales como extrañas, eliminarlas y prevenir la carcinogénesis [22].

Los  $\beta$ -glucanos son BRM que, a diferencia de los quimioterapéuticos convencionales, activarían o reforzarían el sistema inmune del hospedador, contribuyendo a eliminar o inhibir el crecimiento tumoral. Se ha demostrado que las fracciones obtenidas a partir de Maitake pueden combatir el cáncer enlenteciendo o deteniendo el crecimiento tumoral; y previniendo la metástasis [41]. Por otra parte, podrían disminuir los efectos secundarios de la quimioterapia, tales como la pérdida de cabello, dolor y náuseas, y potenciar sus efectos positivos [50].

Como se mencionó, se ha visto actividad anti-tumoral asociada a la Fracción D de Maitake. Dicha actividad podría ejercerse de diversas formas. La Fracción D de Maitake suprimiría indirectamente el crecimiento tumoral gracias a un posible efecto inmunomodulador. Tiene capacidad para estimular células presentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas y macrófagos, linfocitos T helper, células NK y linfocitos T citotóxicos que pueden atacar a las células tumorales [49, 51]. Activa directamente estas células del sistema inmune, pero además aumenta su eficiencia incrementando los niveles de IL-1 (que lleva a la activación de linfocitos T citotóxicos), IL-2 y linfoquinas. Asimismo, se ha demostrado un efecto antitumoral directo de estos extractos sobre células de cáncer al inducir en éstas apoptosis [52-55], aunque este efecto podría deberse a otras sustancias presentes en los extractos, como peróxido de ergosterol [56].

## Rol de Maitake en la inmunomodulación

Los  $\beta$ -glucanos son una de las formas más abundantes de polisacáridos halladas en la pared celular de bacterias y hongos [39]. Es sabido que varios  $\beta$ -glucanos son potentes estimuladores inmunológicos en mamíferos. Esto se debe a que, al no ser sintetizados por el organismo, son reconocidos como moléculas extrañas por el sistema inmune, induciendo una respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Los  $\beta$ -glucanos consisten en una columna lineal de D-glucosa elongada por la posición  $\beta$ -1,3 con ramificaciones laterales  $\beta$ -1,6 y en una columna lineal  $\beta$ -1,6 con ramificaciones laterales  $\beta$ -1,3 (Figura 3). Se ha asociado un mayor grado de complejidad estructural con efectos inmunomoduladores y anti-cancerígenos

más potentes. Se cree que cuanto mayor sea el grado de ramificación, mayor será la probabilidad de activar un mayor número de células inmunes [57]. Se conoce que el peso molecular y la columna central  $\beta$ -1,3 son esenciales para obtener los efectos de interés y que las ramificaciones  $\beta$ -1,6 los incrementan. Se sabe también que los  $\beta$ -glucanos solubles poseen la inmunoestimulación más poderosa, además de que están disponibles para su absorción cuando se administran por vía oral [58].

Los  $\beta$ -glucanos presentes en otros hongos medicinales difieren de los del Maitake porque tienen sólo una cadena principal 1,3 con ramificaciones 1,6. Los de Maitake, en cambio, poseen una única y compleja estructura con una cadena principal con alto grado de ramificaciones 1,3 y una cadena principal 1,3 con ramificaciones 1,6 [41]. El elevado peso molecular de la Fracción D de Maitake también contribuye a sus efectos inmunomoduladores al aumentar muchas actividades inmunológicas [41, 43].

### Efectos de extractos de Maitake sobre el sistema inmune innato

La inmunidad innata, especialmente por la acción de las células natural killer (NK), es el principal arma de inmunovigilancia contra el desarrollo tumoral. Entre los componentes de la inmunidad innata se encuentran los macrófagos, que atacan células muertas y patógenos intracelulares; las células NK, que lisan las células tumorales y las infectadas por virus; los neutrófilos, que atacan bacterias piógenas; y los eosinófilos, responsables de la muerte de ciertos parásitos. En el inicio y regulación de la respuesta inmune innata por  $\beta$ -glucanos está involucrado el receptor proteico Dectina-1. Cuando reconoce los  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos, dispara una respuesta inmune que incluye fagocitosis y liberación de citocinas, como interleuquina (IL)-12, IL-16, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-10 [22, 59].

Los macrófagos y los granulocitos neutrófilos reconocen a los microbios mediante toll-like receptors (TLR) y los fagocitan. Como consecuencia se activan varias enzimas, incluyendo oxidasas y sintetasa óxido nítrico inducible (iNOS), que generan intermediarios reactivos de oxígeno bactericidas y óxido nítrico (NO), que matan al microbio fagocitado [60]. Una vez activados, los macrófagos secretan citoquinas y quimioquinas (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 e IL-12) que activan nuevos macrófagos, células T, neutrófilos y células natural killer (NK). Las células T y NK producen luego interferón (IFN)- $\gamma$  que refuerza la activación de los macrófagos.

Distintos estudios han reportado que la administración intraperitoneal de la Fracción D en ratones sanos lleva al aumento de la activación de macrófagos y producción de numerosas citoquinas [59, 61, 62]. Recientemente se demostró que la Fracción MD de Maitake aumentaba la producción de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) por macrófagos, aumentando su proliferación y la producción de TNF- $\alpha$  mediada por dectina-1 [59]. Además, se demostró que la administración conjunta de Maitake con el carcinógeno N-butil-N'-butanolnitrosoamina (BBN) permite mantener en nivel normal la actividad quimiotáctica de los macrófagos, mientras que ésta es suprimida cuando los ratones son tratados únicamente con BBN [63].

Las células NK detectan cambios existentes en la superficie de células tumorales y células infectadas por ciertos virus y bacterias. Lisan a la célula target y producen citoquinas como IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que modulan respuestas inmunes naturales y específicas. Las células NK destruyen muchos tipos de células tumorales, especialmente aquellas que presentan una reducción de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (CMH I) pero que expresan ligandos para los receptores activadores de las células NK. Las NK también responden a la falta de moléculas CMH I, cuyo reconocimiento proporciona señales inhibitoras. La capacidad tumoricida de los NK es potenciada por ciertas citoquinas como interferones e interleuquinas 2 y 12 [64].

Se ha reportado que la Fracción D de Maitake estimula a las células NK in vitro e in vivo [49, 65, 66]. Se demostró en ratones que el tratamiento con la Fracción D incrementa los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que aumentan la activación de las células NK [49, 67]. Se vio que los macrófagos tratados con Fracción D elevaban la liberación de IL-12, implicada en la activación de NK al incrementar la unión de perforinas sobre la célula target, aumentando así la lisis de las células tumorales [49, 67]. La estimulación de la activación de las células NK por la Fracción D fue confirmada mediante la evaluación de la expresión de CD69, marcador de activación de NK, sobre la superficie de las células NK de ratones tratados [66]. Más adelante se vio, en estudios clínicos, que la administración de la Fracción D estimulaba y mantenía en

el rango normal la actividad de las células NK en sangre periférica de pacientes con cáncer [51], aunque esto no demuestra que hayan tenido algún efecto beneficioso sobre el tumor o la sobrevida. Por otra parte, la validez de estos estudios clínicos ha sido muy cuestionada [39, 68].

### Efectos de Maitake sobre el sistema inmune adaptativo

Los linfocitos B (LB) y T (LT) son los actores principales de la respuesta inmune adaptativa, específica o adquirida. Poseen la capacidad de reconocer distintos determinantes antigénicos y de distinguirlos específicamente. Ha sido demostrado que la administración intraperitoneal de Fracción D de Maitake a ratones portadores de tumores disminuye la expresión del marcador de activación CD69 sobre células B, mientras que incrementa su expresión en LT aislados de ganglios linfáticos inguinales [69]. Estos resultados muestran que la Fracción D inhibe la activación de LB productores de anticuerpos, pero activa LT, lo que podría estimular la inmunidad celular.

Dentro de la población linfocitaria T se encuentran los T helper (Th) y los T citotóxicos (Tc). Las células Th (CD4+) interactúan con los otros linfocitos para ayudarlos a dividirse y diferenciarse. Llevan a cabo sus funciones mediante la liberación de citoquinas solubles y/o por la interacción directa célula-célula. La función de las células Tc (CD8+), efectoras de la inmunidad celular, es destruir células que han sido infectadas por patógenos. Son también las encargadas de destruir las células tumorales.

Las células Th se clasifican según el tipo de citoquinas que producen. Al mismo tiempo, las citoquinas presentes en el microambiente son las que promueven la diferenciación de las células T hacia Th1 o Th2. Las células Th1 producen IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  que activan a las células Tc e inducen la inmunidad celular, principalmente ante infecciones intracelulares. Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que activan la inmunidad humoral con la consiguiente producción de anticuerpos, principalmente frente a infecciones extracelulares [69].

El tipo de respuesta inmune que se estimula depende de la proporción de Th1 y Th2 [70]. Este sistema de control se ve afectado también por la producción de IFN, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-18 por las células presentadoras de antígeno (APC) [69]. La IL-12p70 induce la diferenciación a células Th-1, resultando en la producción de IFN, que induce la respuesta Th-1 dominante. La IL-12 activa macrófagos y células NK mediante la promoción de la respuesta inmune por Th-1. La IL-18, también conocida como factor inductor de IFN- $\gamma$  (IGIF), coopera con IL-12 para promover la producción de IFN- $\gamma$  por las células T y B y mejora las funciones de las células Th-1, así como la expresión del ligando Fas [71, 72].

Muchos desórdenes inmunes pueden atribuirse a un desbalance en la proporción de linfocitos Th1 y Th2 [69]. Con el desarrollo del cáncer, se produce una marcada desregulación en el balance Th1/Th2. La respuesta de tipo Th2 adquiere un papel preponderante mientras que se va perdiendo la respuesta inmune Th1 en forma progresiva. La restauración del correcto balance es esencial en el tratamiento de los tumores generados cuando la inmunidad celular se ve afectada por factores inmunosupresores.

Se ha estudiado la influencia de la Fracción D sobre el balance Th1/Th2 en ratones portadores de tumores y se ha concluido que polariza la respuesta T helper hacia Th1 ante el fuerte desarrollo de la respuesta Th-2 debida al carcinoma. La polarización se produce a través del aumento de la liberación de determinadas citoquinas por las células presentadoras de antígeno (APC) y la disminución de la liberación de otras citoquinas [69, 70]. Aumenta significativamente la liberación por células del bazo y de los ganglios linfáticos inguinales de IL-12 12p70 (interleuquina de mayor importancia para la activación de Th1) e IL-18, involucradas en la activación de células Th1 [69, 73]. La administración de Maitake conlleva también un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  en las células CD4+ y en las APC [70, 73]. Por otro lado, con la administración de la Fracción D de Maitake disminuyen la expresión de IL-4 y la liberación de IL-1 $\beta$  por los macrófagos, lo cual indica que la Fracción D inhibe la estimulación de las células Th-2 [69, 70].

### Rol de Maitake en la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada se diferencia de la necrosis por ser un proceso activo, organizado, disparado ante determinadas señales químicas o biológicas. Como resultado, mueren sólo las

células programadas para morir, sin dañar a las células adyacentes. En cambio, en la necrosis, proceso pasivo y desorganizado, las células vecinas e incluso las lejanas sufren inflamación debido a la liberación de material citotóxico de las células que mueren. La necrosis está mediada por factores extracelulares como drogas y otros agentes, como quemaduras, golpes, radiación o microbios [74].

Se ha visto que la Fracción D de Maitake induce apoptosis en células de cánceres de próstata [52], gástrico [53], renal [54] y de mama [55]. Al tratar células de cáncer de mama con la Fracción D, disminuyó la viabilidad celular y se incrementó la apoptosis en forma dosis-dependiente; se observó asimismo un aumento en la expresión de BAK-1 y citocromo c, ambas proteínas involucradas en la vía apoptótica [55]. Sin embargo, se ha sugerido que los efectos apoptóticos de los extractos que contienen  $\beta$ -glucanos podrían deberse a compuestos presentes en forma minoritaria [39], como por ejemplo epóxido de ergosterol [56].

### Efecto de Maitake en la angiogénesis

La angiogénesis, es decir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, es un proceso complejo que involucra la proliferación y migración de células endoteliales, degradación de la matriz extracelular, síntesis de una nueva membrana basal y la formación de un vaso [75]. En la angiogénesis fisiológica, el proceso está finamente regulado por estimuladores e inhibidores. Ocurre escasamente en los adultos, con excepción del ciclo menstrual femenino [76]. La angiogénesis patológica, como la que ocurre en el desarrollo tumoral, es un proceso anómalo y no regulado. Juega un rol crítico en el desarrollo, crecimiento y potencial metastásico del cáncer [77]. Los vasos del tumor, formados en este proceso descontrolado, son anormales en estructura y función. Esto impide la llegada normal de oxígeno y se genera un medio hipóxico. Como resultado, se entra en un círculo vicioso pues se induce más angiogénesis que tampoco es productiva; el ambiente desfavorable probablemente lleva a las células del tumor a escapar y diseminarse [78].

Uno de los más potentes factores estimuladores de la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF se ve aumentado en los tejidos tumorales, donde induce que las células endoteliales experimenten varias respuestas angiogénicas. Los efectos de VEGF en las células endoteliales están mediados por el receptor de VEGF (VEGFR), en una vía que incluye la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), una molécula de señalización que actúa luego de la activación del VEGFR. El VEGF también activa a la NADPH oxidasa presente en las células endoteliales y resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), algunas involucradas en la vía de transducción de señal de VEGFR [79].

Existen evidencias de que un extracto acuoso de Maitake inhibe la angiogénesis inducida por VEGF *in vitro* e *in vivo* [79]. Se ha propuesto que el mecanismo por el que ejerce dicha inhibición incluye la supresión de la producción de ROS y la fosforilación de las ERKs inducidas por VEGF en forma dosis-dependiente. Por otro lado, se ha sugerido que el extracto podría contener algunos constituyentes antioxidantes, tales como polifenoles [79].

### Actividad anti-metastásica de Maitake

La inhibición de la metástasis es un punto clave para retrasar la progresión del cáncer y prolongar la sobrevivencia del paciente. Estudios en ratones han demostrado la capacidad de la Fracción D de Maitake de prevenir el desarrollo de la metástasis [80] y de activar al sistema inmune, lo que podría ayudar a eliminar las células tumorales presentes en la circulación sanguínea o linfática. Se ha reportado que la inhibición de la metástasis por Maitake correlaciona con un aumento de la producción de IL-12 por las APCs, la activación de las células NK y la inhibición de la expresión en las células endoteliales vasculares de ICAM-1, molécula que permite la adhesión de las células tumorales [66].

### Maitake y quimioterapia

Las drogas quimioterapéuticas, por su efecto en las células en división, ejercen un daño dosis-dependiente a la médula ósea suprimiendo la hematopoyesis. Esto lleva al desarrollo de anemia, linfopenia,

trombocitopenia y granulocitopenia, lo cual eleva el riesgo de sufrir infecciones serias [81]. Contrarrestar o evitar estos efectos establecería un gran avance en la lucha contra el cáncer, pues mejoraría la calidad de vida e incrementaría la sobrevida de los pacientes.

Pacientes de cáncer que recibieron Maitake combinado con quimioterapia mostraron mejoras de diversos efectos adversos de la quimioterapia como en la pérdida del cabello, náuseas, vómitos, pérdida de peso y leucopenia. También se vio reducido el dolor [50]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los resultados clínicos son muy escasos y controversiales [39].

Estudios en ratones obtuvieron una mayor inhibición del crecimiento tumoral combinando Maitake y mitomicina-c, agente quimioterapéutico, que utilizando únicamente mitomicina-c [82]. Sugirieron además que la Fracción D de Maitake disminuía la dosis efectiva de mitomicina-c.

En otro estudio, la administración de la Fracción MD de Maitake a ratones normales conllevó a un aumento de la actividad de células madre hematopoyéticas de médula ósea. Promovió asimismo la recuperación de la hematopoyesis de la médula ósea luego del tratamiento con Doxorubicina, uno de los principales agentes quimioterapéuticos. In vitro, la Fracción MD de Maitake disminuyó el descenso de viabilidad celular de células de médula ósea debido a la Doxorubicina [81].

Otro trabajo demostró que la fracción MD de Maitake mejora el efecto terapéutico y reduce la mielosupresión y nefrotoxicidad del cisplatino [83]. Aumentó las actividades antitumoral y antimetastásica del cisplatino en ratones y disminuyó la pérdida de peso corporal y la reducción de células inmunocompetentes como macrófagos, células dendríticas y NK por el cisplatino.

Sin embargo, la falta de pureza de los preparados de hongos y plantas y la escasez de ensayos clínicos confiables ha sido discutida recientemente [39]. Por lo tanto, debe tenerse muy presente que todos los trabajos mencionados deberán ser cuidadosamente verificados con los compuestos activos purificados y en ensayos clínicos con muy buena base científica, algo que por el momento no se ha hecho [39].

### **Extractos de Maitake y expresión de genes relacionados con el fenotipo maligno**

En un trabajo reciente [84] se ha reportado que la Fracción D de Maitake modula significativamente la expresión de genes específicos en células MCF-7. Entre los más destacados, estimula la expresión génica de SPARC, PTEN, IGFBP5 y CUL3, mientras que reduce la de ABCG2 (Figura 5).

SPARC (proteína secretada ácida y rica en cisteínas u osteonectina) es una glicoproteína extracelular que une  $Ca^{2+}$  y participa en la regulación de la morfogénesis y diferenciación celular mediante la modulación de interacciones entre la célula y la matriz extracelular [85, 86]. Sin embargo, su mecanismo molecular exacto no está claro [85, 87, 88]. Se ha relacionado su baja expresión con la resistencia a la quimioterapia en cáncer colorrectal [89]. Se ha reportado también una baja expresión de SPARC en cáncer de ovario avanzado [88]. Además, estudios con animales SPARC  $-/-$  demostraron que la pérdida de SPARC favorece el crecimiento de tumores pancreáticos y pulmonares [85, 86]. Se ha visto también que SPARC potencia la apoptosis en presencia de quimioterapia en cáncer colorrectal por aumento de la cascada de señalización dependiente de caspasa 8 [90]. Además, induce apoptosis en células de cáncer de ovario pero no en células normales [88], causa arresto del ciclo celular en fase G1 en células endoteliales [87, 91] y un retraso en la progresión G1/S en células de cáncer colorrectal [89]. La inducción de sobre-expresión de SPARC por la Fracción D de Maitake sugiere que podría incrementar la sensibilidad de células de cáncer de mama a la quimioterapia [92].

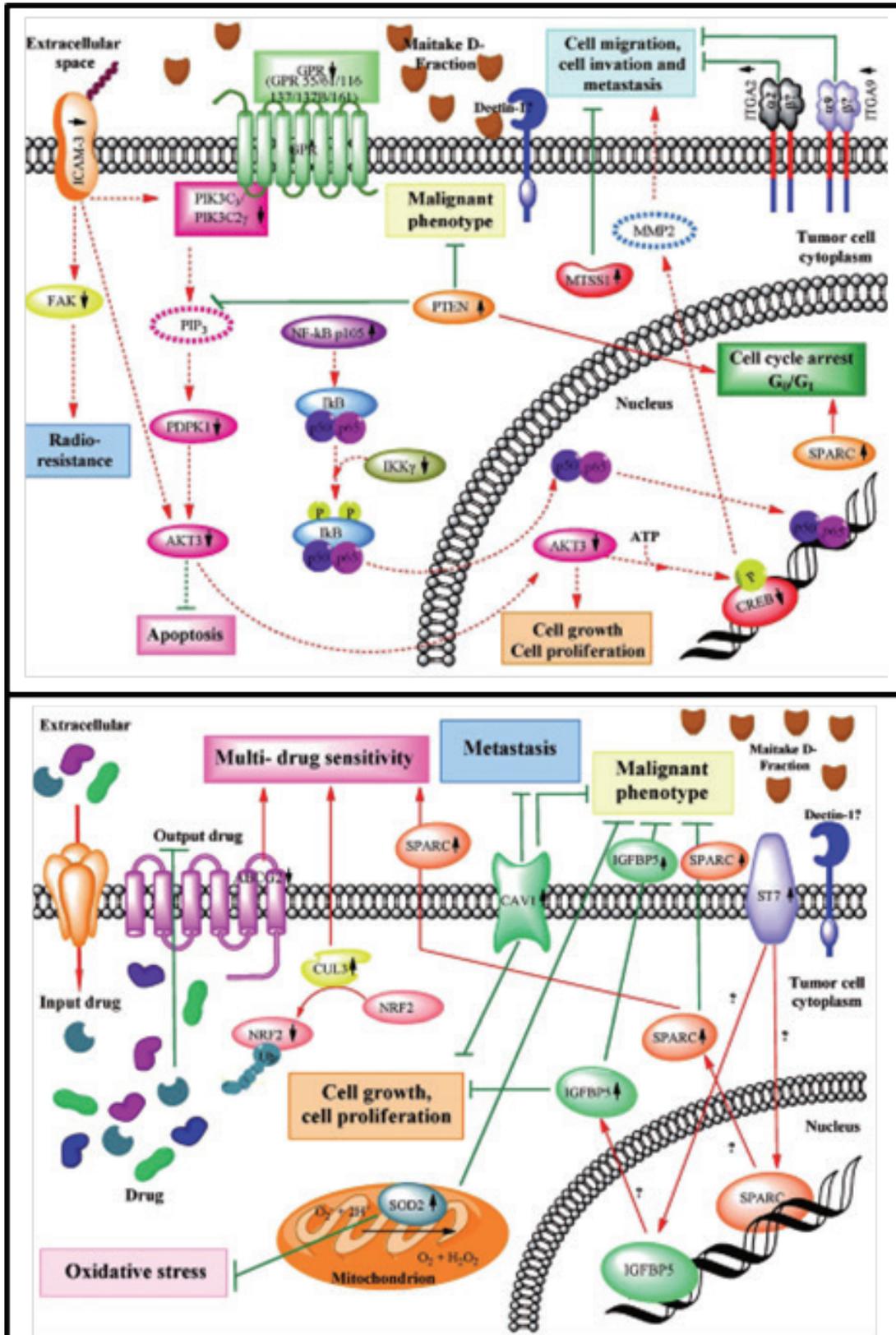
PTEN es un gen supresor de tumores que regula negativamente la vía oncogénica de fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt y se encuentra mutado en múltiples tipos de cáncer [206, 207]. Se ha observado que la expresión reducida de PTEN resulta en la activación de la vía PI3K/Akt, asociada a un fenotipo de cáncer de mama agresivo, con metástasis y con pobre pronóstico [93, 94]. Además, se ha demostrado que su expresión induce una marcada disminución de la proliferación celular debido al arresto del ciclo celular en fase G1, lo cual es atribuido al incremento de p27/Kip1 y la localización nuclear de la ciclina

D1 [93]. La modulación positiva de la expresión génica de PTEN por el tratamiento con la Fracción D de Maitake sugiere que podría inducir el arresto del ciclo celular por activación de p27/Kip1 y quizás reducir el fenotipo agresivo del cáncer de mama (Figura 5) [92].

IGFBP5 pertenece a la familia de las “insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins” (IGFBPs), proteínas solubles cuya función principal es regular la disponibilidad de IGF en los fluidos del cuerpo y en los tejidos, y modular la unión de IGF a sus receptores. Juegan un papel clave en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis en diferentes sistemas de órganos. Se ha demostrado que IGFBP5 previene el crecimiento de células de cáncer de mama humano *in vitro* e *in vivo*, causando un arresto del ciclo celular en fase G2/M e inducción de apoptosis asociada al aumento de la expresión a nivel de ARNm del factor pro-apoptótico BAX y disminución de la expresión del anti-apoptótico BCL-2 [95]. El incremento de la expresión de IGFBP5 debido al tratamiento con Fracción D de Maitake sugiere que podría estar implicada en la inhibición del crecimiento de células tumorales [92].

CUL3 (Cullin3) está implicada en la ubiquitinación y consecuente degradación de proteínas blanco por el proteosoma. Está involucrada en el cambio de la ciclina E, frecuentemente sobre-expresada en tejidos tumorales. Se ha demostrado que la simultánea pérdida de CUL3 y p53 en progenitores hepáticos convierte a las células en células iniciadoras de tumores altamente malignos, que forman tumores largamente indiferenciados en ratones nude. Más aún, la pérdida de CUL3 y p53 llevó a la formación de carcinomas hepatocelulares primarios. Además, la pérdida de expresión de CUL3 fue detectada en una larga serie de cánceres humanos de hígado y correlacionada directamente con la des-diferenciación tumoral [96]. La sobre-expresión de CUL3 por la Fracción D de Maitake sugiere que podría actuar como potencial target para el tratamiento y quimioprevención del cáncer de mama (Figura 5) [92].

ABCG2 (ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein) está implicada en la resistencia a múltiples drogas de los tumores ya que exporta hacia el exterior de la célula diversas drogas citostáticas, utilizando la energía de hidrólisis del ATP [97, 98]. La reducción de la expresión de ABCG2 por la Fracción D de Maitake sugiere que el componente activo de esta fracción podría ser de utilidad cuando existe resistencia a múltiples drogas en cáncer de mama [92].



**Figura 5:** Vías moleculares inducidas por la Fracción D de Maitake en células tumorales de mama MCF-7. Las líneas llenas rojas indican estimulación, las líneas llenas verdes representan inhibición y las líneas punteadas representan vías moleculares que no fueron moduladas por Maitake o que no ocurren bajo el tratamiento con la Fracción D. Figura tomada de Alonso, E.N., Orozco, M, Nieto, A.E. and Balogh, G.A., *Genes related to suppression of malignant phenotype induced by maitake d-fraction in breast cancer cells.* J.Med.Food, 2013. 16: p. 101-107.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

La hipótesis de trabajo de este proyecto es que la fracción D de Maitake, rica en  $\beta$ -glucanos, puede tener efectos inhibitorios en el inicio o en el desarrollo tumoral y es capaz de reducir la multiplicidad e incidencia del tumor mamario a través de la activación de genes relacionados con el bloqueo del fenotipo tumoral.

### Objetivos específicos

*Objetivo 1:* Mediante la utilización de células tumorales mamarias murinas LM3 en cultivo, demostrar el efecto de concentraciones crecientes de Maitake Pro4X sobre la muerte celular, comparado con el efecto del tratamiento quimioterápico conjunto de Ciclofosfamida y Doxorubicina a las 24, 48 y 72 horas.

*Objetivo 2:* Evaluar los efectos de dos extractos de Fracción D del Maitake (producidos a partir del hongo *Grifola frondosa* bajo procedimientos estándares por la compañía Mushroom Wisdom, Inc) en la prevención del cáncer de mama, comparando tumorigenicidad, mortalidad y presencia o ausencia de metástasis en hígado y pulmón en ratones BALB/c.

*Objetivo 3:* Comparar los efectos de la Fracción D del Maitake con los de quimioterapia (Doxorubicina + Ciclofosfamida) en el tratamiento de ratones BALB/c con cáncer de mama y determinar si existe un efecto co-adyuvante entre Maitake y quimioterapia.

*Objetivo 4:* Evaluar los efectos de la Fracción D Maitake en la expresión de los genes ABCG2 ("ATP-Binding Cassette, Sub-Family G, Member 2"), CUL3 ("cullin 3"), IGFBP5 ("Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5"), PTEN ("phosphatase and tensin homolog") y SPARC ("secreted protein, acidic, cysteine-rich"), que han sido relacionados con el proceso de carcinogénesis y con la malignidad de los tumores de mama.

## METODOLOGÍA EMPLEADA

### Materiales

#### Fracción D de Maitake

Grifon Maitake D Fraction (Maitake Products) (Maitake Standard) y Maitake D Fraction Pro4X (Mushroom Wisdom Inc.) (Maitake Pro4X) son dos extractos de Fracción D de Maitake producidos a partir del hongo *Grifola frondosa* bajo procedimientos estándares realizados por la compañía Mushroom Wisdom, Inc de New Jersey, USA (Mushroom Wisdom, Inc de New Jersey, USA).

El Maitake Pro4X presenta una concentración de beta-glucanos 4 veces mayor que el Maitake Standard. El Maitake Pro4X posee 100 mg/ml de Fracción D; el Maitake Standard, 25 mg/ml, ambos con un 30% de proteoglucano activo. Cabe aclarar que aún no se conoce la composición química exacta de estos productos,

#### Cultivos Celulares

Se utilizó la línea celular tumorigénica LM3 derivada de adenocarcinoma mamario metastásico de ratones BALB/c [99]. Estas células murinas carecen de expresión de receptores de progesterona (PR) y de estradiol (ER) [99]. Las células LM3 fueron proporcionadas gentilmente por la Dra. Elisa Bal del Hospital Roffo de Buenos Aires. Fueron mantenidas con medio Minimum Essential Media (MEM) (GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad.

## Animales

Los ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad (n=34) fueron endocriados en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Católica Argentina. Fueron mantenidos en cajas especiales con atmosfera controlada y aire filtrado HEPA, a una temperatura de 22 °C y con ciclos de 12 horas luz – 12 horas oscuridad, alimentados con una dieta especial para ratones y con disposición de agua *ad libitum*.

## Efecto de Maitake o del tratamiento quimioterápico sobre la muerte celular en células tumorales de mama

### Tratamientos

Las células LM3 (Figura 6) fueron sembradas en placas de doce pocillos, con aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad.



**Figura 6:** Células tumorales murinas LM3 en cultivo.

Los tratamientos se realizaron por duplicado, tres días de sembrar las células. Los efectos de los productos estudiados sobre la viabilidad celular se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Las concentraciones de drogas y los tiempos ensayados se indican a continuación:

Placa 1: Maitake 24 hs.

1. Control: 0 µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
2. 36 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
3. 91 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
4. 183 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro X.
5. 367 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro X.
6. 734 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro X.

Placa 2: Maitake 48 hs.

1. Control: 0 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
2. 36 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
3. 91 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
4. 183 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
5. 367 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
6. 734 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.

Placa 3: Maitake 72 hs.

1. Control: 0 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
2. 36 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
3. 91 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
4. 183 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
5. 367 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.
6. 734 µg/ml µg/ml β-glucanos de Maitake Pro4X.

Placa 4: Quimioterapia 24 hs.

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

Placa 5: Quimioterapia 48 hs.

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

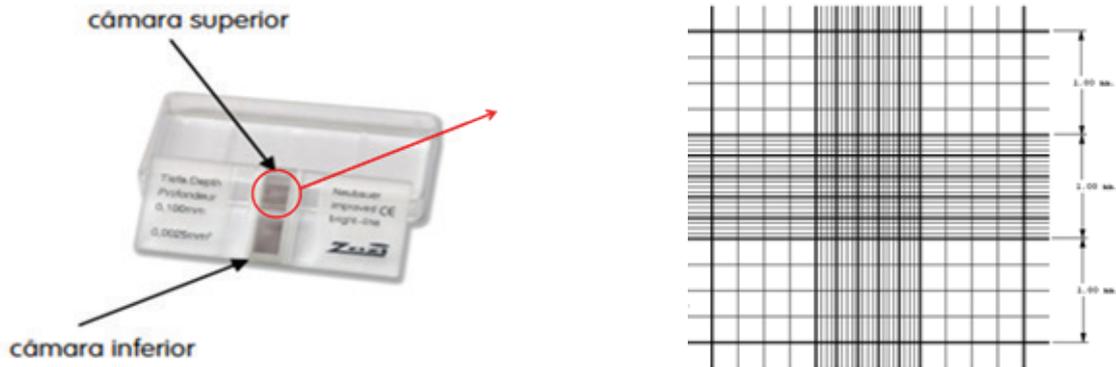
Placa 6: Quimioterapia 72 hs.

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

### Determinación de la muerte celular

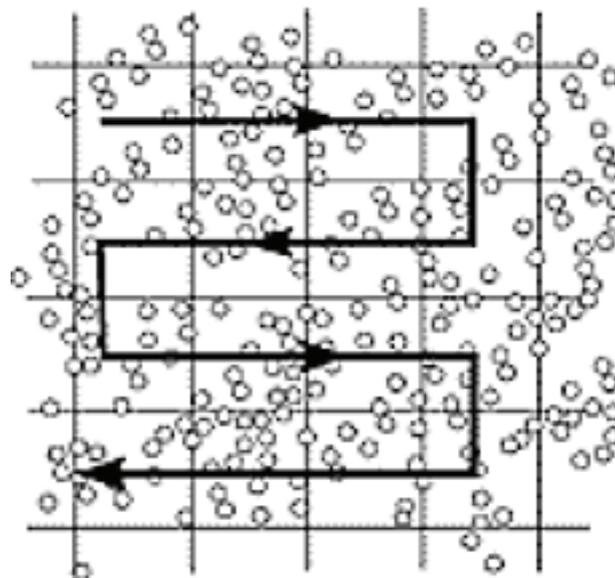
La muerte celular se determinó a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento según el método descrito en la literatura [100]. En flujo laminar (Class 2 A/B3 Biological Safety Cabinet. Forma Scientific), se levantó el medio de cada pocillo con micropipeta y se colocó en tubos Falcon previamente rotulados. Se levantaron las células de cada pocillo empleando 85 µl de tripsina 0,25% + EDTA 0,02% durante 10 minutos y luego se agregó 1 ml de medio MEM + 10% de SFB para neutralizar la tripsina. Se transfirió la suspensión celular de cada pocillo al tubo Falcon correspondiente. Se centrifugó a 1,200 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de cada tubo en 1 ml de medio MEM + 10% de SFB. Luego de homogeneizar, se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se agregaron

10  $\mu$ l de Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich) [101]. Se colocaron 10  $\mu$ l de la mezcla en una cámara de Neubauer. Se trata de una placa de cristal, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. Presenta dos zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara (Figura 7).



**Figura 7:** Fotografía de una cámara de Neubauer (izquierda) y esquema de una zona de conteo (derecha). Figuras tomadas del sitio web <http://www.celeromics.com/es/>. Utilizado con autorización del titular de los derechos.

Luego de colocar un cubreobjetos sobre la cámara, se sembraron con micropipeta cada una de las dos zonas de conteo con la suspensión celular, cuidando de que no se generaran burbujas. Observando al microscopio, se contaron las células teñidas de azul (muertas) e incoloras (vivas) por cada uno de los cuatro cuadros de cada zona de recuento, recorriéndola en zig-zag como se indica en la siguiente figura:



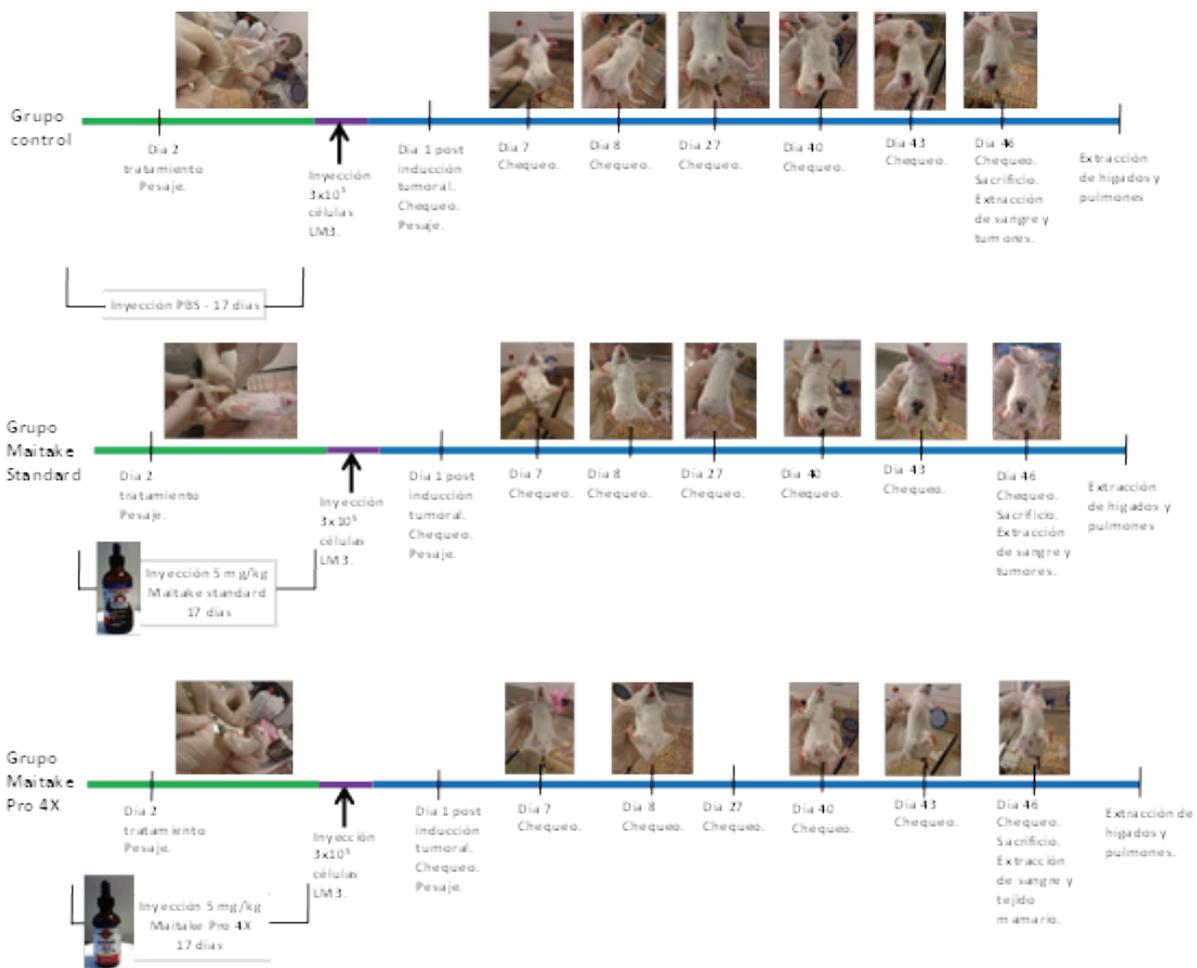
Se calculó el porcentaje de muerte celular para cada uno de los tratamientos.

## Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones.

### Diseño experimental

La población de estudio, compuesta por 20 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad, fue dividida en 3 grupos: un grupo control integrado por 5 ratones y dos grupos tratamiento de 7 ratones cada uno. A los tratamientos, denominados "grupo 1" y "grupo 2", se les administró diariamente por vía intraperitoneal una dosis de 5 mg/kg peso de Grifon Maitake D Fraction (Maitake Standard) o de Maitake D

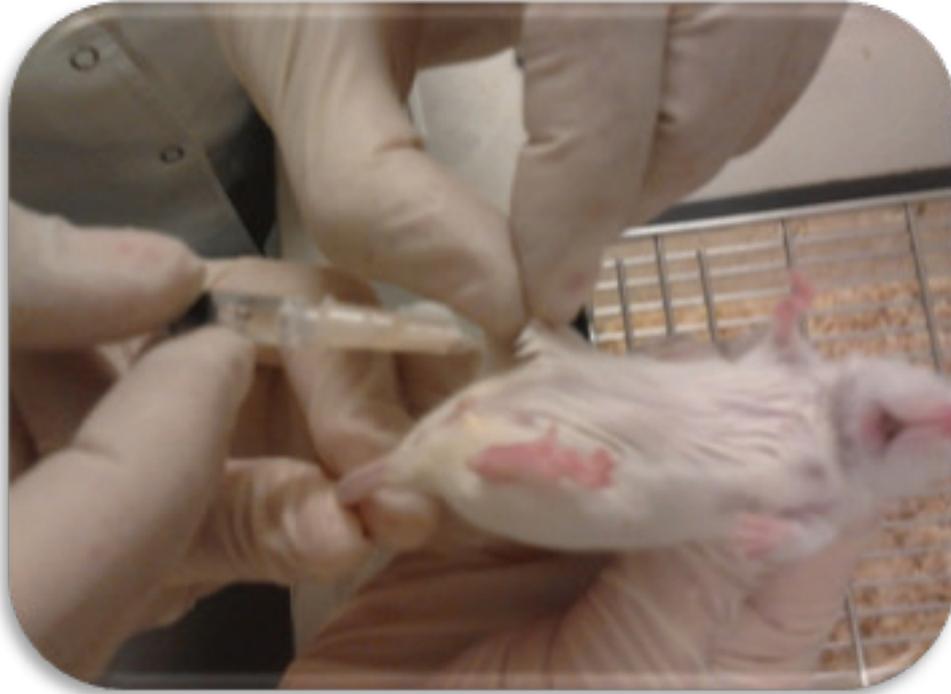
Fraction Pro4X (Maitake Pro4X) respectivamente, durante 17 días consecutivos. Los animales del grupo control recibieron PBS por inyección intraperitoneal. Una vez finalizado el tratamiento, se indujo el proceso tumorigénico en los ratones de los tres grupos inyectando intraperitonealmente aproximadamente  $3 \times 10^5$  células tumorales murinas LM3. Durante los siguientes 46 días, se realizaron controles periódicos. Finalmente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. De cada uno de los ratones se aisló el tejido mamario sano y afectado, así como el hígado y el pulmón para observar posibles metástasis. La mitad del tejido mamario se conservó en formol 10% para evaluaciones histológicas y la otra mitad en nitrógeno líquido para futuros análisis de expresión génica. Hígados y pulmones se conservaron en formol al 10% (Cicarelli). En la Figura 8 se ilustra un esquema del tratamiento realizado en este experimento.



**Figura 8:** Esquema que ilustra el estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones.

### Tratamiento de ratones con Maitake

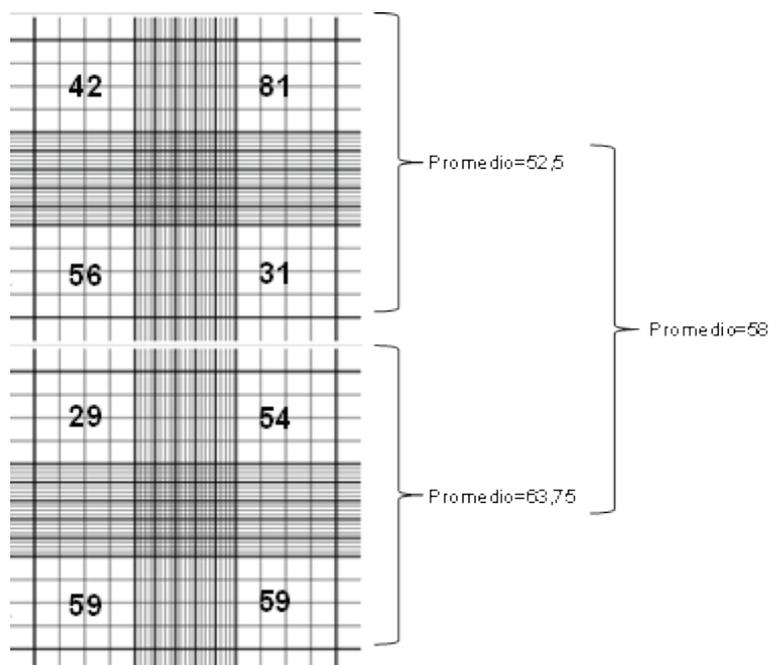
La inyección intraperitoneal de Maitake en los ratones tratados, de PBS en los ratones control (Figura 9) y de células LM3 se llevó a cabo con jeringas de 1 ml y agujas 30G. Con una mano se tomó al ratón por la cola para sacarlo de la jaula y se lo colocó sobre la rejilla permitiéndole agarrarse a ella con las patas delanteras. Con la mano libre se levantó al animal tomándolo por la piel detrás del cuello con los dedos índice y pulgar. Se volteó el ratón para exponer la zona abdominal y se limpió con algodón embebido en etanol. Se insertó la aguja con el bisel mirando hacia arriba del lado derecho del animal para evitar el bazo. Se inyectó la muestra y al retirar la aguja se presionó ligeramente la zona de inyección con algodón embebido en etanol. Se devolvió el animal a la jaula.



**Figura 9:** Inyección intraperitoneal de PBS.

### Cuantificación de células LM3 para inducir tumor mamario en ratones

La cuantificación de células se llevó a cabo en Cámara de Neubauer como se describió anteriormente [100]. En flujo laminar previamente descontaminado con luz UV durante 15 minutos y con etanol 70%, se aspiró el medio MEM de las placas con pipeta Pasteur conectada a vacío. Se añadieron 1,5 ml de tripsina por placa para despegar las células. Se agregaron 10 ml de medio MEM con 10% suero fetal bovino (SFB) para inactivar la tripsina y resuspender las células. Se centrifugaron 10 minutos a 1,200 x g a 5°C. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con pipeta Pasteur conectada a vacío y el pellet de células se resuspendió en 10 ml de medio. Se llevó a cabo un recuento celular en cámara de Neubauer [100]. Se calculó el promedio del número de células entre los recuadros de cada una de las dos zonas de recuento de la cámara y el promedio entre dichas zonas:



Para determinar la concentración celular, se aplicó la fórmula

$$\text{Concentración (cél./mL)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células}}{\text{Volumen (mL)}}$$

donde el número de células corresponde al promedio para un cuadro (en este caso 58 células) y el volumen es el de un cuadro (= 0,1 cm (lado) x 0,1 cm (lado) x 0,01 cm (profundidad) = 0,0001 cm<sup>3</sup> = 0,0001 ml).

En nuestro caso:

$$\text{Concentración} = \frac{58 \text{ células}}{0,0001 \text{ mL}} = 5,8 \times 10^5 \text{ células/mL} \sim 6 \times 10^6 \text{ células/10mL}$$

La suspensión celular se centrifugó 5 minutos a 1,200 x g y luego se aspiró el sobrenadante. Se resuspendió el pellet de células en 2 ml de medio. Se alicuotaron 100 µl por microtubo (conteniendo 3x10<sup>5</sup> células) para inyectar a cada ratón.

### Observación de tumorigénesis mamaria

Durante los 46 días posteriores a la inducción del proceso tumorigénico, se llevaron a cabo controles en forma periódica mediante palpación en la zona abdominal y examinación visual.

### Sacrificio de los animales

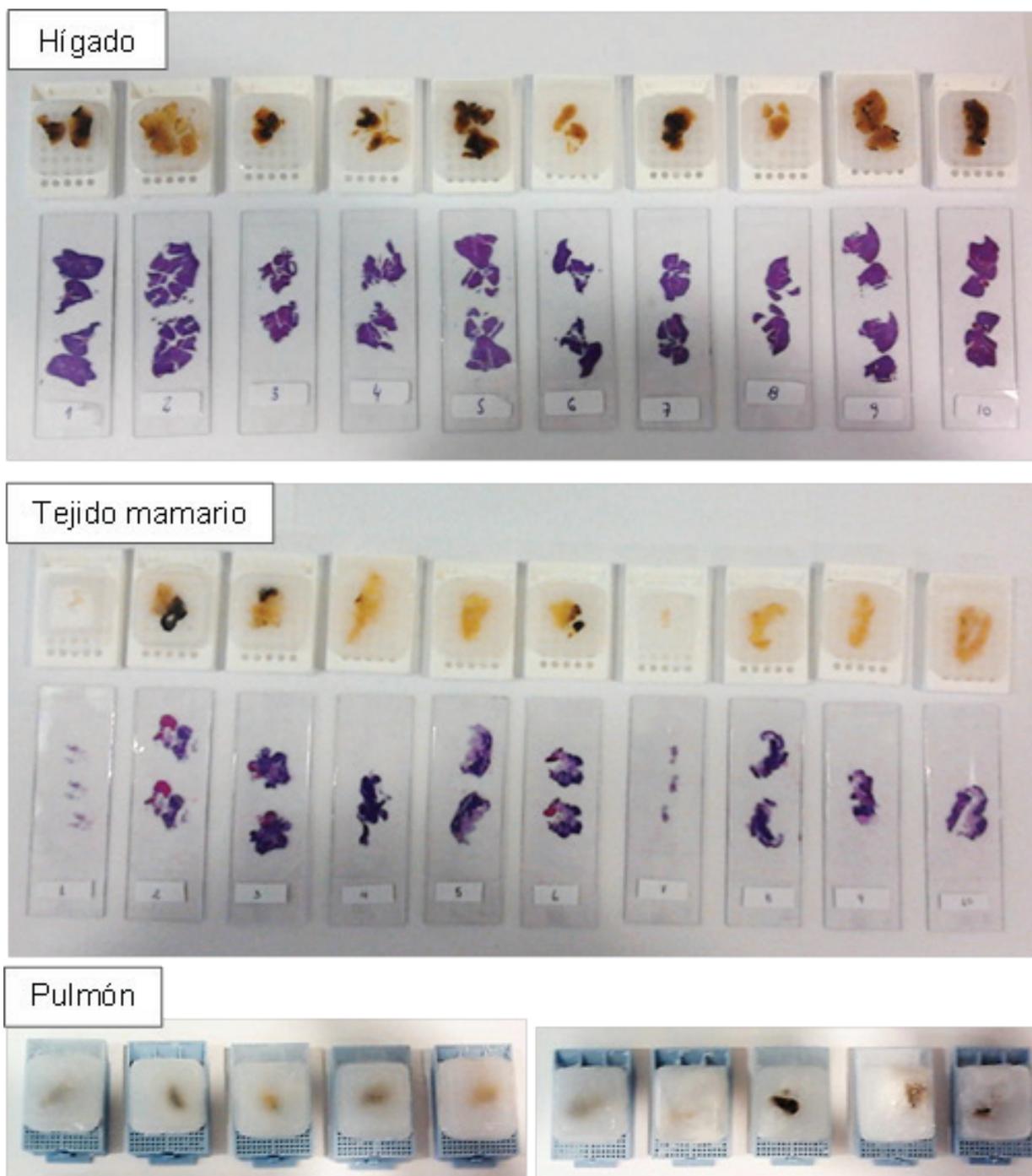
Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, siguiendo las normas internacionales de manejo de animales [102].

### Confección de tacos de parafina

Se procesaron los pulmones que estaban conservados en formol 10% (fijación) para obtener tacos de parafina, se procedió siguiendo el método descrito previamente [103]. Primero se procedió a la deshidratación del tejido mediante pasajes por una serie de graduaciones crecientes de etanol: etanol 70% durante toda la noche, etanol 95% (5% metanol) durante 1 hora y cuatro lavados con etanol absoluto (Cicarelli) durante 1 hora, 1,5 horas, 1,5 horas y durante toda la noche. Luego, para su aclaramiento se realizaron dos lavados con xileno (Cicarelli) de 1 hora cada uno. Para infiltrar con parafina se realizaron dos pasajes por parafina (Paraplast X-tra) (McCormick Scientific) de 1 hora cada uno a 58 °C. Luego se colocó el tejido en un molde metálico (Stainless Steel Base Mold) (Omniceil) con parafina derretida. Se ubicó el cassette de plástico (Histocell A Biopsy 30 Deg) (Omniceil) y se agregó más parafina fundida. Se dejó enfriar y solidificar a temperatura ambiente. Finalmente se retiró el molde.

### Cortes histológicos de tejidos

Los tejidos mamaros y los hígados conservados en formol 10% fueron enviados al laboratorio de Patología de la Dra. María Marta Corte, Patóloga, de la UNS de Bahía Blanca, para el procesamiento de los tejidos y los estudios histológicos. Se realizaron cortes en "slides" de los tejidos en parafina y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina para la observación al microscopio óptico. En la Figura 10 se ilustran los tacos de parafina y los cortes de hígado, tejido mamario y pulmón teñidos con Hematoxilina y Eosina.



**Figura 10:** Tacos de parafina y cortes de hígado, tejido mamario y pulmón.

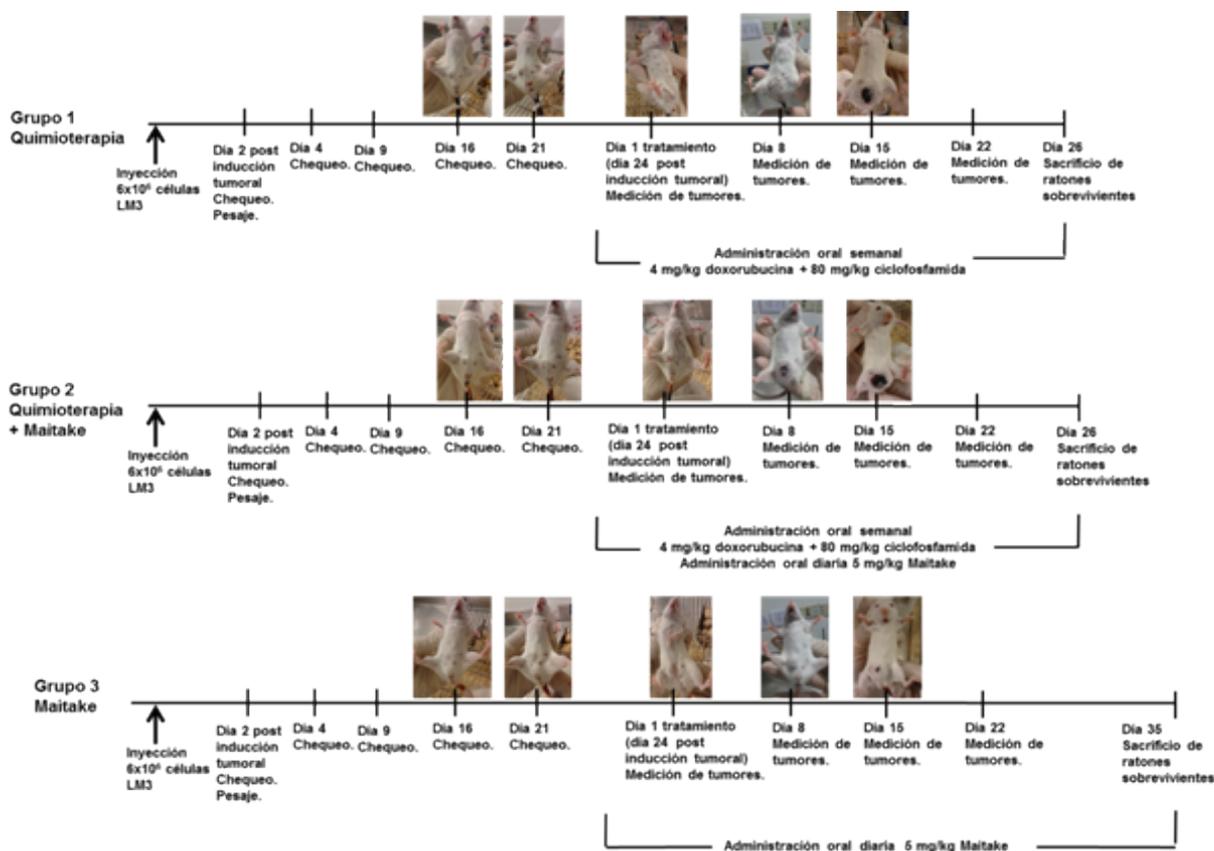
### Índice Angiogénico

Para determinar la densidad de vasos sanguíneos empleamos la metodología descrita previamente [104], para ello los cortes de mama se dividieron en campos de 1 mm<sup>2</sup>. Observándolos al microscopio, se contó el número de vasos sanguíneos por campo, recorriendo los preparados de izquierda a derecha y de arriba abajo. Luego se realizó el promedio de vasos sanguíneos/mm<sup>2</sup> para cada animal.

## Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la tumorigénesis mamaria y análisis de la coadyuvancia con quimioterapia para el tratamiento de tumores de mama en ratones.

### Diseño experimental

La población de estudio, compuesta por 15 ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad, fue dividida en 3 grupos: Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3, cada uno integrado por 5 ratones. En los tres grupos se indujo el proceso tumorigénico mediante la inyección intraperitoneal de aproximadamente  $4 \times 10^5$  células tumorales murinas LM3. Durante los siguientes 23 días se realizaron controles periódicos. A partir del día 24 y durante 35 días, los ratones del grupo 1 recibieron semanalmente 80 mg/kg peso de Ciclofosfamida + 4 mg/kg peso de Doxorubicina en forma oral. A los animales del grupo 2 se les administraron diariamente 5 mg/kg peso de Maitake Pro4X. Los animales del grupo 3 recibieron quimioterapia (Ciclofosfamida + Doxorubicina) semanalmente + 5 mg/kg peso de Maitake Pro4X diariamente. Durante el período de tratamiento se realizaron controles periódicos en los que se registró el tamaño y aspecto del tumor. En la Figura 11 se ilustra un esquema del tratamiento realizado en este experimento.



**Figura 11:** Esquema del Experimento. Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la tumorigénesis mamaria y análisis de la coadyuvancia con quimioterapia para el tratamiento de tumores de mama en ratones.

### Descongelación de las células LM3

El método que se utilizó para descongelar células fue descrito en la literatura [100]. Se retiró el criotubo de células LM3 del freezer de  $-80^{\circ}\text{C}$  y, en flujo laminar previamente descontaminado con luz UV durante 15 minutos y con etanol 70%, se pasó su contenido a un tubo Falcon de 15 ml. Se resuspendió en 10 ml de medio MEM con 10% de SFB. Se centrifugó a  $1,200 \times g$  durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante con pipeta Pasteur conectada a vacío. Se resuspendió el pellet en 10 ml de medio con suero y se transfirió a un frasco de cultivo ("flask") de  $75 \text{ cm}^2$  al que se agregaron 15 ml de medio con 10% de SFB

precalentado a 37°C. Se incubó a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad, en una estufa de cultivo Sanyo, modelo MCO 175 (Sanyo Electric, Osaka, Japan).

### **Cambio del medio de cultivo celular**

El método que se utilizó para recambio de medio celular fue descrito en la literatura [100]. Brevemente, en flujo laminar previamente descontaminado con luz UV durante 15 minutos y con etanol 70% se aspiró el medio antiguo con pipeta Pasteur conectada a vacío y se agregaron con pipeta de vidrio 15 ml de medio MEM fresco + 10% de SFB. Se colocaron nuevamente las placas de cultivo en la estufa de cultivo con atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad.

### **Congelamiento de células LM3 para conservación de alícuotas**

El método que se utilizó para congelar líneas celulares fue descrito en la literatura [100]. Se congelaron 2 criotubos por botella mediana (Flask de 75mm<sup>2</sup>) al 90% de confluencia. Para esto, en flujo laminar previamente descontaminado con luz UV durante 15 minutos y con etanol 70%, se aspiró el medio con pipeta Pasteur conectada a vacío y se añadió 1 ml de tripsina 0,25% + EDTA 0,02% con micropipeta de 200 a 1000 µl. Una vez despegadas las células, se agregaron 10 ml de medio MEM con 10% de suero fetal bovino para inactivar la tripsina y resuspender las células. Se pasaron a un tubo Falcon de 15 ml para centrifugar 5 minutos a 1,200 x g a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y se agregaron 4 ml del medio de congelación: MEM sin suero + 10% dimetil-sulfóxido (Sigma). Se resuspendieron las células y se pipetearon 2 ml (~ 2,5 x 10<sup>6</sup> células) de la suspensión en cada uno de los 2 viales de congelación y se llevaron al freezer de -80°C. Al día siguiente se trasladaron a nitrógeno líquido para su conservación.

### **Expansión de células en cultivo**

El método que se utilizó para expansión de células en cultivo fue descrito en la literatura [100]. En flujo laminar previamente descontaminado con luz UV durante 15 minutos y con etanol 70%, se aspiró el medio con pipeta Pasteur conectada a vacío y se añadió 1 ml de tripsina 0,25% + EDTA 0,02% para despegar las células, lo cual se verificó al microscopio óptico. Se agregaron 10 ml de medio con 10% SFB para inactivar la tripsina y resuspender las células. Se pasó la suspensión a un Falcon de 15 ml y se centrifugó 5 min a 1,200 x g. Se aspiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml de medio. Se pipetearon 2,5 ml de la suspensión en cada una de las 4 botellas conteniendo 15 ml de medio precalentado en baño a 37°C. Se incubó a 37°C bajo atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>/aire, saturada de humedad, en estufa de cultivo.

### **Preparación de las células LM3 para inyectar ratones**

En flujo laminar previamente descontaminado con luz UV durante 15 minutos y con etanol 70%, se aspiró el medio de 4 botellas de 75 cm<sup>2</sup> con células LM3 confluentes. Se despegaron las células con 1 ml de tripsina 0,25% + EDTA 0,02% por botella, se agregaron 9 ml de MEM con 10% SFB para inactivarla y se pasó el contenido de todas las botellas a un tubo Falcon de 15 ml. Se centrifugó a 1,200 x g durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1,5 ml de medio con suero. Se realizó un recuento celular en cámara de Neubauer que arrojó un resultado de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Se tomaron 92 µl de suspensión de células y se diluyeron en 1,4 ml de medio (4 x 10<sup>5</sup> células/100 µl). Se alicuotaron 100 µl por eppendorf (16 eppendorf en total) para su posterior inyección a cada uno de los ratones.

### **Inducción del proceso tumorigénico**

El método que se utilizó para inducir tumorigénesis en ratones BALBc fue descrito previamente en la literatura [105]. Se efectuó la inyección intraperitoneal de 4x10<sup>5</sup> células tumorales murinas LM3 por ratón, utilizando el mismo procedimiento que en el experimento de prevención. Las células fueron preparadas como se indicó arriba, en alícuotas de 100 µl.

### Administración oral de Maitake y quimioterapia

#### 1. Grupo 1: Quimioterapia.

Los animales de este grupo recibieron semanalmente 4 mg/kg de peso de Doxorrubicina + 80 mg/kg Ciclofosfamida, preparados en una dilución en agua de 100  $\mu$ l totales.

#### 2. Grupo 2: Quimioterapia + Maitake.

Los animales de este grupo recibieron semanalmente 4 mg/kg de peso de Doxorrubicina + 80 mg/kg Ciclofosfamida. Diariamente se les administraron 5 mg/kg de peso de Fracción D de Maitake.

#### 3. Grupo 3: Fracción D de Maitake.

Los animales de este grupo recibieron diariamente 5 mg/kg de peso de Fracción D de Maitake.

Tanto la quimioterapia como la Fracción D de Maitake se administraron en forma oral (Figura 12). Con una mano se tomó al ratón por la cola para sacarlo de la jaula y se lo colocó sobre la rejilla permitiéndole agarrarse a ella con las patas delanteras. Con la mano libre se levantó al animal tomándolo por la piel detrás del cuello con los dedos índice y pulgar y se volteó el ratón. Con micropipeta de 200  $\mu$ l se colocó cuidadosamente la punta en la boca del ratón y se descargaron 100  $\mu$ l de solución, lentamente para que el ratón tuviese tiempo de tragar todo el contenido.



**Figura 12:** Administración oral de quimioterapia.

### Chequeos y controles periódicos de los efectos terapéuticos sobre la tumorigénesis mamaria.

Semanalmente se realizaron observaciones del aspecto macroscópico de los tumores y mediciones de las dimensiones tumorales empleando un calibre para determinar el crecimiento tumoral en dos ejes perpendiculares, en mm.

### **Medición de sobrevida de los animales de cada grupo.**

Diariamente se chequearon los animales de cada grupo y se registraron los decesos.

### **Sacrificio de los animales**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, siguiendo las normas internacionales de manejo de animales [102].

## **RT-PCR de genes específicos para determinar si existe inhibición del fenotipo tumoral inducida por Maitake en tejido tumoral mamario.**

### **Aislamiento de ARN a partir de tejido mamario**

El método empleado para el aislamiento del ARN total fue descrito previamente [106]. Se aisló el ARN a partir de los tejidos tumorales mamarios de ratón conservados en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Se procedió según los siguientes pasos:

**1) Aislamiento de ARN total:** en vidrio de reloj, se seccionó la muestra de tejido y se transfirió la cantidad deseada a un mortero previamente enfriado. Se agregó nitrógeno líquido y se rompió con el pilón del mortero. Se añadieron 2 ml de TRI Reagent y con espátula se transfirió a tubo Eppendorf. Luego se hizo pasar por una jeringa de 1 ml con aguja 21 G para obtener una solución homogénea. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se centrifugó a  $12,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo por cada ml de TRI Reagent y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Luego de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugó a  $12,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Se generaron tres fases: una fase superior, acuosa e incolora (conteniendo el ARN); una interfase blanca (conteniendo el ADN); y una fase inferior, orgánica (conteniendo proteínas).

**2) Precipitación del ARN:** Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf. Luego se procedió a precipitar el ARN con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío por ml de TRI Reagent. Se mezcló por inversión y se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos una hora. Se centrifugó a  $12,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y se descartó el sobrenadante.

**3) Lavado del pellet de ARN:** Se agregó 1 ml de etanol frío (75% vol/vol en agua). Luego se centrifugó a  $12,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante.

**4) Resuspensión del pellet de ARN:** Después de secar el pellet al aire, se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  de agua DEPC. Finalmente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su próxima utilización.

### **Composición del TRI Reagent**

10 ml tiocianato de guanidinio 4M  
352  $\mu\text{l}$  citrato de sodio 0,75 M (pH 7)  
528  $\mu\text{l}$  sarcosyl 10%  
76  $\mu\text{l}$   $\beta$ -mercaptoetanol 14,3 M

A 10 ml de esta solución se agregaron  
1 ml acetato de sodio 2 M (pH 4)  
10 ml fenol saturado en agua

## Purificación del ARN aislado de tejido mamario

Para la purificación del ARN aislado a partir del tejido mamario de los ratones, se utilizó el kit "QIA-amp RNA Blood Mini Kit" de Quiagen (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron 700 µl de "Buffer TW1" y se transfirió a una columna de purificación provista en el kit. A continuación se centrifugó a 8,000 x g a temperatura ambiente durante 15 segundos. Se cambió la columna a un nuevo tubo de elución y se añadieron 500 µl de "Buffer RPE". Se centrifugó a 8,000 x g durante 15 segundos y luego se descartó el volumen del tubo. Se agregaron nuevamente 500 µl de "Buffer RPE" y se centrifugó a 20,000 x g durante 3 minutos. Se reemplazó el tubo de elución por un tubo Eppendorf de 1,5 ml y luego se agregaron 30 µl de agua libre de RNasas. Finalmente se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto y se conservó el tubo con el eluido. La concentración del ARN se determinó por espectrofotometría y su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante [107].

## Cuantificación de ARN por espectrofotometría

Para determinar la pureza y la concentración del ARN aislado se utilizó el método descrito en la literatura [107]. Brevemente, se realizó una dilución 1:100 del ARN en buffer TE (10 mM Tris + 1mM EDTA) y se midió en espectrofotómetro (Pharmacia Biotech GeneQuant RNA/DNA Calculator) la absorbancia (A) a 230, 260 y a 280 nm utilizando celdas de cuarzo [107]. Una relación  $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$  indica que la preparación final de ARN tiene una baja concentración de proteínas y es suficientemente puro. Asimismo, una relación  $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$  indica que la preparación contiene bajos niveles de sales. La concentración del ARN en solución se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que una absorbancia de A=1 equivale a 40 µg/ml de ARN. Teniendo en cuenta la dilución de la muestra (1/100) se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración ARN} = A_{260} \times 40\mu\text{g/ml} \times 100$$

## Reacción de RT-PCR

Para analizar en los tejidos tumorales mamarios la expresión de los genes *Abcg2*, *Cul3*, *Igfbp5*, *Pten* y *Sparc*, relacionados con el fenotipo maligno en células tumorales MCF/7, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR (transcriptasa reversa, reacción de polimerasa en cadena), que se realizaron como se describió previamente [107].

## Reacción de RT

La mezcla de reacción se preparó en un tubo eppendorf de 0,5 ml mantenido en hielo. Se mezcló el volumen de muestra correspondiente a 1ug de ARN con 2 µl de OligodT (0,5 mg/ml) y se llevó a 5 µl con agua DEPC (Sigma). Luego se calentó a 70°C durante 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Transcurridos 5 minutos, se agregaron 5 µl Buffer M-MLV 5X (Promega), 1,25 µl dATP (10 mM), 1,25 µl dCTP (10 mM), 1,25 µl dGTP (10 mM), 1,25 µl dTTP (10 mM) y 1 µl enzima M-MLV RT (200 unidades) (Promega). A continuación se añadieron 9 µl de agua DEPC para llevar a un volumen final de 2 µl. La reacción se efectuó en un termociclador. La transcripción reversa se llevó cabo calentando a 40°C durante 60 minutos.

## Reacción de PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó el kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 5 µl de PCR Reaction Buffer 5X, 1µl de MgSO<sub>4</sub> 25 mM, 1µl de dNTP Mix, 0,5 µl de forward primer (0,5 µM), 0,5 µl de reverse primer (0,5 µM), 0,2 µl Taq DNA Polymerase (5 u/µl), 2 µl de templado de ADNc y se llevó a un volumen final de 25 µl con agua DEPC. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), siguiendo el programa de amplificación propuesto por Benavides et al [108]. La desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 5 minutos. Luego se efectuaron 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (fase de des-

naturalización), 60 segundos a la temperatura de hibridación de cada par de primers (fase de alineación) y 30 segundos a 72°C (fase de elongación). Se siguió con una extensión final de 10 minutos a 72°C y se mantuvo a 4°C hasta el momento de retirar las muestras del termociclador.

### Primers empleados en PCR

Los primers empleados en estas reacciones de PCR fueron diseñados empleando el Programa BLAST del National Institute of Health (NIH) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las condiciones de los primers fueron: Producto de PCR mayor que 500 bp, temperatura de melting (T<sub>m</sub>) de cada primer entre 57.0°C y 65.0°C.

Primer	Secuencia 5'→3'	T <sub>m</sub> (°C)	bp (pares de bases).
β-Actina Forward primer	GGATGCAGAAGGAGATCACTG	60,0	90
β-Actina Reverse primer	CGATCCACACGGAGTACTTG		
ABCG2 Forward primer	GCTGTGGAGCTGTTCGTAGT	61,8	664
ABCG2 Reverse primer	AGTCCGTTAAAGGGGGAAATTAAGA		
CUL3 Forward primer	TCCCCAGGTCTTCAGTGTTGA	62,5	884
CUL3 Reverse primer	TTGGAAGCACAGAGGAACGG		
IGFBP5 Forward primer	CAGTATACCCATCACCCCGC	63,4	989
IGFBP5 Reverse primer	ACAGCTGACCTCCTCCGTAT		
PTEN Forward primer	GTGGTCTGCCAGCTAAAGGT	62,4	1000
PTEN Reverse primer	AAGTGCAAAGGGGTAGGACG		
SPARC Forward primer	TCTGGGTAGCACACAGCCTA	62,4	951
SPARC Reverse primer	TCTCAAAGTCTCGGGCCAAC		

### Gel de agarosa al 3% para visualización de las bandas específicas

El gel de agarosa para la visualización de las bandas de los amplificadores se realizó como se describió en la literatura [107]. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% con los productos de PCR [107]. En un Erlenmeyer se pesaron 3 g de agarosa y se disolvieron en 100 ml de buffer TAE 1X (0,04 M tris-acetato - 0,001 M EDTA) calentando en microondas. Luego se vertió en el molde previamente rodeado con cinta de papel y se ubicó el peine cercano a uno de los extremos. Se dejó gelificar. Una vez formado el gel, se retiraron cuidadosamente el peine y la cinta y se colocó en la cuba de electroforesis. Se añadió buffer TAE 1X a la cuba hasta cubrir completamente el gel. Se sembraron 8 µl de muestra + 2 µl de 5X Green GoTaq Reaction Buffer por pocillo. El gel se corrió a 120 V durante 40 minutos. Una vez finalizada la corrida, el gel se sumergió en buffer TAE + bromuro de etidio durante 15 minutos. Luego se colocó en un transiluminador UV para visualizar las bandas de ADN.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias (X), el promedio de quintuplicados o septuplicados independientes. La variabilidad se expresó como desvío estándar (D.S) intraensayo. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante pruebas T´ de Student y se consideraron significativas con  $p \leq 0,05$  [109].

## RESULTADOS

### Efecto de los extractos de Maitake y del tratamiento quimioterápico sobre la muerte celular en células tumorales de mama LM3.

Se trataron células murinas de cáncer de mama, LM3, incubadas con 10% de suero fetal bovino, con concentraciones crecientes de Fracción D de Maitake Pro4X o con quimioterapia (Ciclofosfamida + Doxorubicina a distintas dosis). Los efectos en la viabilidad celular se determinaron a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento mediante tinción con Azul de Tripán. Las concentraciones empleadas y los porcentajes de muerte celular obtenidos a las distintas horas de incubación se detallan en la Tabla I.

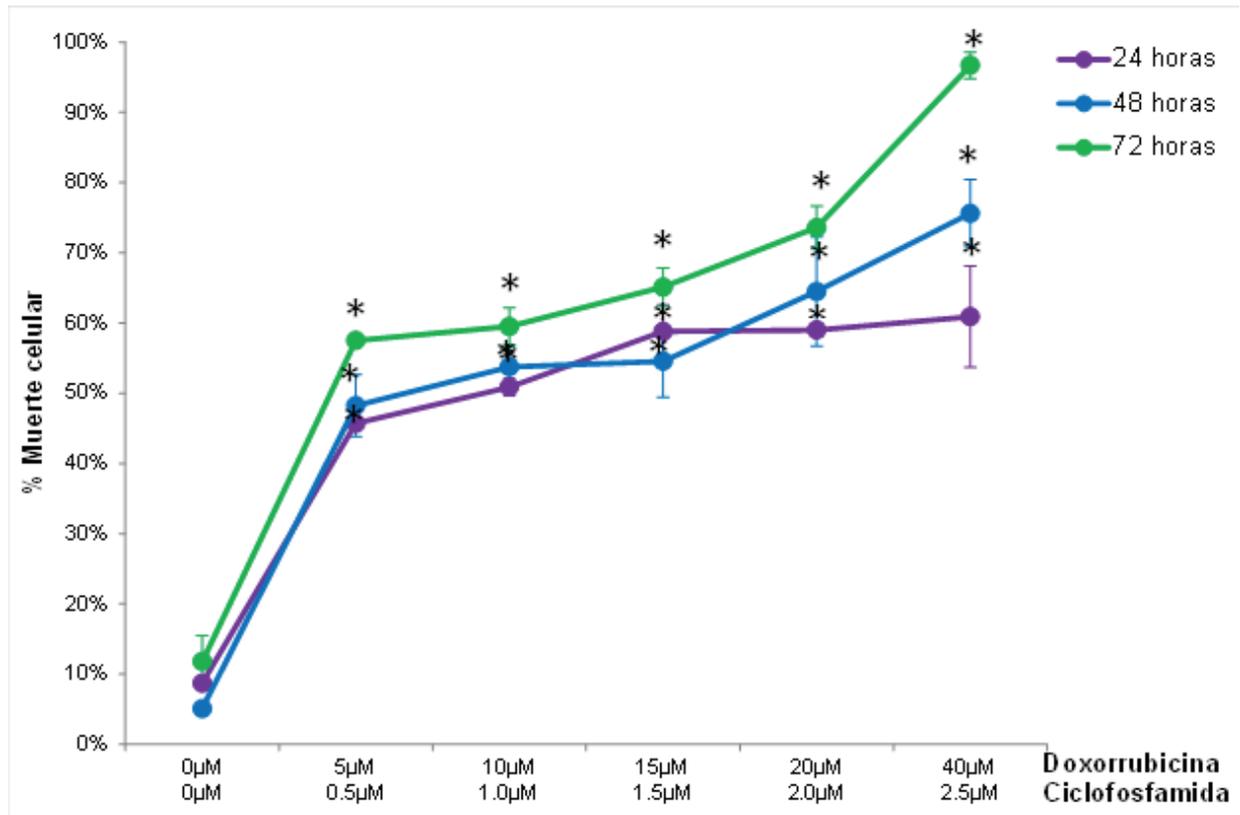
**Tabla I: Muerte celular causada por extractos de Maitake o quimioterapia en cultivos de células LM3.**

Tratamiento	% Muerte celular $\pm$ SD (n=2)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Control: 0 $\mu\text{g/ml}$ (0 $\mu\text{M}$ en $\beta$ -glucanos) Maitake Pro4X	15,04 $\pm$ 0,72	6,77 $\pm$ 5,62	14,41 $\pm$ 1,37
36 $\mu\text{g/ml}$ (0,036 $\mu\text{M}$ en $\beta$ -glucanos) Maitake Pro4X	16,29 $\pm$ 1,90	15,40 $\pm$ 0,069	37,10 $\pm$ 3,68
91 $\mu\text{g/ml}$ (0,091 $\mu\text{M}$ en $\beta$ -glucanos) Maitake Pro4X	19,87 $\pm$ 5,83	24,02 $\pm$ 0,08	42,25 $\pm$ 1,16
183 $\mu\text{g/ml}$ (0,183 $\mu\text{M}$ en $\beta$ -glucanos) Maitake Pro4X	20,90 $\pm$ 7,17	28,06 $\pm$ 9,82	45,18 $\pm$ 1,80
367 $\mu\text{g/ml}$ (0,367 $\mu\text{M}$ en $\beta$ -glucanos) Maitake Pro4X	29,18 $\pm$ 7,37	29,57 $\pm$ 6,9	45,68 $\pm$ 2,38
734 $\mu\text{g/ml}$ (0,734 $\mu\text{M}$ en $\beta$ -glucanos) Maitake Pro4X	35,85 $\pm$ 12,04	46,78 $\pm$ 2,67	61,52 $\pm$ 4,24
Control: 0 $\mu\text{M}$ Doxorubicina + 0 $\mu\text{M}$ Ciclofosfamida	8,71 $\pm$ 0,43	5,09 $\pm$ 0,29	11,78 $\pm$ 3,68
5 $\mu\text{M}$ Doxorubicina + 0,5 $\mu\text{M}$ Ciclofosfamida	45,69 $\pm$ 0,45	48,24 $\pm$ 4,41	57,50 $\pm$ 0,12
10 $\mu\text{M}$ Doxorubicina + 1,0 $\mu\text{M}$ Ciclofosfamida	50,87 $\pm$ 1,23	53,75 $\pm$ 3,02	59,51 $\pm$ 2,67
15 $\mu\text{M}$ Doxorubicina + 1,5 $\mu\text{M}$ Ciclofosfamida	58,80 $\pm$ 3,83	54,55 $\pm$ 5,10	65,12 $\pm$ 2,72
20 $\mu\text{M}$ Doxorubicina + 2,0 $\mu\text{M}$ Ciclofosfamida	58,99 $\pm$ 0,93	64,49 $\pm$ 7,76	73,59 $\pm$ 3,05
40 $\mu\text{M}$ Doxorubicina + 2,5 $\mu\text{M}$ Ciclofosfamida	60,90 $\pm$ 7,22	75,63 $\pm$ 4,82	96,70 $\pm$ 1,90

En la tabla 1 se observa que el mayor porcentaje de muerte celular (96.70%) correspondió al tratamiento por 72 horas con 40  $\mu\text{M}$  de Doxorubicina más 2,5  $\mu\text{M}$  de Ciclofosfamida.

### Efecto del tratamiento quimioterápico conjunto de Ciclofosfamida y Doxorrubicina.

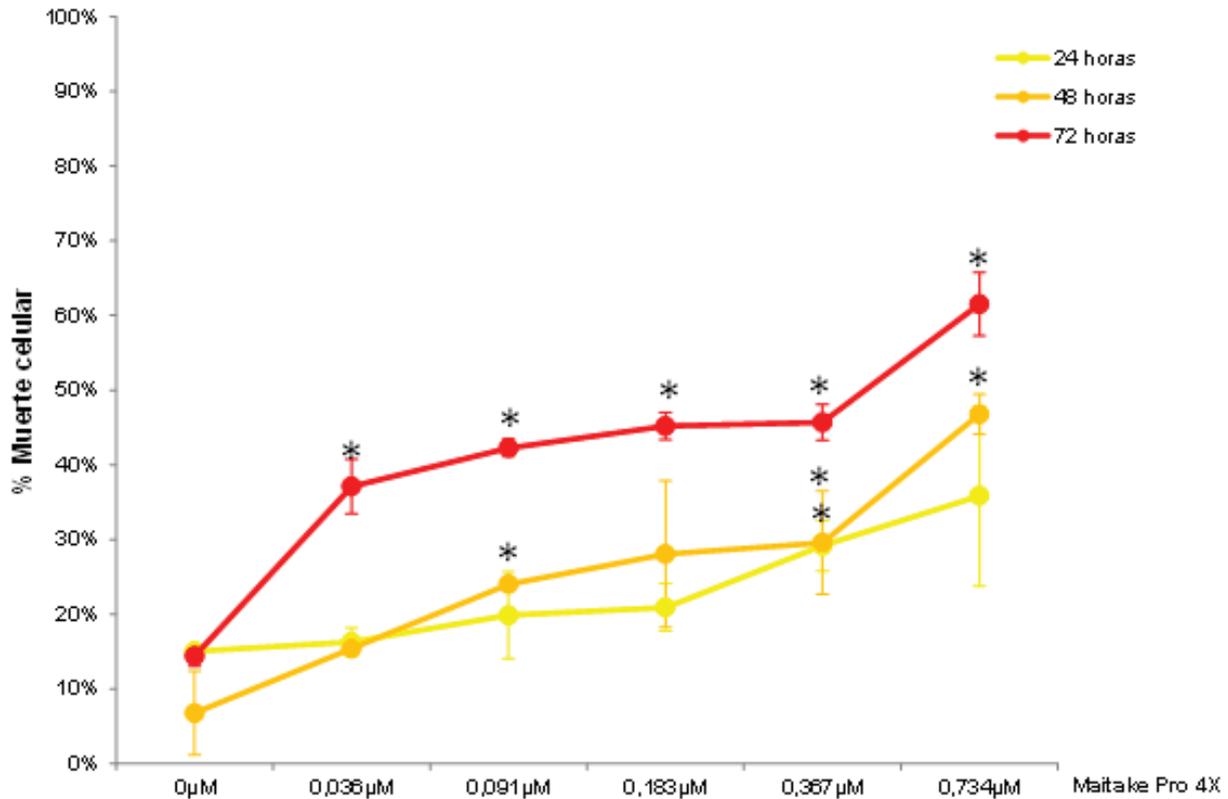
En el gráfico la Figura 13 se muestran los valores de muerte celular en función de la concentración empleada de drogas quimioterapéuticas (Doxorrubicina y Ciclofosfamida) para 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Se observa que el porcentaje de muerte celular aumentó con la concentración de las drogas quimioterapéuticas. Asimismo, la muerte celular también aumentó en función del tiempo de tratamiento. En todos los tratamientos, la muerte celular fue significativamente mayor (Student.  $p \leq 0,05$ ) con respecto a los controles. Se observa también que el mayor porcentaje de muerte celular (96,70%) correspondió a la concentración más elevada de quimioterapia empleada (40  $\mu\text{M}$  Doxorrubicina + 2,5  $\mu\text{M}$  Ciclofosfamida). El tiempo óptimo de acción citolítica fue también el mayor tiempo de tratamiento (72 horas).



**Figura 13:** Muerte celular causada por distintas concentraciones de Doxorrubicina + Ciclofosfamida a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Los valores representados corresponden a las medias  $\pm$  D.S. (n=2). \*  $p < 0,05$  vs control.

### Efecto de Maitake Pro4X sobre la muerte celular.

En la Figura 14 se muestran los valores de muerte celular en función de la concentración empleada de Fracción D de Maitake Pro4X para 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Se observa que el porcentaje de muerte celular aumentó tanto en función de la concentración de Maitake Pro4X empleada como del tiempo de tratamiento. El mayor porcentaje de muerte celular (61.52%) correspondió al tratamiento con la dosis más elevada de Maitake (734  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 72 horas, el mayor tiempo de tratamiento.

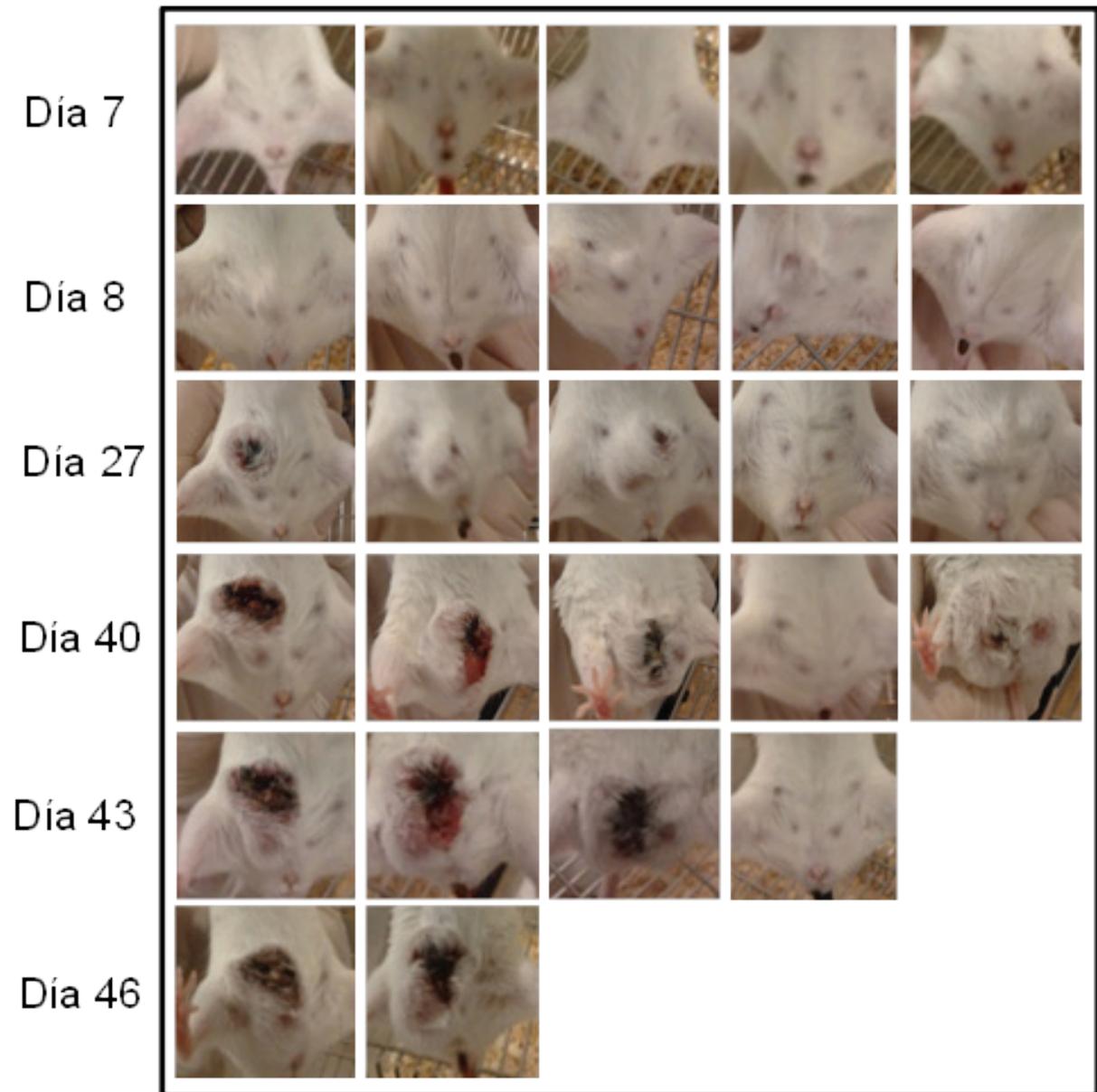


**Figura 14:** Muerte celular causada por distintas concentraciones de Maitake a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Los valores representados corresponden a las medias  $\pm$  D.S.(n=2) \* p<0,05 vs control.

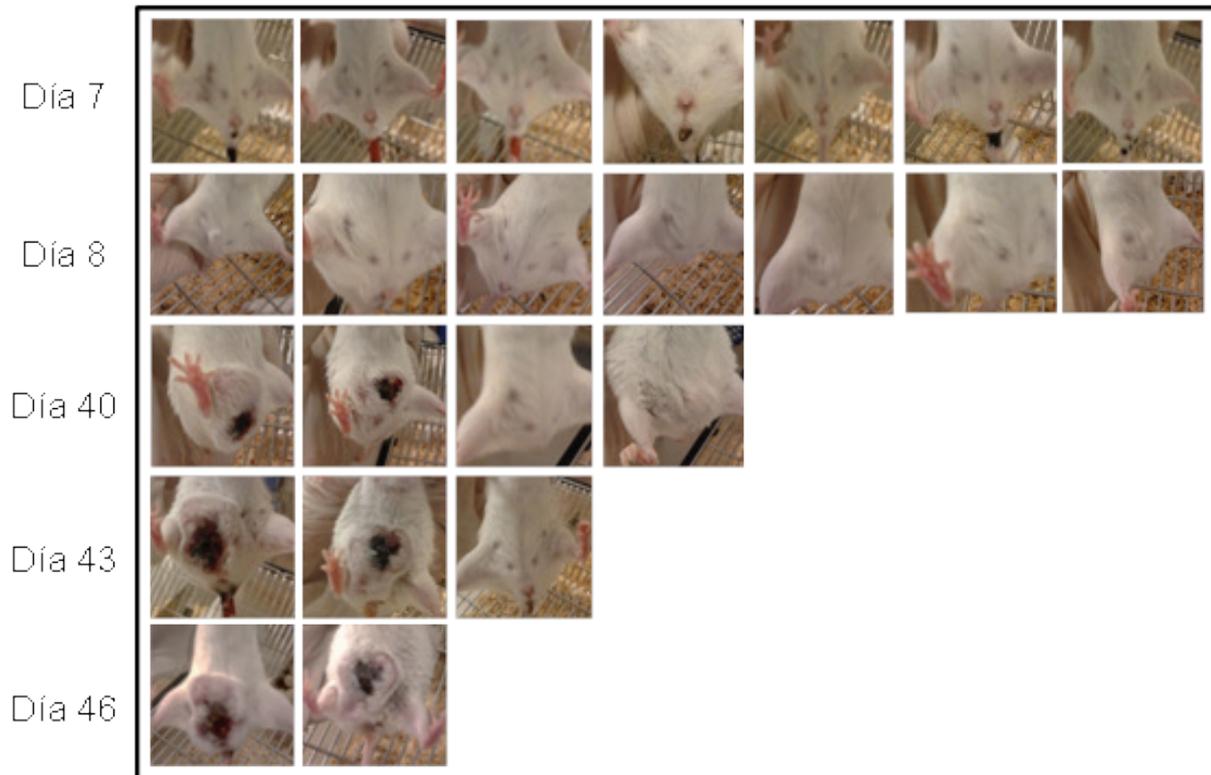
## Estudio del efecto de la Fracción D de Maitake sobre la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones.

Se utilizaron 19 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad: 5 en el grupo control, 7 en el Grupo Grifon D o Maitake Standard y 7 en el Grupo Pro4X. Se realizaron los tratamientos de prevención mediante inyección intraperitoneal diaria de 100  $\mu$ L de PBS estéril, 5mg/Kg peso de Grifon D y 5 mg/kg peso de Maitake Pro4X a cada uno de los ratones en los grupos Control, Maitake Standard y Maitake Pro4X, respectivamente. El tratamiento se desarrolló en forma diaria durante 17 días consecutivos. Una vez finalizado el tratamiento, se procedió a inducir tumorigenicidad mamaria por inyección intraperitoneal de  $3 \times 10^5$  células tumorales murinas LM3. Los animales fueron chequeados periódicamente para observar el desarrollo tumoral mamario. Se consideró que un bulto mayor o igual a 10mm correspondía a un tumor. En las Figuras 15A, 15B y 15C se observan las fotografías de la zona abdominal de los ratones de cada uno de los grupos a los 7, 8, 27, 40, 43 y 46 días post inducción tumoral.

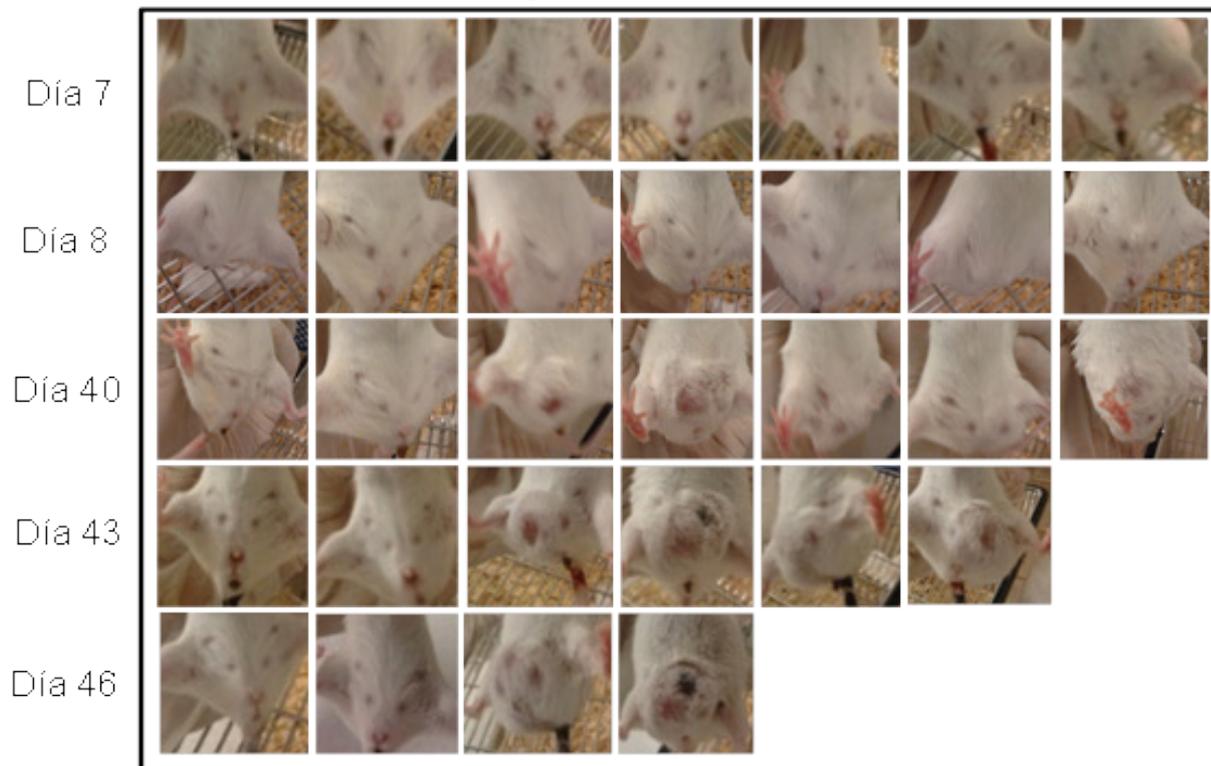
## Grupo control



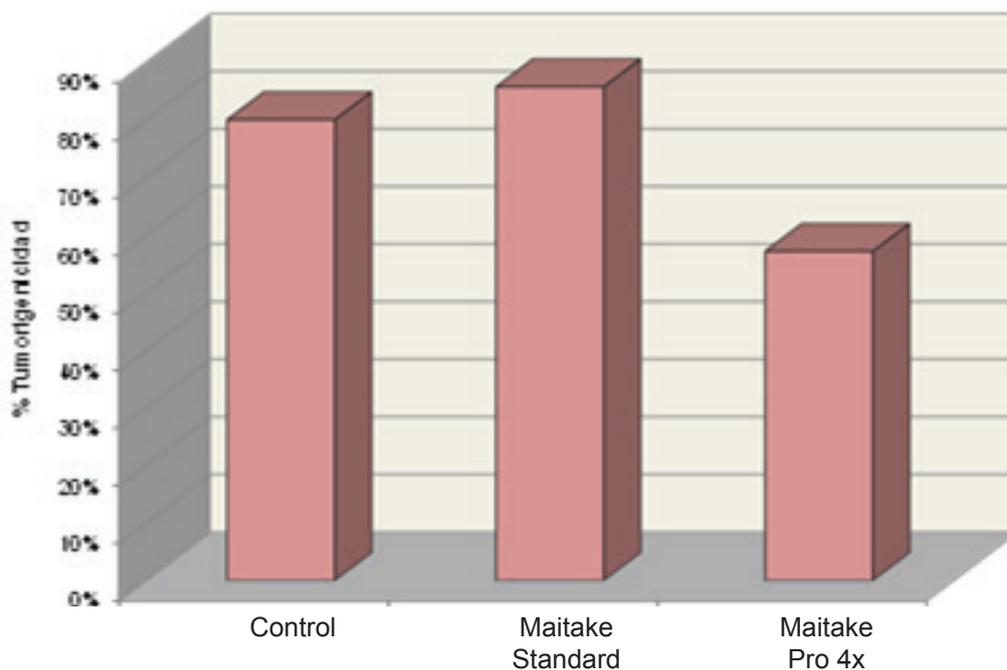
### Grupo Maitake Standard



### Grupo Maitake Pro 4X



Se observó que en el grupo control, 4 de 5 animales desarrollaron tumor mamario (80,0%), en el grupo Maitake Standard 6 de 7 desarrollaron tumor (85,7%) y en el grupo de Maitake Pro4X, 4 de 7 animales poseían tumor mamario (57,1%). En la Figura 16 se indican los valores de tumorigenicidad (capacidad de inducir la formación de tumores) y los porcentajes respectivos en cada uno de los grupos ensayados.



Tumorigenicidad	4/5	6/7	4/7
Porcentaje	80,0%	85,7%	57,1%

**Figura 16:** Porcentaje de tumorigenicidad.

**Tabla II: Prevención tumoral.**

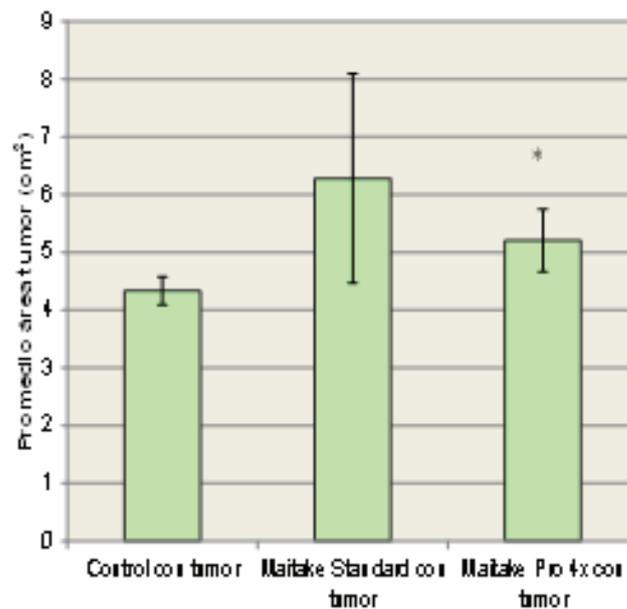
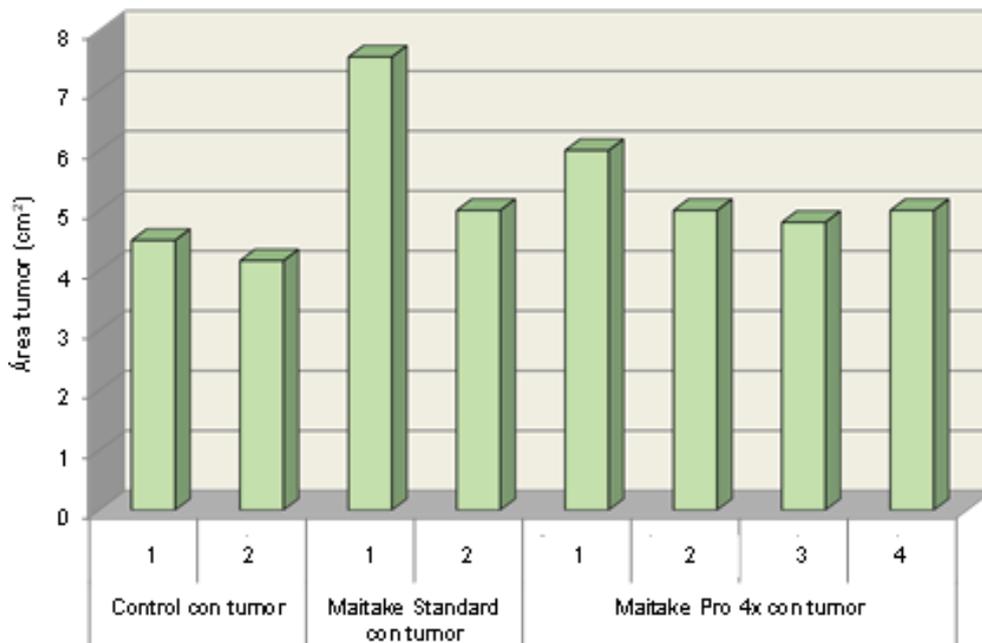
Grupo	Prevención Tumoral
Control	20,0%
Maitake Standard	14,3%
Maitake Pro4X	42,9%

Por otra parte se analizó el porcentaje de prevención en el desarrollo tumoral en cada uno de los tratamientos y observamos que el tratamiento con Maitake Standard dio solo un 14,3% de prevención tumoral, mientras que en el Grupo tratado con Maitake Pro4X observamos un 42,9% de prevención en el desarrollo del cáncer de mama. En la Tabla II se indica el porcentaje de prevención tumoral observado en este experimento.

En la Tabla III se indican las dimensiones de los tumores mamaros de los ratones en cada uno de los grupos al final del tratamiento (día 46 post inducción tumoral) luego de realizar el sacrificio de los mismos. En la Figura 17 se grafican estos valores.

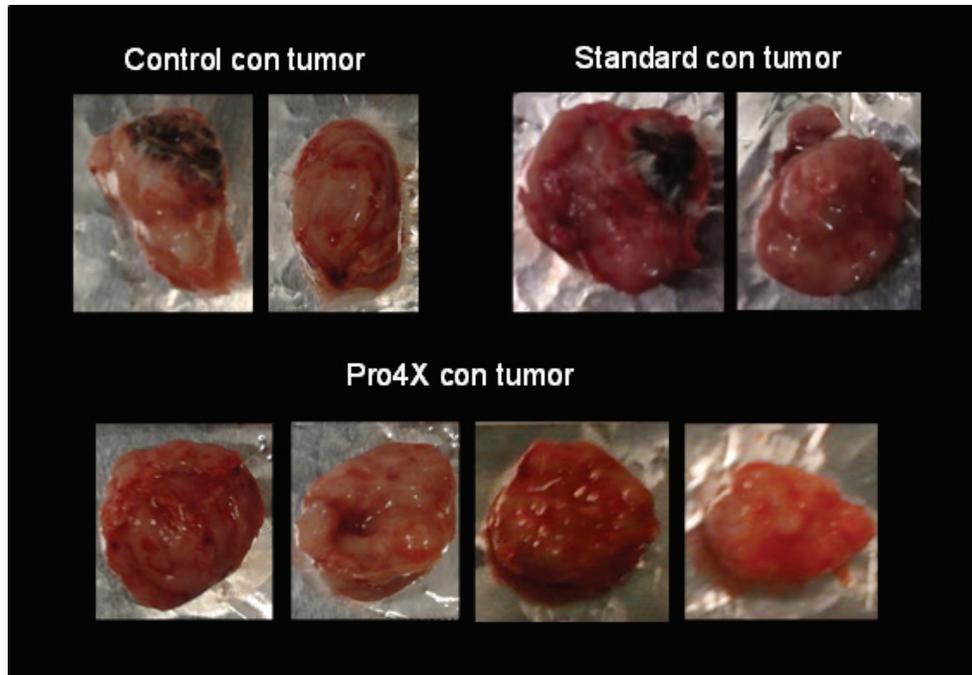
**Tabla III: Dimensiones tumorales.**

Grupo	Ratón n°	Longitudinal (cm)	Transversal (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Promedio área (cm <sup>2</sup> )
Control	1	2,5	1,8	4,5	4,3 ± 0,2 (2)
	2	2,6	1,6	4,2	
Maitake Standard	1	2,8	2,7	7,6	6,3 ± 1,8 (2)
	2	2,5	2,0	5,0	
Maitake Pro4X	1	2,5	2,4	6,0	5,2 ± 0,5 (4)
	2	2,5	2,0	5,0	
	3	2,4	2,0	4,8	
	4	2,5	2,0	5,0	



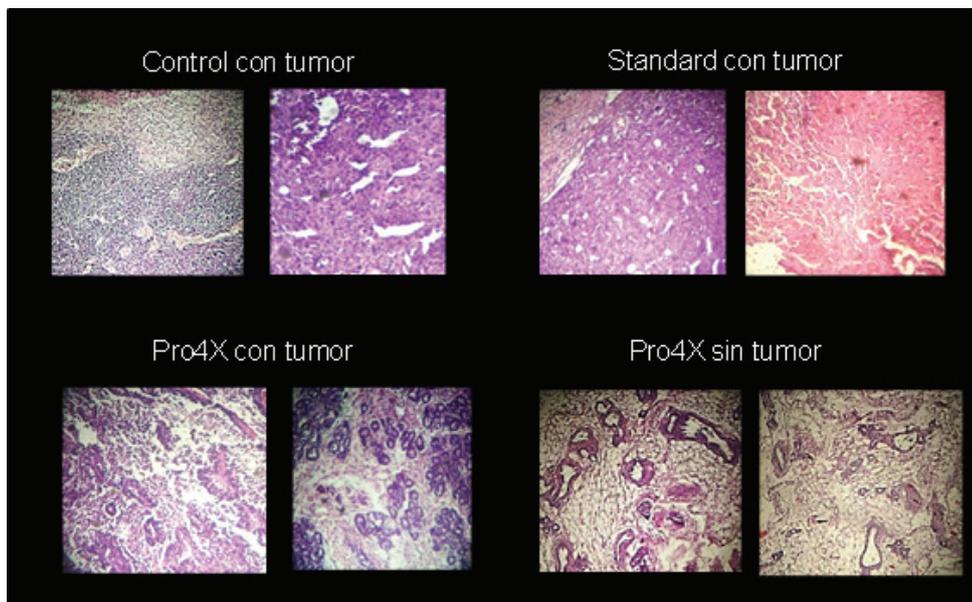
**Figura 17:** Dimensiones tumorales. \*p<0,05 vs Control.

Como se observa en la Tabla III y en la Figura 17, el tamaño de los tumores del grupo tratado con Maitake Pro4X (5,2 cm<sup>2</sup>) era mayor que el de los animales del grupo control (4,3 cm<sup>2</sup>). Sin embargo, al realizar la biopsia del tejido tumoral se observó que los tumores de los ratones controles eran sólidos y duros; en cambio, los de los grupos Maitake Standard y Maitake Pro4X eran de mayor tamaño pero por dentro estaban llenos de líquido. En la Figura 18 se observan tejidos tumorales mamarios de los ratones de cada grupo.



**Figura 18:** Aspecto macroscópico de los tumores de mama murinos.

La observación de estas diferencias macroscópicas de la fisiología tumoral mamaria llevó a realizar los estudios histológicos de cada uno de los tumores preparando los tejidos de mama, hígado y pulmones en tacos de parafina y realizando luego cortes histológicos de 5 mm para analizarlos microscópicamente. El estudio histológico fue realizado por gentileza de la Dra. María Marta Corte, Patóloga, de la UNS de Bahía Blanca. Maitake Standard y Maitake Pro4X eran de mayor tamaño pero por dentro estaban llenos de líquido. En la Figura 19 se observan cortes histológicos de tejido mamario representativos de cada uno de los grupos estudiados.

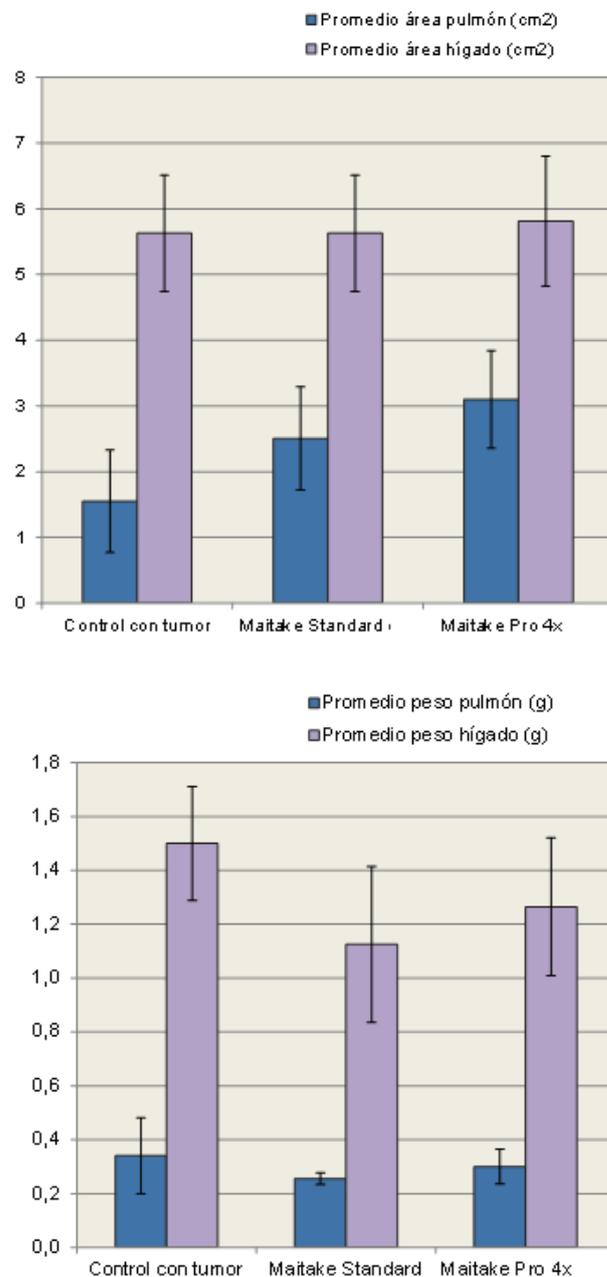


**Figura 19:** Cortes de los tejidos mamarios murinos.

El estudio histológico de los tejidos tumorales mamarios indicó que los tumores de los animales del Grupo Control correspondían a tumores de escasa diferenciación e hiperplásicos. Los tumores del Grupo Maitake Standard también tenían características similares al grupo control; no obstante, los tumores mamarios del Grupo tratado con Maitake Pro4X eran diferentes histológicamente, de contornos definidos, bien diferenciados y con menor número de células que el del grupo control. Estos resultados fueron sorprendentes y nos llevaron a pensar que de existir metástasis hepática o pulmonar, esta podría ser diferente entre los tres grupos analizados.

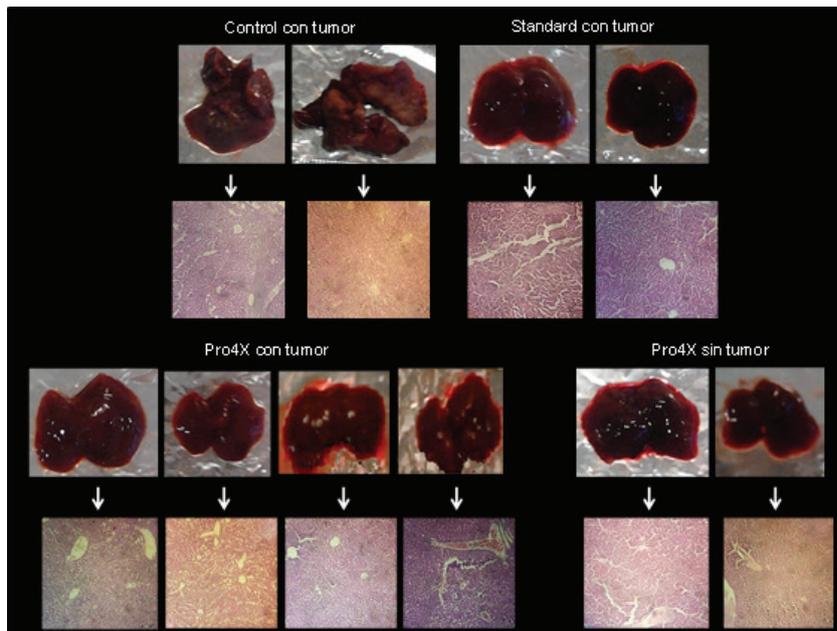
**Efecto de los extractos de Maitake sobre el desarrollo de metástasis en los animales con tumores de mama inducidos.**

Para verificar la presencia o ausencia de metástasis, se extirparon los hígados y pulmones de los animales de los distintos grupos y se determinaron sus dimensiones y pesos. En la Figura 20 se muestran los valores obtenidos para cada grupo examinado.



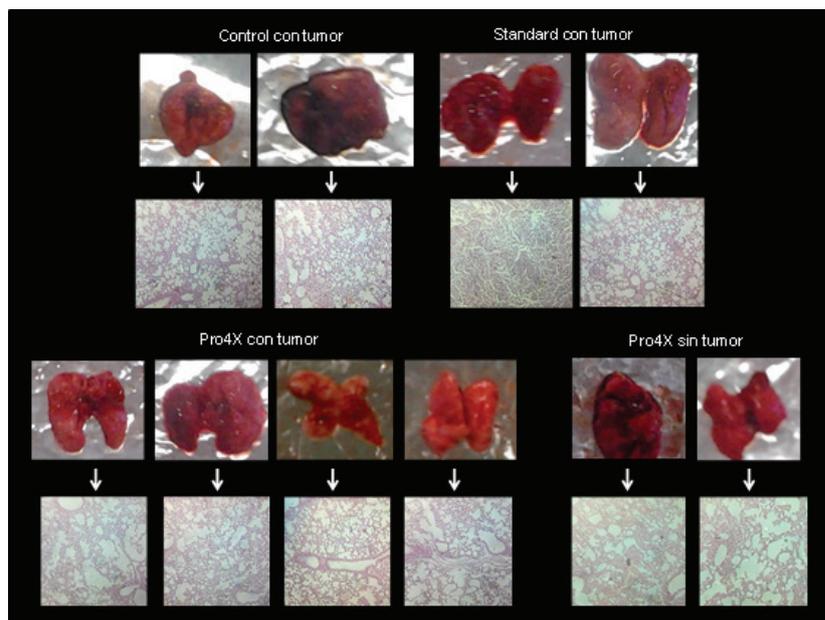
**Figura 20:** Promedio de las áreas (A) y los pesos (B) de los hígados y pulmones de los animales de que desarrollaron tumor en cada grupo ensayado.

Se observa que no existió diferencia significativa en el área de los pulmones e hígados de los animales de los distintos grupos, así como tampoco hubo diferencia significativa en sus pesos. Sin embargo, macroscópicamente se observó que el tejido hepático de los animales del grupo control era completamente diferente al de los animales tratados con Maitake. El hígado de los animales controles se observaba más blanquecino, pálido y rígido. En cambio, los hígados de los ratones tratados con Maitake Standard o Pro4X se observaban oscuros, con textura y aspecto normales. Al encontrar estas diferencias se decidió realizar el análisis histológico de los tejidos pulmonares y hepáticos de cada uno de los animales con tumor y analizamos los resultados. En la Figura 21 se observan los tejidos hepáticos y los cortes histológicos de los animales con tumor de cada uno de los grupos y de los animales sin tumor del grupo Maitake Pro4X.



**Figura 21:** Tejidos hepáticos murinos.

Los estudios histológicos de los tejidos hepáticos indicaron que los animales del grupo control poseían un tejido con vasos sanguíneos muy dilatados, con estructuras hepáticas diferentes a las normales y con algunos cambios mitóticos. Sin embargo, en ninguno de los tejidos hepáticos tratados con Maitake se observaron diferencias morfológicas comparadas con los tejidos normales. No se pudo establecer ciertamente si esas anomalías histológicas de los animales controles correspondían a metástasis.



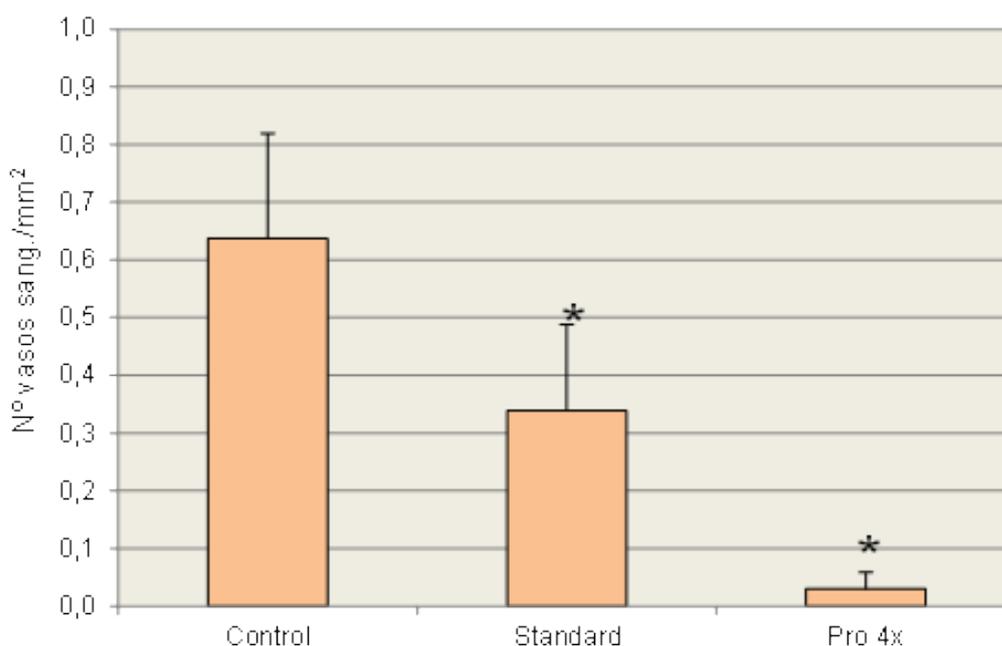
**Figura 22:** Tejidos pulmonares murinos.

En la Figura 22 se observan los tejidos pulmonares y los cortes histológicos de los animales con tumor de cada uno de los grupos y de los animales sin tumor del grupo Maitake Pro4X. En los estudios histológicos de los tejidos pulmonares no se observaron diferencias morfológicas entre los tejidos de los animales que desarrollaron tumor de mama y los de los animales sin tumor, excepto en el tejido de un animal del grupo tratado con Maitake Standard (ratón sin marca). En el tejido pulmonar de este ratón se observó un área tumoral que parece corresponder a un tumor maligno poco diferenciado.

**Efecto de los extractos de Maitake sobre el proceso de angiogénesis.**

Por otro lado, se hizo una estimación del índice de angiogénesis en los tejidos tumorales mamarios para establecer si existe un efecto anti-angiogénico o de reducción de la irrigación sanguínea por efecto de los extractos de Maitake. En la Tabla IV se indican los valores de densidad de vasos sanguíneos obtenidos para los animales de cada grupo. En la Figura 23 se grafica el promedio de cada grupo. El asterisco señala que la diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo Control.

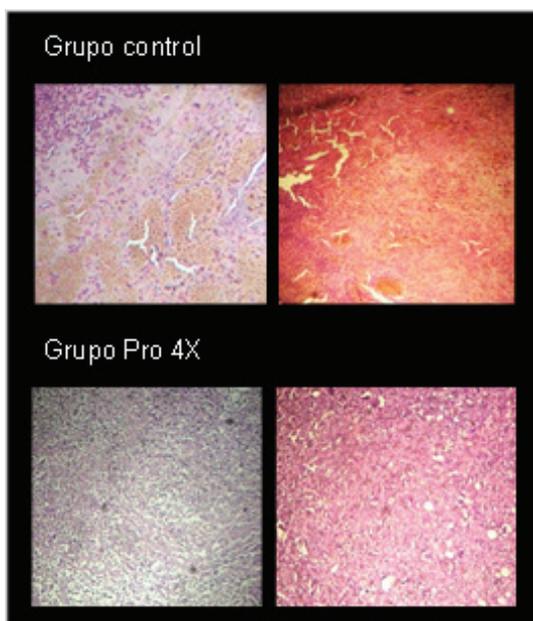
Grupo	Ratón n°	N° vasos sang./mm <sup>2</sup>	Promedio
<b>Control</b>	1	0,761	0,637 ± 0,182 (2)
	2	0,513	
<b>Standard</b>	1	0,174	0,339 ± 0,149 (2)
	2	0,422	
<b>Pro4X con tumor</b>	1	0,012	0,031 ± 0,028 (4)
	2	0,059	
	3	0,007	
	4	0,035	



**Figura 23:** Densidad de vasos sanguíneos en cortes de tejido mamario. \* $p < 0,05$  vs Control.

En la Tabla IV y en la Figura 23 se observa que el número de vasos sanguíneos/mm<sup>2</sup> en los tejidos tumorales de los animales control (0,64) era significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) comparado con los animales tratados con Maitake Standard (0,30) o con los animales tratados con Pro4X (0,03). En la Figura

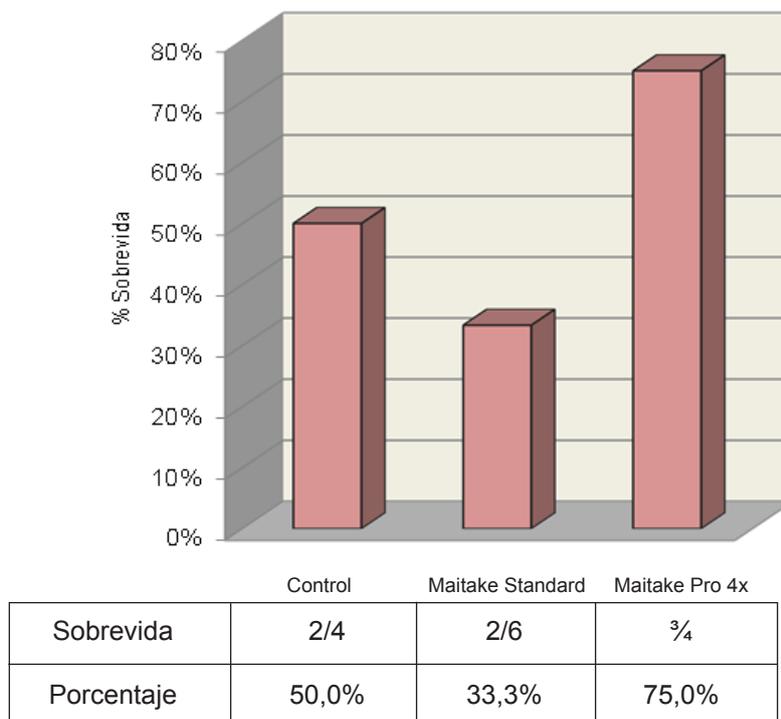
24 se muestran las fotografías de secciones de tejido tumoral mamario de ratones de los Grupos Control y Pro4X. Se observa la mayor densidad de vasos sanguíneos presente en el Grupo Control.



**Figura 24:** Densidad de vasos sanguíneos en cortes de tumores de mama de los grupos Control y Maitake Pro4X.

#### Efecto del tratamiento con Maitake en la sobrevida relativa porcentual de ratones BALB/c.

A continuación se determinó la sobrevida total relativa de los ratones de cada grupo. En la Figura 25 se indican los porcentajes de sobrevida hasta el día 46 post inducción tumoral (final del experimento). La mayor sobrevida (75%) correspondió al grupo que recibió Maitake Pro4X.



**Figura 25:** Sobrevida total relativa.

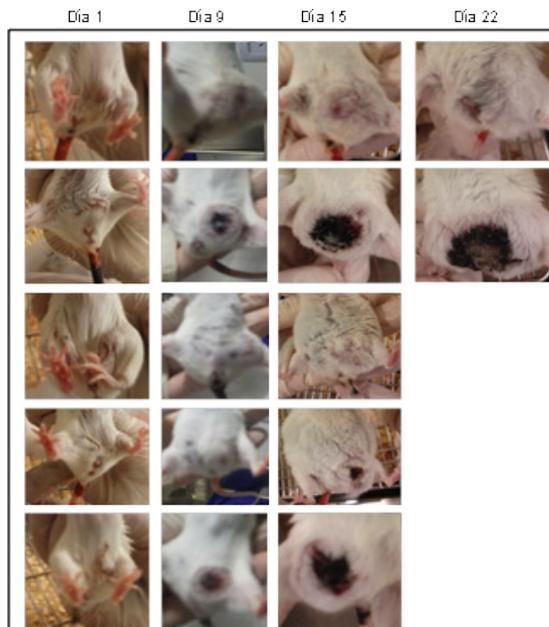
## Efecto de la Fracción D de Maitake sobre la tumorigénesis mamaria y análisis de la coadyuvancia con quimioterapia para el tratamiento de tumores de mama en ratones.

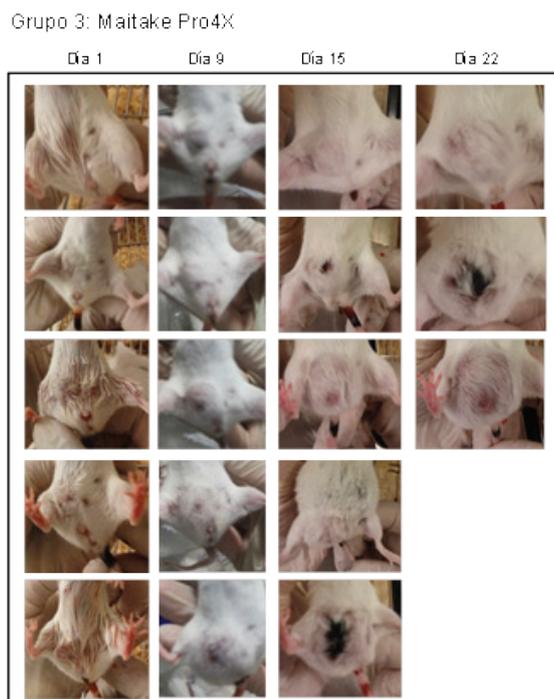
El objetivo era determinar si Maitake Pro4X podía actuar como co-adyuvante de quimioterapia y comparar la sobrevida entre los dos tratamientos por separado. Para llevar a cabo este experimento se emplearon 15 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad. Se indujeron los tumores mamarios por inyección intraperitoneal de  $4 \times 10^5$  células tumorales murinas LM3. A los 24 días de la inducción tumoral y cuando los tumores mamarios alcanzaron un tamaño mayor a 0,8 cm, se iniciaron los tratamientos. Se utilizaron 3 grupos de 5 animales cada uno, separados en Grupo Quimioterapia solo, Grupo Quimioterapia y Maitake Pro4X y Grupo Maitake Pro4X solo. El tratamiento con quimioterapia consistía en 4 mg/kg peso de Doxorubicina combinado con 80 mg/kg peso de Ciclofosfamida, diluidos en PBS con un volumen total de 40  $\mu$ l para la administración oral a los ratones. El tratamiento con Maitake consistía en la administración oral de 5mg/kg peso de Maitake Pro4X diluidos en PBS en un volumen total de 40  $\mu$ l. La quimioterapia fue administrada en forma oral una vez por semana y el Maitake fue administrado oralmente en forma diaria. Ambos tratamientos fueron mantenidos durante 5 semanas. (Figura 26).

Grupo 1: Quimioterapia



Grupo 2: Quimioterapia + Maitake Pro4X





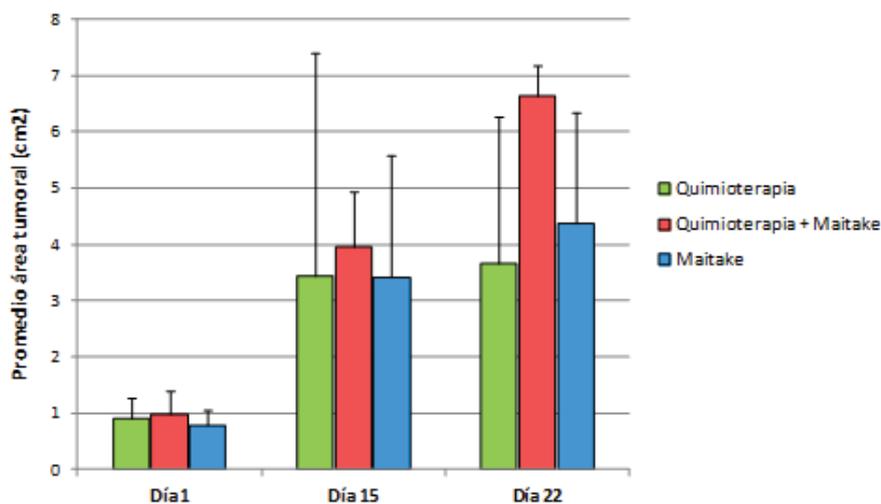
**Figura 26:** Fotografías de la zona abdominal de los ratones de cada grupo sobrevivientes hasta los días 1, 9, 15 y 22 de tratamiento.

En la Tabla V se indican los valores del área de los tumores mamarios en cada uno de los grupos tratados al 1er día (semana 1), a los 15 días (semana 3) y a los 22 días del tratamiento (semana 4). Se observa que los tumores tratados con quimioterapia incrementaban su tamaño desde el día 1 al día 22 del tratamiento. Se observó además que a los 15 días, 2 de 4 ratones murieron en este grupo (probablemente a causa del tratamiento) y por lo tanto el desvío estándar (D.S.) se incrementó (Figura 27). Un crecimiento similar se observó en el Grupo 3, correspondiente al tratamiento con Maitake Pro4X

Sin embargo, como se muestra más claramente en la Figura 27, el mayor crecimiento tumoral se dio en el grupo 2, tratamiento de Maitake Pro4X en co-adyuvancia con quimioterapia. Además, no había diferencias significativas (Student,  $p > 0,05$ ) entre los grupos 1 y 2 en el área tumoral a los 22 días del tratamiento ( $p \geq 0,1$ ). Asimismo no hallamos diferencias significativas en las áreas tumorales entre los grupos 1 y 3 ( $p \geq 0,3$ ).

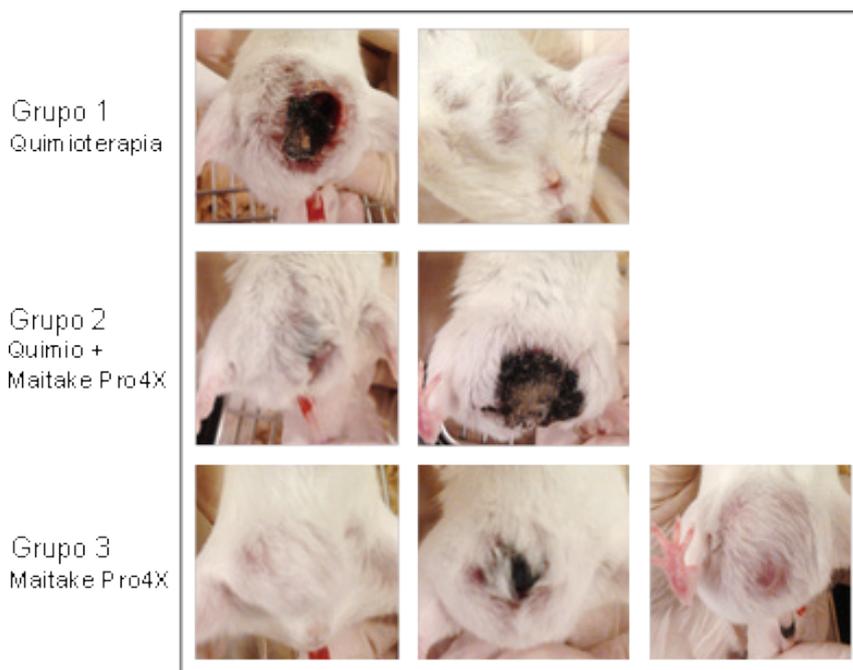
**Tabla V:** Dimensiones tumorales mamarias en la terapia con Maitake Pro4X con o sin quimioterapia en ratones BALB/c.

Grupo	Ratón n°	Dimensiones tumor										
		Día 1			Día 15			Día 22				
		Longitud (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Promedio área (cm <sup>2</sup> ) ± D.S	Longitud (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Promedio área (cm <sup>2</sup> ) ± D.S	Longitud (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	Promedio área (cm <sup>2</sup> ) ± D.S		
Grupo 1 Quimioterapia (Doxo + Ciclo)	1	0,95	0,903	0,91 ± 0,372	2,60	2,40	6,24	3,44 ± 3,960	2,50	2,20	5,5	3,65 ± 2,616
	2	0,65	0,423		0,80	0,80	0,64		1,50	1,20	1,8	
	3	1,15	1,323		-	-	-		-	-	-	
	4	1,00	1,000		-	-	-		-	-	-	
Grupo 2 Quimioterapia + Maitake Pro 4X	1	1,20	1,440	0,98 ± 0,431	2,00	2,00	4,00	3,95 ± 0,995	2,60	2,40	6,24	6,63 ± 0,552
	2	0,75	0,563		1,60	1,60	2,56		-	-	-	
	3	0,90	0,810		2,40	2,20	5,28		2,70	2,60	7,02	
	4	1,20	1,440		2,40	1,80	4,32		-	-	-	
	5	0,80	0,640		2,00	1,80	3,60		-	-	-	
Grupo 3 Maitake Pro 4X	1	0,85	0,723	0,77 ± 0,271	1,10	1,00	1,10	3,42 ± 2,150	1,50	1,50	2,25	4,37 ± 1,958
	2	0,90	0,810		2,20	2,00	4,40		-	-	-	
	3	0,70	0,490		1,40	1,25	1,75		2,50	1,90	4,75	
	4	1,10	1,210		2,70	2,40	6,48		-	-	-	
	5	0,80	0,640		2,05	1,65	3,38		2,60	2,35	6,11	



**Figura 27:** Crecimiento tumoral mamario durante el tratamiento con quimioterapia con y sin Maitake Pro4X.

Por otra parte, se observó el aspecto macroscópico de los tumores mamarios durante los tratamientos y se halló que los tumores de los ratones del Grupo 3 tratados únicamente con Maitake Pro4X fueron menos agresivos y menos ulcerantes que los de aquellos que recibieron quimioterapia en los Grupos 1 y 2 (Figura 28). Algunos de los ratones del Grupo 3 que exhibieron necrosis y ulceraciones lo hicieron más tardíamente (a partir del día 15 de tratamiento), mientras que los de los animales de los otros grupos lo hicieron a partir del día 8° del tratamiento (Figura 26).



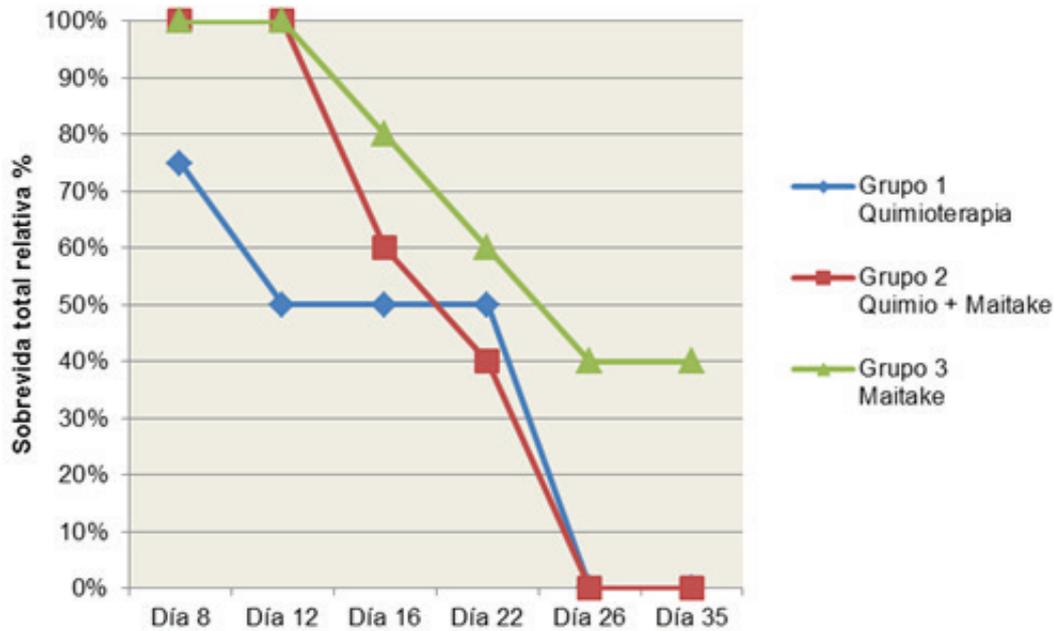
**Figura 28:** Aspecto macroscópico de los tumores mamarios en el día 22 de tratamiento anti-tumoral.

### Efecto del tratamiento con o sin Maitake Pro4X y quimioterapia sobre la supervivencia total relativa porcentual en ratones BALB/c.

Con el objetivo de determinar si el tratamiento del cáncer de mama con Maitake Pro4X mejoraba la supervivencia total relativa en ratones BALB/c, se analizó el número de ratones vivos, sobrevivientes al tratamiento a cada uno de los tiempos indicados en la Tabla VI y la Figura 29.

**Tabla VI:** Supervivencia total relativa porcentual en el tratamiento del cáncer de mama en ratones.

N <sup>o</sup> Muestra	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	% Pureza	Concentración (µg/ml)
1	0,771	0,423	0,304	1,817	2,536	90%	3095,2
2	0,582	0,320	0,274	1,808	2,124	90%	2343,1
3	0,072	0,039	0,120	1,736	0,600	86%	310,4
4	2,216	1,236	1,111	1,792	1,995	89%	8865,5
5	0,697	0,383	0,354	1,814	1,969	90%	2807,0
6	0,257	0,139	0,108	1,799	2,380	89%	1062,3



**Figura 29:** Supervivencia total relativa porcentual de los animales de los grupos tratados con y sin Maitake en presencia o ausencia de quimioterapia.

De la Tabla VII y la Figura 29 se observa que hasta el día 12 de tratamiento la supervivencia fue similar en los grupos 2 (Quimioterapia + Maitake Pro4X) y 3 (Maitake Pro4X), en los que no hubo muertes; mientras que fue menor en el grupo 1 (Quimioterapia), en el que sólo 2 de 4 animales permanecieron vivos (50%). A partir del día 16, la supervivencia comenzó a descender en el grupo 2 y en el grupo 3, aunque en este último lo hizo más lentamente (Figura 29): en el grupo 2 la supervivencia fue del 60%, 40% y 0% hasta los días 16, 22 y 26 respectivamente; la supervivencia en el grupo 3 para estos mismos días fue de 80%, 60% y 40%. Desde el día 26 de tratamiento, la supervivencia fue nula en los grupos 1 y 2. Dos animales del grupo 3 (40%) sobrevivieron hasta el final del tratamiento (día 35).

## Efecto de Maitake Pro4X sobre la expresión de genes específicos del fenotipo tumoral inducido por Maitake en tejido tumoral mamario.

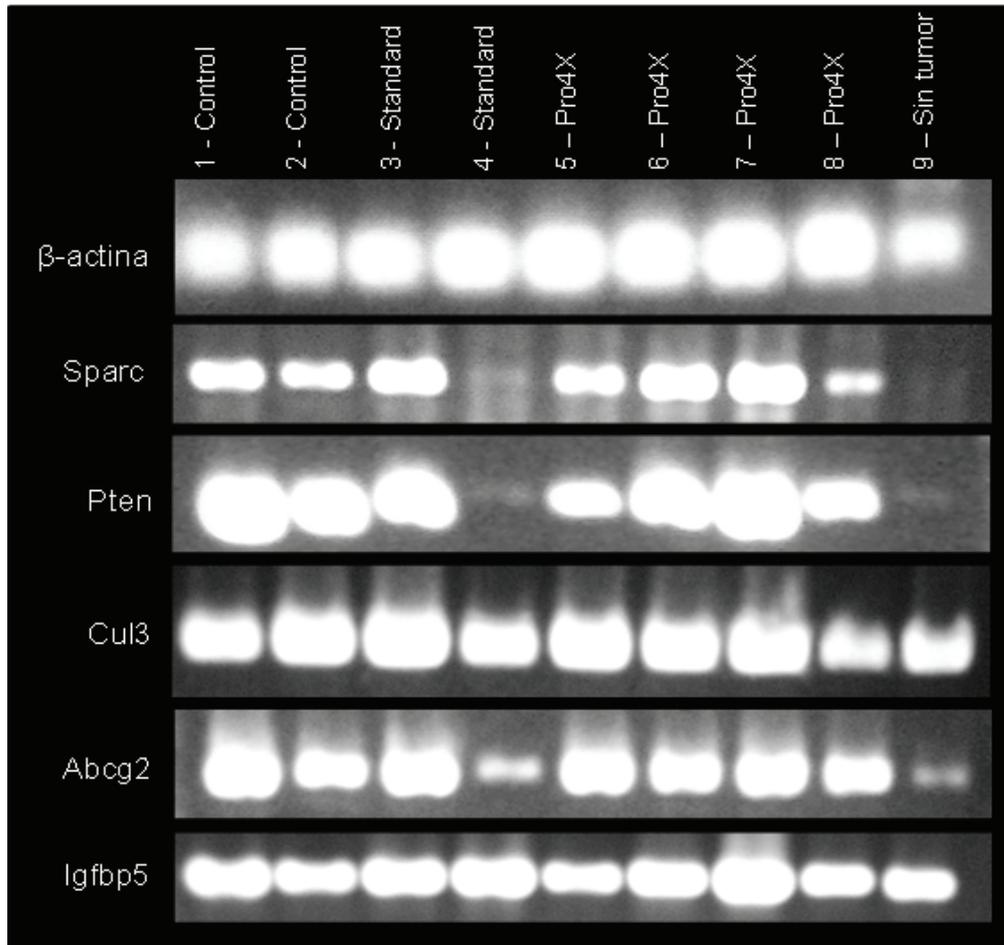
Con el fin de determinar si la administración de Maitake Pro4X modificaba el fenotipo tumoral, se realizaron estudios de expresión génica en los tejidos mamarios de los ratones tratados y sin tratar. Se eligieron los genes *Abcg2*, *Cul3*, *Igfbp5*, *Pten* y *Sparc*, cuya expresión resultó ser modulada por Maitake en estudios previos de nuestro grupo [92]. Se aisló y purificó ARN de los tejidos mamarios de los ratones con tumor de los grupos Control, Standard y Pro4X y de un ratón sin tumor del grupo Pro4X. La concentración del ARN aislado y purificado se determinó mediante espectrofotometría, teniendo en cuenta la absorbancia a 260. Para determinar su pureza se midió también la absorbancia a 280 y 230. Los valores de absorbancia a 260, 280 y 230, la concentración de ARN de las muestras y su pureza se muestran en la Tabla VI.

**Tabla VII:** Concentración y pureza de muestras de ARN de tejido mamario de ratón.

N° Muestra	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	% Pureza	Concentración (µg/ml)
1	0,771	0,423	0,304	1,817	2,536	90%	3095,2
2	0,582	0,320	0,274	1,808	2,124	90%	2343,1
3	0,072	0,039	0,120	1,736	0,600	86%	310,4
4	2,216	1,236	1,111	1,792	1,995	89%	8865,5
5	0,697	0,383	0,354	1,814	1,969	90%	2807,0
6	0,257	0,139	0,108	1,799	2,380	89%	1062,3
7	1,418	0,775	0,817	1,826	1,736	91%	5678,0
8	0,674	0,368	0,364	1,823	1,852	91%	2708,8
9	0,012	0,001	0,006	1,870	2,000	93%	100,9

Partiendo del ARN purificado, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR para los genes mencionados y para la  $\beta$ -actina, como control. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 3% (Figura 30).

NOTA: Las reacciones de RT-PCR las vamos a hacer con curva de concentración por ciclos: 25, 30 y 35 ciclos con cada uno de los genes y en todas las condiciones para poder semicuantificar la expresión génica.



**Figura 30:** Expresión de  $\beta$ -actina, Sparc, Pten, Cul3, Igfbp5 y Abcg2 en tejidos mamarios de ratones con (1-8) o sin tumor (9), tratados con PBS (1-2), Maitake Standard (3-4) o Maitake Pro4X (5-8).

En la Figura 30 se observa que la  $\beta$ -actina se expresa en todas las condiciones ensayadas. Debido a que se observa saturación en la reacción de RT-PCR, se decidió hacer curva de concentración por ciclos para poder semicuantificar las expresiones de todos los genes estudiados en esta sección con respecto a la expresión de beta actina.

En la Figura 30 también se observa que Sparc se expresa en forma diferencial en todas las condiciones analizadas. Se observan una mayor expresión de Sparc en los tejidos mamarios de ratones 6 y 7 tratados con Maitake Pro4x. Por otra parte, se observa una menor expresión del gen en el tejido mamario del ratón 8 tratado con Maitake Pro4X. No se observa banda correspondiente a la expresión del gen Sparc en el tejido mamario del ratón sin cáncer tratado con Maitake Pro4X, ni en el tejido tumoral del ratón 4 tratado con Maitake Standard.

Con respecto a Pten, en la Figura 30 se observa que también se expresa en forma diferencial en las distintas condiciones ensayadas. En los tejidos mamarios de los ratones 5 y 8 tratados con Maitake Pro4X se presenta menor expresión del gen, mientras que no se observa banda correspondiente a Pten en el tejido tumoral del ratón 4 tratado con Maitake Standard ni en el tejido mamario normal del ratón 9 tratado con Maitake Pro4X.

Como se observa en la Figura 30, Abcg2 se expresa en forma diferencial en las distintas condiciones estudiadas. No se observa banda en el tejido tumoral del ratón 4 tratado con Maitake Standard ni en el tejido normal del ratón 9 tratado con Maitake Pro4X.

Tanto Cul3 como Igfbp5 se expresan en todas las condiciones estudiadas. Para determinar si existe diferencia sus niveles de expresión entre los distintos tejidos, es necesario realizar curvas de concentración por ciclos.

## DISCUSION

La proliferación desmedida de las células tumorales, esencial en el proceso tumoral, se debe a la desregulación del crecimiento celular. Debido a la adquisición de mutaciones por parte de las células cancerosas, ciertos genes reguladores de la proliferación o diferenciación se convierten en oncogenes que desencadenan el cáncer. Las células experimentan proliferación desmedida y escapan a la apoptosis, ya sea porque se inactivan vías que fisiológicamente inducen la apoptosis o porque se activan vías que la inhiben. La interrupción de la apoptosis puede también contribuir al desarrollo de metástasis, puesto que permite a algunas células tumorales sobrevivir en el torrente sanguíneo e invadir otros tejidos evadiendo la apoptosis de células en suspensión [110]. Por lo tanto, es de especial interés encontrar compuestos que causen apoptosis específicamente en las células tumorales. Muchas drogas quimioterapéuticas actúan induciendo apoptosis en estas células, pero carecen de especificidad al afectar en mayor o menor grado a todas las células en división activa. Como se mencionó, las propiedades antitumorales de la Fracción D de Maitake son atribuidas a su efecto inmunomodulador. Sin embargo, también se ha reportado un efecto directo de Maitake sobre células de cánceres de próstata [52], gástrico [53], renal [54] y de mama [55] mediante la inducción de apoptosis.

En esta Tesina, en primer lugar se estudiaron los efectos de la Fracción D de Maitake y de la quimioterapia (Doxorrubicina + Ciclofosfamida) sobre la viabilidad celular de células murinas de cáncer de mama LM3 in vitro. Con este fin se utilizaron distintas concentraciones de Maitake Pro4X y quimioterapia a distintos tiempos de tratamiento. Tanto en los tratamientos con Maitake como en los tratamientos con quimioterapia, la muerte celular aumentó en función de la concentración empleada y del tiempo de tratamiento. Estos resultados sugieren que la fracción D de Maitake podría tener un efecto quimioterápico induciendo la muerte celular dependiente de la dosis. En estudios futuros estudiaremos si la muerte celular producida por Maitake Pro4X es debida a la apoptosis, como ha sido reportado en trabajos previos [52-55]. Asimismo, evaluaremos el efecto que tiene el tratamiento con Maitake en células normales, a fin de comprobar su especificidad por las células tumorales. Por otra parte, el tratamiento con drogas quimioterapéuticas provocó una mayor muerte celular que el tratamiento con Fracción D de Maitake. Es interesante destacar que cuando se repitió el tratamiento con Maitake Pro4X utilizando un frasco que había sido abierto cinco meses atrás, se obtuvieron valores de muerte celular menores (no incluidos en esta tesina) que los correspondientes al tratamiento con el frasco recién abierto. Esto sugiere que el producto activo en la muerte celular podría degradarse por oxidación o por exposición a la luz. Además, dado que estos extractos no son puros, es necesario aislar, identificar y caracterizar el compuesto activo. De todos modos, los experimentos indicados en esta tesina fueron realizados con una Fracción D de Maitake en óptimas condiciones de mantenimiento.

Hoy en día, dadas las limitaciones de las terapias convencionales para reducir la tasa de mortalidad por cáncer, muchos esfuerzos se focalizan en la prevención de la carcinogénesis. La prevención del cáncer consiste en disminuir la posibilidad de tener cáncer, lo cual lleva a estudiar posibles factores de riesgo y de protección. En este marco, se investigan los potenciales efectos de distintos compuestos naturales, como hierbas y suplementos dietarios, para reducir el riesgo de contraer cáncer. Ha sido reportado que los  $\beta$ -glucanos de Maitake (Fracción D) poseen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral ya sea administrados en forma oral o por vía intraperitoneal [40]. En esta Tesina se investigaron los efectos de dos extractos purificados de Fracción D de Maitake, el Maitake D Fraction Pro4X y la Fracción D Standard de Maitake, en la prevención de la tumorigénesis mamaria en ratones BALB/c. Los resultados obtenidos en esta Tesina sugieren que la fracción D de Maitake, administrada intraperitonealmente previene el 43% de la tumorigénesis mamaria en ratones BALB/c. En un trabajo previo de Nanba y Kubo [111], ratones Balb/c fueron tratados con 0,2 mg de Fracción D de Maitake durante 15 días consecutivos. Luego indujeron el proceso tumorigénico mediante la inyección del carcinógeno 3-methylcholanthrene y obtuvieron un 69% de inhibición de la carcinogénesis hepática (comparado con un 7% en el grupo control)

Consideramos como conclusión de los experimentos de prevención que Maitake Pro4X tiene un efecto más importante sobre la prevención de la carcinogénesis que la Fracción D Standard. Es muy importante destacar que Maitake Pro4X redujo la mortalidad desde el 40% (observado en los controles) al 14% (observado en los animales tratados con Maitake Pro4X). Sin embargo, la mortalidad con Maitake Standard es aún mayor que en los controles. Esto coincide con el menor porcentaje de muerte celular observado en las células LM3 tratadas con Maitake Pro4X procedente de un frasco abierto tiempo atrás con respecto a las tratadas con Maitake Pro4X "nuevo". Como se mencionó, es posible que el producto se degrade, oxide

o cambie su composición con el paso del tiempo. Cabe destacar que en un trabajo reciente [56] Wu et al. sugiere que el peróxido de ergosterol (EPO) hallado en Maitake tenía un rol importante en la actividad apoptótica del hongo. En el futuro estudiaremos la posibilidad de que el EPO esté presente en la Fracción D de Maitake y de que el efecto anti-tumoral del extracto se deba al EPO y no a los  $\beta$ -glucanos. Estos últimos son probablemente responsables de la estimulación del sistema inmune que lleva al rechazo de los tumores [39]. Sin embargo, no puede descartarse una acción conjunta de varios de los componentes del extracto ( $\beta$ -glucanos, EPO, y otros compuestos). Por lo tanto, como ya se mencionó, resultará imprescindible en el futuro aislar y caracterizar químicamente (determinar la composición y estructura) de los componentes activos.

La inhibición de la metástasis es un punto clave para retrasar la progresión del cáncer y prolongar la sobrevida del paciente. En estudios previos, utilizando ratones, varios autores han reportado han reportado la capacidad de la Fracción D de Maitake de prevenir el desarrollo de la metástasis en hígado [80] y pulmón [112]. Se ha sugerido que el mecanismo es por activación del sistema inmune, lo que facilita la eliminación de las células tumorales presentes en la circulación sanguínea o linfática. En esta Tesina, se procesaron los tejidos hepáticos y pulmonares de los ratones tratados con Maitake y sin tratar para verificar la presencia o ausencia de metástasis en estos órganos. En cuanto al tejido hepático, se observan diferencias entre los distintos grupos. En el grupo control (con tumores pero sin tratamiento con Fracción D) se observan vasos muy dilatados y estructuras hepáticas distintas a las normales. En cambio, los grupos tratados con Maitake Standard o Pro4X no presentan diferencias morfológicas en comparación con los tejidos normales. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para determinar con certeza si las anomalías histológicas de los animales controles se deben a metástasis.

La angiogénesis es un proceso fundamental en el crecimiento tumoral y en la generación de metástasis. Los resultados que se obtuvieron sugieren que la densidad de vasos sanguíneos es menor en los grupos tratados con ambos extractos de Maitake con respecto al grupo control; a su vez la menor densidad correspondió al grupo tratado con Maitake Pro4X. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en el que se demostró que un extracto acuoso de Maitake inhibía la angiogénesis inducida por VEGF tanto *in vitro* como *in vivo* [87]. Con respecto a la histología de los tejidos mamarios, también vale la pena destacar que los tumores de los animales tratados con Maitake Pro4X presentan menor proliferación y mayor diferenciación que los del grupo control. Esto concuerda con la idea de que la Fracción D de Maitake podría contribuir a disminuir el proceso de carcinogénesis mamaria o la progresión tumoral.

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer de mama, aún existen muchos obstáculos que superar. En muchos casos, el tratamiento no es efectivo debido a la resistencia de los tumores al tratamiento o debido a la presencia de metástasis. Además, los tratamientos existentes pueden producir efectos secundarios adversos consecuencia de su inespecificidad. Por estos motivos, se buscan con esmero nuevas alternativas más benévolas para tratar el cáncer, inhibir la metástasis, aumentar la sobrevida y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por este motivo, en esta Tesina se estudió el efecto de la Fracción D de Maitake administrada oralmente en el la tumorigénesis mamaria en ratones BALB/c. En el tratamiento anti-tumoral con Maitake Pro4X se observó que no existía una reducción significativa del volumen tumoral. En un trabajo previo [40], en cambio, otros autores reportaron un 64% de inhibición del crecimiento tumoral en ratones C3H/HeN con carcinoma de mama a los que se administraron en forma oral 0,5 ml de 3,0 mg/ml de Fracción D (dosis más de diez veces mayor que la empleada en este trabajo) que extrajeron directamente del cuerpo fructífero de Maitake (en este trabajo, en cambio, se utilizó un producto comercial).

Cuando se estudió el efecto co-adyuvante de la Fracción D de Maitake con la quimioterapia, encontramos una mayor mortalidad en el grupo de ratones tratados con quimioterapia sola. Sin embargo, la combinación de quimioterapia con Maitake Pro4X previno la muerte por toxicidad generada por el tratamiento quimioterápico ocurrido a la semana de tratamiento en el grupo de quimio solo. Por otro lado, se observó que la mortalidad era menor en el grupo tratado con Maitake Pro4X solo. Esto puede explicarse si se tienen en cuenta los efectos secundarios adversos de los tratamientos con Ciclofosfamida y Doxorrubicina [17, 25, 26]. Además, no se utilizó la vía clásica de administración de la quimioterapia (vía intravenosa) sino que la administración fue oral. Coincidentemente, Baselga et al [113] reportaron que la mortalidad en ratones BALB/c atímicos, a los que se les inyectaron células de cáncer de mama y que fueron tratados con inyección intraperitoneal con 100  $\mu$ g/20g de peso corporal de Doxorrubicina, fue mayor (21%) que

en los animales controles (13%) a los 15 días de finalizado el tratamiento. De modo que la mortalidad inducida por la Doxorubicina es alta.

Como ocurrió con el tratamiento con Maitake Pro4X, la quimioterapia administrada en forma oral en una dosis semanal de 4 mg/kg de Doxorubicina más + 80 mg/kg de Ciclofosfamida, tampoco redujo el tamaño tumoral. Este resultado concuerda con el trabajo de Ottewell et al [114], en el que inocularon células humanas de cáncer de mama MDA-MB-436 en ratones nude MF1. Luego de 7 días administraron semanalmente 2 mg/kg de peso de Doxorubicina por inyección intravenosa (vía clásica de administración de la quimioterapia) durante seis semanas. Al evaluar el crecimiento tumoral, no observaron diferencias significativas en el volumen tumoral de los animales que recibieron Doxorubicina con respecto a los controles. En cambio, en otro estudio Riwanto et al [115] observaron una reducción del crecimiento tumoral en ratones C3H inoculados con células de cáncer de mama que fueron tratados por vía intravenosa con 0,013 mg Ciclofosfamida + 0,0156 mg Doxorubicina.

Posteriormente se realizaron estudios de expresión genética en el tejido mamario de ratones tratados y sin tratar a fin de determinar si la administración de Maitake Pro4X inhibía genes específicos del tejido tumoral. Se eligieron genes cuyo nivel de expresión ha sido relacionada con el fenotipo maligno en células tumorales y cuya expresión resultó ser modulada por Maitake en estudios previos de nuestro grupo: ABCG2, CUL3, IGFBPR5, PTEN y SPARC.

Uno de los genes que se analizaron es SPARC, cuyo rol en la carcinogénesis mamaria y en la metástasis es controversial. Algunos estudios han asociado una elevada expresión de SPARC con un pobre pronóstico y menor supervivencia en pacientes de cáncer de mama basal y HER2+ [116], carcinoma ductal invasivo [117] y con un menor tiempo de recurrencia en pacientes con carcinoma ductal in situ [118]. Además se ha reportado la ausencia de expresión de SPARC en tumores benignos [117]. Por otro lado, se han relacionado su baja expresión con menor supervivencia y el peor pronóstico en pacientes de los subtipos luminal A o triple negativo [119]. Además, ha sido reportado que la “down-regulación” de SPARC podría contribuir a la invasividad de células de cáncer de mama MCF-7 [120] y que su expresión endógena elevada en células de cáncer de mama MDA-231 reduciría la metástasis al disminuir su actividad invasiva [121]. En este trabajo, se halló que Sparc no se expresa en el tejido mamario normal, mientras que sí se expresa en el tejido tumoral mamario. Estos resultados, coincidentes con el trabajo de Watkins et al [122] que reportó mayores niveles de transcripto de Sparc en tejido tumoral mamario en comparación con el tejido mamario normal, sugieren que la expresión de Sparc está relacionada con la carcinogénesis mamaria. Por otra parte, los resultados obtenidos no son concluyentes en cuanto al efecto que podría tener Maitake en la expresión de Sparc, puesto que el nivel de expresión de Sparc es variable en los tumores de ratones tratados con Maitake Standard o Pro4X.

Otro gen cuya expresión estudiamos en los tejidos mamaros es Pten, un gen supresor de tumores que regula negativamente la vía oncogénica de fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt. La expresión reducida de PTEN se ha asociado a un fenotipo de cáncer de mama agresivo, con metástasis y con pobre pronóstico [93, 94]. Además, la expresión de PTEN se ha correlacionado negativamente con el tamaño y estadio tumorales, y la expresión de ER y PR [123]. In vitro, el “knockdown” de PTEN en células de cáncer de mama MCF-7 promovió la proliferación celular [124]. Contrariamente a los estudios previos, en este trabajo Pten no se expresa en tejido mamario normal, pero sí en los tejidos tumorales.

También se estudió la expresión de Cul3 en los tumores de los animales tratados con Maitake y sin tratar. CUL3 juega un rol importante en la degradación de proteínas por el proteosoma [125]. La pérdida de expresión de CUL3 ha sido detectada en una amplia serie de cánceres humanos de hígado y correlacionada directamente con la des-diferenciación tumoral [96]. Recientemente, su nivel de expresión se ha correlacionado con el estadio tumoral en tejidos mamaros [125]. La proteína se ha detectado en altos niveles en carcinomas invasivos, mientras que no se detecta en las lesiones tempranas; y su expresión se ha visto aumentada en la progresión de carcinoma ductal in situ a carcinomas invasivos [125]. Asimismo, CUL3 se ha visto involucrado en la ubiquitinación del “breast cancer metastasis suppressor 1” (BRMS1), que inhibe la metástasis [126]. En este trabajo no se observaron diferencias en la expresión de Cul3 en los tejidos mamaros de los ratones con y sin tumor, ni en los de los animales tratados con Maitake Pro4X y sin tratar; de modo que no se puede asociar su nivel expresión con el proceso tumorigénico.

ABCG2 está involucrada en la resistencia a múltiples drogas de los tumores de mama [97, 98, 127, 128]. Transporta específicamente distintos agentes quimioterapéuticos y está involucrado en el desarrollo de resistencia a múltiples drogas en células cancerosas. Se ha visto aumentada su expresión en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 resistente a Mitoxantrona con respecto a la línea MCF-7 sensible a Mitoxantrona [128]. Los resultados obtenidos indican que Abcg2 no se expresa en tejido mamario normal, pero sí en los tejidos tumorales. Asimismo, no se puede establecer una asociación entre su nivel de expresión y la administración de Maitake.

Finalmente estudiamos la expresión de Igfbp5. Se ha reportado que IGFBP5 previene el crecimiento de células de cáncer de mama humano in vitro e in vivo, causando un arresto del ciclo celular en fase G2/M e inducción de apoptosis asociada al aumento de la expresión del factor pro-apoptótico BAX a nivel de ARNm y disminución de la expresión del anti-apoptótico BCL-2 [95]. Se ha observado también que una reducción en la expresión de IGFBP5 confería resistencia al Tamoxifeno in vitro en células humanas de cáncer de mama MCF7 [129]. Además, la baja expresión de igfbp5 se ha asociado con una menor supervivencia total en pacientes con cáncer de mama luego del tratamiento con Tamoxifeno [129]. Asimismo, se ha reportado que igfbp5 estimula la adhesión mientras que inhibe la migración celular, por lo que podría reducir el potencial metastásico de las células [130]. Por otro lado, el nivel de expresión de Igfbp5 se ha visto up-regulado en tejido de cáncer de mama invasivo y en el tejido normal adyacente [131] y se ha relacionado la expresión de igfbp5 con un pobre pronóstico en pacientes con cáncer de mama [131]. Además se ha reportado que la sobreexpresión de igfbp5 contribuye a la invasividad y progresión tumoral de distintos cánceres [132]. En este trabajo no se observó una diferencia en el nivel de expresión de igfbp5 entre los tejidos mamarios tumorales y normales, por lo que no se puede establecer una relación entre la expresión de dicho gen y el desarrollo de la tumorigénesis. Tampoco se obtuvieron diferencias entre los tumores de los animales tratados y sin tratar con Maitake Pro4X o Standard, por lo cual Maitake no ejercería un efecto sobre la expresión de Igfbp5.

## CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que el tratamiento con la Fracción D de Maitake puede estimular la muerte celular en células tumorales LM3 en cultivo. Este efecto aumenta en función de la dosis y del tiempo de incubación.

Los resultados sugieren además que esta fracción, administrada intraperitonealmente, previene el desarrollo de tumorigénesis mamaria, aumenta la supervivencia y disminuye el proceso de angiogénesis en ratones. Aunque aún falta determinar cuál es la sustancia activa del extracto y el mecanismo molecular por el cual actúa, en el futuro podría ser empleado como agente preventivo de la carcinogénesis mamaria en poblaciones de riesgo.

Por otro lado, los resultados sugieren que la Fracción D de Maitake, administrada a ratones con tumores de mama, aumenta la supervivencia total de los mismos. Es interesante destacar que Maitake no actúa como co-adyuvante de la quimioterapia, aunque podría proteger de sus efectos adversos. Los efectos benéficos de Maitake, de comprobarse, podrían ser de utilidad para el tratamiento de pacientes con cáncer que reciban quimioterapia o radiación.

## REFERENCIAS

1. Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, *The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality*. Breast Cancer Res, 2004. 6(6): p. 229-39.
2. Vieira, S.C., et al., *Oncologia Básica*. 1ª ed. 2012: Fundação Quixote.

3. Alonso, E.N., et al., *Primer estudio molecular y análisis de polimorfismos en gen BRCA 1 en pacientes con cáncer de mama en Argentina, in Congreso de la Asociación Latinoamericana de Genética (ALAG) 2010: Viña del mar, Chile.*
4. Simpson, J.F., et al., *Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. J Clin Oncol, 2000. 18(10): p. 2059-69.*
5. *Breast cancer treatment - An overview from the US National Cancer Institute (NCI) - Patient version.*
6. Scully, O.J., et al., *Breast cancer metastasis. Cancer Genomics Proteomics, 2012. 9(5): p. 311-20.*
7. Nicolini, A., et al., *Metastatic breast cancer: an updating. Biomed Pharmacother, 2006. 60(9): p. 548-56.*
8. Ingle, J.N., *Pharmacogenomics of endocrine therapy in breast cancer. J Hum Genet, 2013.*
9. Lohmann, A.E. and S. Chia, *Patients with metastatic breast cancer using bevacizumab as a treatment: is there still a role for it? Curr Treat Options Oncol, 2012. 13(2): p. 249-62.*
10. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(5): p. 391-400.*
11. Hlavac, V., et al., *The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. Pharmacogenomics, 2013. 14(5): p. 515-29.*
12. Lanore, D. and C. Delprat, *Quimioterapia anticancerosa. 2004, Barcelona: Masson.*
13. Skeel, R.T. and S.N. Khleif, *Handbook of cancer chemotherapy. 8 ed. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.*
14. Dy, G.K. and A.A. Adjei, *Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. CA Cancer J Clin, 2013. 63(4): p. 249-79.*
15. Zhang, M., et al., *Chinese medicinal herbs to treat the side-effects of chemotherapy in breast cancer patients. Cochrane Database Syst Rev, 2007(2): p. CD004921.*
16. Partridge, A.H., H.J. Burstein, and E.P. Winer, *Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. J Natl Cancer Inst Monogr, 2001(30): p. 135-42.*
17. Aubeil-Sadron, G. and D. Londos-Gagliardi, *Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. Biochimie, 1984. 66(5): p. 333-52.*
18. Arcamone, F., et al., *Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peuceetius var. caesius. Biotechnol Bioeng, 1969. 11(6): p. 1101-10.*
19. Hilmer, S.N., et al., *The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. Drug Metab Dispos, 2004. 32(8): p. 794-9.*
20. Bodley, A., et al., *DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. Cancer Res, 1989. 49(21): p. 5969-78.*
21. Li, F., et al., *MALE AND FEMALE FERTILITY PRESERVATION. Human Reproduction, 2012. 27 (suppl 2): p. ii248-ii261.*
22. Balogh, G.A., D.J. Obiol, and E.N. Alonso, *Maitake-Fraction D y sus efectos terapéuticos en cáncer de mama. 2012: Editorial Académica Española.*
23. Singal, P.K. and N. Iliskovic, *Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. New England Journal of Medicine, 1998. 339(13): p. 900-905.*
24. Chen, Z.C., L.J. Chen, and J.T. Cheng, *Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity Is Mediated by Lowering of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta Expression in Rats. PPAR Res, 2013. 2013: p. 456042.*
25. Moura, L.R., et al., *Extrato hidroalcoólico da casca do pequi (Caryocar brasiliense) em ratos submetidos à aplicação de doxorubicina. Ciência Rural, 2013. 43: p. 100-106.*
26. Ahmed, A.R. and S.M. Hombal, *Cyclophosphamide (Cytosan). A review on relevant pharmacology and clinical uses. J Am Acad Dermatol, 1984. 11(6): p. 1115-26.*
27. Anderson, D., et al., *Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutat Res, 1995. 330(1-2): p. 115-81.*
28. Illana-Esteban, C., *El hongo maitake (Grifola frondosa) y su potencial terapéutico. Revista Iberoamericana de Micología, 2008. 25(3): p. 141-144.*
29. Lull, C., H.J. Wichers, and H.F.J. Savelkoul, *Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. Mediators of Inflammation, 2005. 2005(2): p. 63-80.*
30. Brizuela, M.A.G., L.; Pérez, L.; Mansur, M., *Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista iberoamericana de micología, 1998 15(2): p. 69-74.*
31. Soumya Chatterjee, G.B., Saikat Kumar Basu and Krishnendu Acharya, *Antineoplastic effect of*

- mushrooms: a review*. AJCS 2011. **5**(7): p. 904-911
32. Moretti, A., et al., *Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety*. Int J Food Microbiol, 2013.
  33. Calvo, A.M., et al., *Relationship between secondary metabolism and fungal development*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(3): p. 447-59, table of contents.
  34. George, P. and N. Hegde, *Muscarinic toxicity among family members after consumption of mushrooms*. Toxicol Int, 2013. **20**(1): p. 113-5.
  35. Saviuc, P. and V. Danel, *New syndromes in mushroom poisoning*. Toxicol Rev, 2006. **25**(3): p. 199-209.
  36. Demir, G., et al., *Beta glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(1): p. 113-6.
  37. Brown, G.D., et al., *Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans*. J Exp Med, 2003. **197**(9): p. 1119-24.
  38. Deng, G., et al., *A phase I/II trial of a polysaccharide extract from Grifola frondosa (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(9): p. 1215-21.
  39. Chan, G.C., W.K. Chan, and D.M. Sze, *The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells*. J Hematol Oncol, 2009. **2**: p. 25.
  40. Hishida, I., H. Nanba, and H. Kuroda, *Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of Grifola frondosa (maitake)*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1988. **36**(5): p. 1819-27.
  41. Mayell, M., *Maitake extracts and their therapeutic potential*. Altern Med Rev, 2001. **6**(1): p. 48-60.
  42. Zhuang, C. and S.P. Wasser, *Medicinal Value of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom <i>Grifola frondosa</i> (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetideae)*. Review. 2004. **6**(4): p. 28.
  43. Mizuno, T. and C. Zhuang, *Maitake, Grifola frondosa: Pharmacological effects*. Food Reviews International, 1995. **11**(1): p. 135-149.
  44. Wasser, S.P. and A.L. Weis, *Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective*. Crit Rev Immunol, 1999. **19**(1): p. 65-96.
  45. Zhuang, C. and T. Mizuno, *Biological Responses from<i> Grifola frondosa</i> (Dick.: Fr.) S. F. Gray<minus>Maitake (Aphyllophoromycetideae)*. 1999. **1**(4): p. 317-324.
  46. H., N., *El hongo Maitake, potente anticancerígeno y adaptógeno*. Natura Medicatrix, 1996. **43**: p. 1-4.
  47. Gu, C.Q., J. Li, and F.H. Chao, *Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from Grifola frondosa: synergistic effect of combination with interferon-alpha in HepG2 2.2.15*. Antiviral Res, 2006. **72**(2): p. 162-5.
  48. Preuss, H.G., et al., *Maitake mushroom extracts ameliorate progressive hypertension and other chronic metabolic perturbations in aging female rats*. Int J Med Sci, 2010. **7**(4): p. 169-80.
  49. Kodama, N., et al., *Effects of D-Fraction, a polysaccharide from Grifola frondosa on tumor growth involve activation of NK cells*. Biol Pharm Bull, 2002. **25**(12): p. 1647-50.
  50. Nanba, H., *Maitake D-fraction: Healing and Preventive Potential for Cancer*. The Journal of Orthomolecular Medicine, 1997. **12**: p. 43-49.
  51. Kodama, N., K. Komuta, and H. Nanba, *Effect of Maitake (Grifola frondosa) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients*. J Med Food, 2003. **6**(4): p. 371-7.
  52. Fullerton, S.A., et al., *Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide)*. Mol Urol, 2000. **4**(1): p. 7-13.
  53. Shomori, K., et al., *Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (Grifola frondosa) on human gastric cancer cell lines*. Oncol Rep, 2009. **22**(3): p. 615-20.
  54. Alexander, B., et al., *Induction of Cell Death in Renal Cell Carcinoma With Combination of D-Fraction and Vitamin C*. Integr Cancer Ther, 2013.
  55. Soares, R., et al., *Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation*. J Med Food, 2011. **14**(6): p. 563-72.
  56. Wu, S.J., et al., *Immunomodulatory activities of medicinal mushroom Grifola frondosa extract and its bioactive constituent*. Am J Chin Med, 2013. **41**(1): p. 131-44.
  57. Kodama, N., K. Komuta, and H. Nanba, *Can maitake MD-fraction aid cancer patients?* Altern Med Rev, 2002. **7**(3): p. 236-9.
  58. Harnack, U., et al., *Oral administration of a soluble 1-3, 1-6 beta-glucan during prophylactic survivin peptide vaccination diminishes growth of a B cell lymphoma in mice*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(11): p. 1298-303.
  59. Masuda, Y., et al., *Soluble beta-glucan from Grifola frondosa induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(4):

- p. 547-56.
60. Lull, C., H.J. Wichers, and H.F. Savelkoul, *Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites*. Mediators Inflamm, 2005. **2005**(2): p. 63-80.
  61. Kodama, N., M. Yamada, and H. Nanba, *Addition of Maitake D-fraction reduces the effective dosage of vancomycin for the treatment of Listeria-infected mice*. Jpn J Pharmacol, 2001. **87**(4): p. 327-32.
  62. Borchers, A.T., et al., *The immunobiology of mushrooms*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(3): p. 259-76.
  63. Kurashige, S., Y. Akuzawa, and F. Endo, *Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N-butanolnitrosoamine*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1997. **19**(2): p. 175-83.
  64. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Inmunología celular y molecular*. 6 ed.: Elsevier Science Publishers
  65. Kodama, N., et al., *Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa**. Oncol Rep, 2005. **13**(3): p. 497-502.
  66. Masuda, Y., et al., *Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(6): p. 1104-8.
  67. Svagelj, M., et al., *Immunomodulating activities of cultivated maitake medicinal mushroom *grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (higher basidiomycetes) on peripheral Blood Mononuclear Cells*. Int J Med Mushrooms, 2012. **14**(4): p. 377-83.
  68. Black, W., *Several apparent errors surfaced on reading the article in the June 2002 issue of Alternative Medicine Review by Kodama et al. entitled "Can maitake MD-fraction aid cancer patients"?* Altern Med Rev, 2002. **7**(6): p. 451; author reply 452-4.
  69. Inoue, A., N. Kodama, and H. Nanba, *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): p. 536-40.
  70. Kodama, N., N. Harada, and H. Nanba, *A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice*. Jpn J Pharmacol, 2002. **90**(4): p. 357-60.
  71. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 423-74.
  72. Rodriguez-Galan, M.C., et al., *Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2796-804.
  73. Masuda, Y., et al., *Oral administration of soluble beta-glucans extracted from *Grifola frondosa* induces systemic antitumor immune response and decreases immunosuppression in tumor-bearing mice*. Int J Cancer, 2013. **133**(1): p. 108-19.
  74. Konno, S., *Maitake D-Fraction: Apoptosis Inducer and Immune Enhancer*. Alternative and Complementary Therapies, 2001. **7**(2): p. 102-107.
  75. Matsui, K., N. Kodama, and H. Nanba, *Effects of maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the carcinoma angiogenesis*. Cancer Lett, 2001. **172**(2): p. 193-8.
  76. Dimberg, A., *Chemokines in angiogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **341**: p. 59-80.
  77. Keeley, E.C., B. Mehrad, and R.M. Strieter, *CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases*. Adv Cancer Res, 2010. **106**: p. 91-111.
  78. De Bock, K., S. Cauwenberghs, and P. Carmeliet, *Vessel abnormalization: another hallmark of cancer?: Molecular mechanisms and therapeutic implications*. Current Opinion in Genetics & Development, 2011. **21**(1): p. 73-79.
  79. Lee, J.S., et al., **Grifola frondosa* (maitake mushroom) water extract inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis through inhibition of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation*. J Med Food, 2008. **11**(4): p. 643-51.
  80. Nanba, H., *Activity of maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **768**: p. 243-5.
  81. Lin, H., et al., *Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(1): p. 91-9.
  82. Kodama, N., et al., *Maitake D-Fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumor-bearing mice*. Nutrition, 2005. **21**(5): p. 624-9.
  83. Masuda, Y., et al., *Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(5): p. 620-6.
  84. Alonso, E.N., et al., *Genes Related to Suppression of Malignant Phenotype Induced by Maitake*

- D-Fraction in Breast Cancer Cells*. Journal of Medicinal Food, 2013. **16**(7).
85. Brekken, R.A., et al., *Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM*. J Clin Invest, 2003. **111**(4): p. 487-95.
  86. Puolakkainen, P.A., et al., *Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(4): p. 215-24.
  87. Motamed, K. and E.H. Sage, *SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway*. J Cell Biochem, 1998. **70**(4): p. 543-52.
  88. Yiu, G.K., et al., *SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells*. Am J Pathol, 2001. **159**(2): p. 609-22.
  89. Tai, I.T., et al., *Genome-wide expression analysis of therapy-resistant tumors reveals SPARC as a novel target for cancer therapy*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1492-502.
  90. Tang, M.J. and I.T. Tai, *A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34457-67.
  91. Funk, S.E. and E.H. Sage, *The Ca2(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2648-52.
  92. Alonso, E.N., et al., *Genes related to suppression of malignant phenotype induced by Maitake D-Fraction in breast cancer cells*. J Med Food, 2013. **16**(7): p. 602-17.
  93. Georgescu, M.M., *PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control*. Genes Cancer, 2010. **1**(12): p. 1170-7.
  94. Heikkinen, T., et al., *Variants on the promoter region of PTEN affect breast cancer progression and patient survival*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. R130.
  95. Butt, A.J., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29676-85.
  96. Kossatz, U., et al., *The cyclin E regulator cullin 3 prevents mouse hepatic progenitor cells from becoming tumor-initiating cells*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3820-33.
  97. Robey, R.W., et al., *ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(1): p. 39-57.
  98. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15665-70.
  99. Carnevale, R.P., et al., *Progesterone effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(6): p. 1335-58.
  100. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 2011: Wiley.
  101. Frei, M., *Cell Viability and Proliferation*, in *BioFiles v 6 n 5*. p. 17-21.
  102. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. 2011: The National Academies Press.
  103. *Paraffin Processing of Tissue*. July 5, 2012; Available from: <http://protocolsonline.com/histology/sample-preparation/paraffin-processing-of-tissue/>.
  104. Costa, R., et al., *Xanthohumol modulates inflammation, oxidative stress, and angiogenesis in type 1 diabetic rat skin wound healing*. J Nat Prod, 2013. **76**(11): p. 2047-53.
  105. Alonso, E. and G.A. Balogh. *Genomic changes induced by Maitake D-fraction in the suppression of breast cancer phenotype*. in *18th international Congress of International Society of Mushroom Science*. May 2012. ISMS, China.
  106. Simms, D., *TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA*. Focus, 1993. **15**(4): p. 99.
  107. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1982: Cold Spring Harbor Laboratory.
  108. Benavides, A., et al., *Adrenal medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture*. Neuroscience, 2004. **128**(1): p. 99-109.
  109. Soares, R., et al., *Apoptosis and cell-death induction in breast cancer epithelial cells induced by beta glucans compound*. Journal of Medicinal Food, 2011. **20** (2): p. 1-10.
  110. Pardo Andreu, G., P. Hernández Casaña, and R. Delgado Hernández, *La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores*. Revista Cubana de Medicina, 2005. **44**: p. 0-0.
  111. Nanba, H. and K. Kubo, *Effect of Maitake D-Fraction on Cancer Prevention*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1997. **833**(1): p. 204-207.
  112. Masuda, Y., et al., *Inhibitory Effect of MD-Fraction on Tumor Metastasis: Involvement of NK Cell*

- Activation and Suppression of Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 Expression in Lung Vascular Endothelial Cells.* Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008. **31**(6): p. 1104-1108.
113. Baselga, J., et al., *Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies.* J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(16): p. 1327-33.
  114. Ottewell, P.D., et al., *Antitumor Effects of Doxorubicin Followed by Zoledronic Acid in a Mouse Model of Breast Cancer.* Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**(16): p. 1167-1178.
  115. Riwanto, I., et al., *Effect of phaleria macrocarpa supplementation on apoptosis and tumor growth of C3H mice with breast cancer under treatment with adriamycin-cyclophosphamide.* Int Surg, 2011. **96**(2): p. 164-70.
  116. Azim, H.A., Jr., et al., *Association between SPARC mRNA expression, prognosis and response to neoadjuvant chemotherapy in early breast cancer: a pooled in-silico analysis.* PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62451.
  117. Hsiao, Y.H., et al., *SPARC (osteonectin) in breast tumors of different histologic types and its role in the outcome of invasive ductal carcinoma.* Breast J, 2010. **16**(3): p. 305-8.
  118. Witkiewicz, A.K., et al., *Stromal CD10 and SPARC expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) patients predicts disease recurrence.* Cancer Biol Ther, 2010. **10**(4): p. 391-6.
  119. Nagai, M.A., et al., *Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 2011. **126**(1): p. 1-14.
  120. Wang, C., et al., *A combined approach identifies three mRNAs that are down-regulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF-7.* J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(12): p. 2127-36.
  121. Koblinski, J.E., et al., *Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis.* Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7370-7.
  122. Watkins, G., et al., *Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **72**(4): p. 267-72.
  123. Zhang, H.Y., et al., *Mutation, methylation and expression in breast cancer patients.* Oncol Lett, 2013. **6**(1): p. 161-168.
  124. Yang, C., et al., *PTEN suppresses the oncogenic function of AIB1 through decreasing its protein stability via mechanism involving Fbw7 alpha.* Mol Cancer, 2013. **12**: p. 21.
  125. Haagenson, K.K., et al., *Cullin-3 protein expression levels correlate with breast cancer progression.* Cancer Biol Ther, 2012. **13**(11): p. 1042-6.
  126. Kim, B., et al., *Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(4): p. 720-6.
  127. Jiao, X., et al., *MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).* Breast Cancer Res Treat, 2013. **139**(3): p. 717-30.
  128. Ma, M.T., et al., *MiR-487a resensitizes mitoxantrone (MX)-resistant breast cancer cells (MCF-7/MX) to MX by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).* Cancer Lett, 2013. **339**(1): p. 107-15.
  129. Ahn, B.Y., et al., *Genetic screen identifies insulin-like growth factor binding protein 5 as a modulator of tamoxifen resistance in breast cancer.* Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3013-9.
  130. Sureshbabu, A., et al., *IGFBP5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 7): p. 1693-705.
  131. Becker, M.A., et al., *IGFBP ratio confers resistance to IGF targeting and correlates with increased invasion and poor outcome in breast tumors.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1808-17.
  132. Wang, H., et al., *IGFBP2 and IGFBP5 overexpression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas.* Breast J, 2008. **14**(3): p. 261-7.

