

---

# Determinación de la capacidad anticancerígena de extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

---

María Elena Pérez Ruiz





UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



Determinación de la capacidad anticancerígena de extractos  
de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

Trabajo de graduación presentado por María Elena Pérez Ruiz para  
optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería




Determinación de la capacidad anticancerígena de extractos  
de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

Trabajo de graduación presentado por María Elena Pérez Ruiz para  
optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica


Guatemala,


2024


Vo.Bo.:

(f)   
M. Sc. Carlos Esquit

Tribunal Examinador:

(f)   
M.Sc. Carlos Esquit

(f)   
Dr. Luis Alberto Rivera Estrada

(f)   
Ing. Kurt Emmanuel Kellner

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de febrero de 2025.

A lo largo de mi vida, la ciencia ha sido fundamental. Desde niña, desarrollé una fascinación por el cuerpo humano y su complejidad, intrigada por cómo cada sistema trabaja de manera precisa para mantenernos vivos, a través de reacciones químicas, mecanismos biológicos y señales específicas. Definir mi propósito no fue fácil, pero dos experiencias marcaron profundamente mi camino: la pérdida de mi mejor amigo a los 13 años y la de mi tía a los 21, ambas a causa del cáncer. Estas vivencias me impulsaron a buscar respuestas para entender mejor esta enfermedad y, quizás, contribuir a encontrar soluciones. Creo firmemente que muchas respuestas a las enfermedades se encuentran en la naturaleza o en los procesos internos de nuestro propio cuerpo. Solo necesitamos observar, comprender y valorar la maravillosa creación que somos.

Debo aceptar que el tema que escogí para mi investigación ha puesto a prueba todas las habilidades y conocimientos adquiridos durante mi formación universitaria. Sin embargo, he tenido la bendición de contar con personas que, como instrumentos de Dios, me han guiado y corregido, permitiendo que mi trabajo no solo sea valioso, sino que también dé los frutos esperados.

La vida universitaria no ha sido fácil, pero en cada paso del camino he sentido la mano de Dios sosteniéndome, consolándome, guiándome y capacitándome. Nunca me he sentido sola en este proceso, porque Él siempre ha estado conmigo, y eso es algo por lo que estaré eternamente agradecida. Además, reconozco la ayuda invaluable de mi familia, quienes creyeron en mí incluso antes de que yo misma lo hiciera y apostaron por mí cuando nadie más lo hacía.

Agradezco profundamente a mi papá, que sacrificó su tiempo para darme la oportunidad de recibir una buena educación y desarrollarme como profesional. A mi mamá, quien me cuidó día y noche cuando fue necesario, respaldó mi carrera con sus oraciones y, en mis momentos de frustración, estuvo ahí para recoger mis lágrimas. A mis dos hermanos, quienes han sido un ejemplo para mi vida y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme a entender cuando me sentía estancada. A mis abuelitas, que nunca se cansaron de escucharme y me recordaron que soy capaz cuando dudaba de mí misma. También a mis primos, primas, tíos y tías, quienes siempre me hicieron reír y me brindaron su apoyo incondicional.

Para mi alegría, Dios no solo me bendijo con mi familia, sino también con amigos maravillosos, quienes me han acompañado y motivado en este arduo camino. Quiero destacar a Hellen, Estefany, Mónica, Shagty, Brittany, Renné, Valery, Marlon, Brandon, Saby, Melanie, Juan, Pablo, Sofía, Rocío, Kenneth, Josué, Romeo, Karla, Carlos, Carmen, Kerstin, Andrea, Josseline, Mariana, Ángela, Lucky, Padre Juan Carlos, Padre Ángel, Padre Peter, Padre Daniel, Wendy, Michy, Kathy, Jairo, Oliver, Juan Pablo, Jaqui, Lidia, Nahomy y Claudia. Su amistad ha sido un regalo invaluable.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud a la Universidad del Valle de Guatemala, que me ha brindado las herramientas, habilidades y conocimientos necesarios para desarrollarme como profesional en el campo de la salud desde la Ingeniería Biomédica. También agradezco a mis profesores, quienes con paciencia y dedicación me apoyaron, corrigieron y motivaron: Kristzina Ríos, Christa Contreras, Marie Cosenza, Luis Rivera, Miguel Zea, Diego Archila, Patrizia Lupo y Miguel Morales. Su amor por lo que hacen me inspira a ser mejor.

No puedo dejar de agradecer a los departamentos de Biología, Bioquímica, Química y CEAA, por su asesoramiento, apoyo con materiales y acompañamiento a lo largo de este proceso. Su ayuda fue esencial para la realización de este trabajo, y les estaré siempre agradecida.

Quiero concluir con una cita que ha sido guía e inspiración en este camino: ¡Sí puedes...!, respondió Jesús. «Todo es posible para el que cree» (Marcos 9,23).

<b>Prefacio</b>	<b>IV</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>IX</b>
<b>Resumen</b>	<b>X</b>
<b>Abstract</b>	<b>XI</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>5</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>7</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	7
4.2. Objetivos específicos . . . . .	7
<b>5. Alcance</b>	<b>8</b>
<b>6. Marco teórico</b>	<b>9</b>
6.1. Cáncer . . . . .	9
6.1.1. Tipos de tratamiento . . . . .	11
6.2. Hongos . . . . .	12
6.2.1. <i>Agaricus bisporus</i> . . . . .	13
6.2.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	14
6.3. Extracción de extracto . . . . .	14
6.4. Expresión génica . . . . .	15
6.4.1. ARN . . . . .	17
6.4.2. Retrotranscripción . . . . .	18
6.4.3. RT-PCR . . . . .	19
6.4.4. <i>Primers</i> . . . . .	19

6.5.	Apoptosis . . . . .	19
6.5.1.	Proteínas reguladoras de la apoptosis . . . . .	20
<b>7.</b>	<b>Metodología</b>	<b>21</b>
7.1.	Obtención de los extractos de <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	21
7.1.1.	Filtrado y evaporación del solvente . . . . .	21
7.1.2.	Liofilización del extracto obtenido . . . . .	22
7.1.3.	Resuspensión de extracto en medio de cultivo . . . . .	22
7.2.	Preparación de muestras biológicas – cultivo celular . . . . .	23
7.2.1.	Descongelación de líneas celulares y pasaje . . . . .	23
7.2.2.	Viabilidad celular y citotoxicidad . . . . .	24
7.3.	Extracción de ARN y síntesis de cADN . . . . .	24
7.3.1.	Extracción de ARN . . . . .	24
7.3.2.	Síntesis y diluciones de ADN complementario (cADN) . . . . .	25
7.4.	PCR Convencional y qPCR . . . . .	25
7.4.1.	Selección de genes de interés . . . . .	25
7.4.2.	PCR convencional . . . . .	26
7.4.3.	QPCR . . . . .	26
7.5.	Análisis de citotoxicidad de extracto mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) . . . . .	27
7.5.1.	Ensayo MTT . . . . .	27
<b>8.</b>	<b>Resultados</b>	<b>28</b>
8.1.	Obtención de extractos etanólicos de hongos . . . . .	28
8.2.	Cultivos celulares de células LAN-1, UFH-001 y CHO expuestas a extractos de <i>Agaricus bisporus</i> . . . . .	28
8.3.	Cultivos celulares de células LAN-1, UFH-001 y CHO expuestas a extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	30
8.4.	Concentraciones de ARN obtenidas luego de 24 y 48 horas de exposición para cultivos celulares . . . . .	33
8.5.	Concentraciones de cADN obtenidas luego de 24 y 48 horas de exposición para cultivos celulares . . . . .	34
8.6.	Amplificación génica de genes mediante un PCR convencional . . . . .	35
8.7.	Cuantificación génica de genes de interés mediante qPCR . . . . .	39
8.8.	Evaluación de citotoxicidad mediante ensayo MTT . . . . .	41
8.9.	Regresión lineal entre la viabilidad celular obtenida en el conteo vs la viabilidad obtenida en el ensayo MTT . . . . .	42
<b>9.</b>	<b>Discusión</b>	<b>44</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>11.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>51</b>
<b>12.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>

---

## Lista de figuras

---

1.	Características biológicas propuestas para el cáncer [27] . . . . .	10
2.	ADN y sus bloques de construcción [45] . . . . .	16
3.	Estructura química del ARN [26] . . . . .	17
4.	Dogma central de la biología molecular [26] . . . . .	18
5.	Apoptosis celular [54] . . . . .	20
6.	Resultados obtenidos para LAN-1 exposición con <i>Agaricus Bisporus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas . . . . .	29
7.	Resultados obtenidos para UFH-001 exposición con <i>Agaricus Bisporus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas . . . . .	30
8.	Resultados obtenidos para CHO exposición con <i>Agaricus Bisporus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas . . . . .	31
9.	Resultados obtenidos para LAN-1 exposición con <i>Pleurotus Ostreatus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas . . . . .	31
10.	Resultados obtenidos para UFH-001 exposición con <i>Pleurotus Ostreatus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas . . . . .	32
11.	Resultados obtenidos para CHO exposición con <i>Pleurotus Ostreatus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas . . . . .	33
12.	Expresión del gen PUMA tras la exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes concentraciones y tiempos . . . . .	36
13.	Expresión del gen PUMA en la línea celular UFH-001 tras la exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes concentraciones y tiempos . . . . .	36
14.	Expresión del gen PUMA en la línea celular LAN-1 tras la exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes concentraciones y tiempos . . . . .	37
15.	Expresión del gen BAX tras la exposición con <i>Agaricus bisporus</i> a diferentes concentraciones y tiempos . . . . .	38
16.	Sobreexpresión del gen BAX tras la exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes concentraciones y tiempos . . . . .	38
17.	Expresión del gen en la línea celular LAN-1 tras la exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> a diferentes concentraciones y tiempos . . . . .	39
18.	A. Expresión génica de BAX . . . . .	40

19.	A. Expresión génica de PUMA para <i>Agaricus bisporus</i> para 24 horas. B. Expresión génica de PUMA para <i>Pleurotus ostreatus</i> , para 24 horas. C. Expresión génica de PUMA para <i>Agaricus bisporus</i> para 48 horas. D. Expresión génica de PUMA para <i>Pleurotus ostreatus</i> , para 48 horas. . . . .	41
20.	Resultados obtenidos para MTT exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas. A. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con <i>Agaricus bisporus</i> a 24 horas. B. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con <i>Pleurotus ostreatus</i> a 24 horas. C. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con <i>Agaricus bisporus</i> a 48 horas. D. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con <i>Pleurotus ostreatus</i> a 48 horas . . . . .	42
21.	Resultados obtenidos para la dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> , bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas. A. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con <i>Agaricus bisporus</i> para 24 horas. B. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con <i>Pleurotus ostreatus</i> para 24 horas. C. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con <i>Agaricus bisporus</i> para 48 horas. D. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con <i>Pleurotus ostreatus</i> para 48 horas . . . . .	43

---

## Lista de cuadros

---

1.	Secuencias de <i>primers</i> utilizados para la amplificación de GAPDH, PUMA y BAX. . . . .	26
2.	Rendimiento de la preparación del extracto a partir de hongos secos . . . . .	28
3.	% Viabilidad celular de tres líneas celulares para <i>Agaricus bisporus</i> . . . . .	30
4.	% Viabilidad celular de tres líneas celulares para <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	33
5.	Concentración de ARN para <i>Agaricus bisporus</i> . . . . .	34
6.	Concentración de ARN para <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	34
7.	Concentración de cADN para <i>Agaricus bisporus</i> . . . . .	35
8.	Concentración de cADN para <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	35

El cáncer es una enfermedad genética caracterizada por la multiplicación incontrolada de células que invaden tejidos cercanos. Aunque tratamientos como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son efectivos, también dañan células sanas, causando severos efectos secundarios. Esto ha impulsado la búsqueda de terapias alternativas, como el uso de hongos, que han demostrado propiedades anticancerígenas y antitumorales. En este estudio, se evaluó la capacidad anticancerígena de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, obtenidos mediante maceración en etanol al 95 %. Se analizaron sus efectos con pruebas de morfología celular, ensayo MTT y PCR en tiempo real (RT-PCR). Los resultados de las pruebas morfológicas mostraron cambios significativos en la estructura celular, como muerte celular e inhibición del crecimiento. En el ensayo MTT, *Pleurotus ostreatus* tuvo mejor desempeño a las 24 horas, mientras que *Agaricus bisporus* fue más eficaz a las 48 horas. La PCR en tiempo real reveló que las líneas celulares LAN-1 y UFH-001 presentaron valores más altos en comparación con CHO, lo que indica una mayor sensibilidad a los extractos. Además, se observó la sobreexpresión de genes relacionados con la apoptosis, confirmando la presencia de los primers de interés en las muestras. Estos hallazgos sugieren que los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* poseen propiedades anticancerígenas prometedoras, capaces de inducir cambios morfológicos, inhibir el crecimiento celular y regular la expresión génica, abriendo posibilidades para terapias complementarias más seguras y efectivas.

Cancer is a genetic disease characterized by the uncontrolled multiplication of cells that invade nearby tissues. Although treatments such as surgery, chemotherapy, and radiotherapy are effective, they also damage healthy cells, causing severe side effects. This has prompted the search for alternative therapies, such as the use of fungi, which have demonstrated anticancer and antitumor properties. In this study, the anticancer capacity of extracts of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*, obtained by maceration in 95% ethanol, was evaluated. Their effects were analyzed with cell morphology tests, MTT assay, and real-time PCR (RT-PCR). The results of the morphology tests showed significant changes in cell structure, such as cell death and growth inhibition. In the MTT assay, *Pleurotus ostreatus* performed better at 24 hours, while *Agaricus bisporus* was more effective at 48 hours. Real-time PCR revealed that LAN-1 and UFH-001 cell lines had higher values compared to CHO, indicating higher sensitivity to the extracts. In addition, overexpression of apoptosis-related genes was observed, confirming the presence of the primers of interest in the samples. These findings suggest that the extracts of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* possess promising anticancer properties.

El cáncer es una enfermedad genética que provoca que las células se multipliquen sin control, invadiendo tejidos cercanos. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, en el continente americano, el cáncer es la segunda causa de muerte. Se prevé que en las próximas dos décadas el cáncer aumentará en un 60% , afectando significativamente los sistemas de salud, las personas y las comunidades, con un mayor impacto en los países de ingresos bajos y medianos. En particular, se espera que en el continente americano el número de personas diagnosticadas con cáncer aumente en un 55% [1].

Actualmente, los tratamientos comunes para el cáncer incluyen cirugía, quimioterapia y radioterapia. Aunque estos tratamientos son efectivos, también pueden causar daños significativos al cuerpo y provocar severos efectos secundarios. Por ejemplo, tanto la radioterapia como la quimioterapia atacan no sólo a las células tumorales, sino también a las células sanas circundantes. Debido a esta alta incidencia de efectos adversos, se han comenzado a explorar tratamientos alternativos o complementarios, entre ellos el uso de hongos, que han demostrado propiedades anticancerígenas y antitumorales.

Esta investigación se centra en estudiar las propiedades anticancerígenas de los hongos, específicamente de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. Para ello, se empleó una metodología de extracción por maceración en etanol al 95% para obtener los extractos de estos hongos. Posteriormente, se realizaron pruebas de morfología celular, y se evaluó su citotoxicidad mediante la prueba MTT en diversas líneas celulares. Finalmente, se analizó la expresión génica de los genes relacionados con la apoptosis celular utilizando PCR en tiempo real (RT-PCR).

Los resultados de las pruebas de morfología celular mostraron cambios significativos en las líneas LAN-1 y UFH-001, incluyendo alteraciones en la estructura celular y una inhibición del crecimiento. En la prueba MTT, *Pleurotus ostreatus* demostró mayor efectividad a las 24 horas, mientras que *Agaricus bisporus* presentó mejores resultados a las 48 horas, respaldando los hallazgos de las pruebas morfológicas. Además, en los análisis de RT-PCR y QPCR, las líneas celulares LAN-1 y UFH-001 mostraron una sobreexpresión de los genes relacionados con la apoptosis en comparación con la línea CHO, lo que confirma la capacidad

de estos extractos para inducir la muerte celular programada.

A continuación, en el capítulo 2, se presentará la justificación de esta investigación, donde se describe su importancia y relevancia. En el capítulo 3, se detallan los objetivos a alcanzar. El capítulo 4 aborda el alcance y las limitaciones identificadas a lo largo del estudio. En el capítulo 5 se incluye un marco teórico para comprender los términos y conceptos clave utilizados, seguido por los capítulos 6 y 7, donde se describen la metodología, los resultados obtenidos y su discusión. Finalmente, en los capítulos 8 y 9, se presentan las conclusiones y recomendaciones para futuras investigaciones relacionadas con este tema, además de las referencias bibliográficas utilizadas.

El cáncer es una enfermedad genética, que provoca que las células se multipliquen sin control, invadiendo tejidos cercanos al área donde se está generando esta sobreproducción. Esto ocurre debido a cambios y daños en los genes encargados de controlar la formación y producción de células, lo que causa errores en el proceso [2]. Aunque el tumor visible sea el resultado final de una serie de cambios, este proceso puede haber tardado muchos años en desarrollarse [3]. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, en América el cáncer es la segunda causa de muerte. En el año 2020, se estimó que 4 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer, de las cuales 1.4 millones fallecieron [1].

A lo largo del tiempo, la ciencia ha buscado mejorar los tratamientos actuales, utilizando nuevas tecnologías e innovaciones que permitan avanzar en la lucha contra el cáncer. A pesar de estos avances, los tratamientos más utilizados, siguen siendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia [4]. En el caso de la cirugía, se extirpa el tumor, pero dependiendo de su ubicación, la dificultad y riesgo varían [5]; en algunos casos, el tumor no es extirpable. Por otro lado, la quimioterapia y la radioterapia pueden matar células cancerígenas, pero también dañan células sanas, lo que deteriora la salud del paciente [6][7]. En respuesta a esto, se ha comenzado a explorar el mundo microscópico, en busca de soluciones a los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer.

Desde la medicina tradicional asiática, los extractos de hongos se han utilizado para tratar diversas enfermedades. Recientemente, se ha investigado la actividad anticancerígena y antitumoral de los hongos, utilizando extractos a base de agua y de etanol. En diversas investigaciones se ha demostrado que los hongos pueden inducir apoptosis celular y la reducción significativa del tamaño de los tumores [8].

Los hongos contienen en su estructura compuestos bioactivos que tienen un efecto medicinal, tales como polisacáridos, terpenos, proteínas y compuesto fenólicos [9]. Entre estos, los polisacáridos, terpenos y proteínas, han demostrado tener actividad anticancerígena y antitumoral [9]. Los polisacáridos pueden unirse a receptores específicos en la pared celular estimulando así la respuesta inmunitaria, previniendo la oncogénesis y siendo especialmente efectivos junto a la quimioterapia [9]. Los terpenos modulan el sistema inmunológico, redu-

cen el crecimiento de las células tumorales y pueden desencadenar apoptosis celular [10][11]. Las proteínas tienen propiedades citotóxicas y anticancerígenas, que actúan como inmunomoduladores [12].

El conocimiento de la capacidad anticancerígena y antitumoral de los hongos ha provocado que se investiguen los metabolitos secundarios y los beneficios que tienen para la salud de las personas. En estas investigaciones se ha encontrado que los extractos de hongos no causan un daño significativo en líneas celulares sanas en contraste con las líneas celulares cancerígenas [13].

Los extractos y metabolitos fúngicos son una fuente prometedora de nuevos agentes anticancerígenos. Sin embargo, se necesita realizar más investigaciones que permitan avanzar en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, en el continente americano, el cáncer es la segunda causa de muerte. En el año 2020 se tiene un estimado de 4 millones de personas diagnosticadas con cáncer de las cuales 1.4 millones fallecieron. A nivel mundial, se prevé que en las próximas dos décadas el cáncer aumentará en un 60 % afectando al sistema de salud, a las personas y comunidades, con un mayor impacto en países de ingresos bajos y medianos. Para el continente americano se espera que el número de personas diagnosticadas con cáncer aumente en un 55 % [1].

Según las estadísticas presentadas en el 2019 por el Instituto Nacional de Estadísticas Guatemala (INE), la tasa de mortalidad por cáncer en 2017 era del 45.7 % [14]. En un estudio más reciente, presentado en la Organización Mundial de la Salud se determinó que en América Latina y el Caribe fallecieron 713,414 personas a causa del cáncer, con una tasa de incidencia estandarizada por edad (ASR) de 86.6 por cada 100,000 personas al año. En Guatemala, el número de personas fallecidas es 9,609, con una tasa de ASR de 70.7 por cada 100,000 personas al año [15].

Aunque los tratamientos actuales para el cáncer son efectivos y permiten tratar la enfermedad según la fase y tipo, estos presentan numerosos efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Entre los efectos secundarios más comunes se dan la neutropenia, linfedema, pérdida de cabellos, náuseas y vómitos, problemas de memoria, dolor, trombosis venosa profunda, cansancio, problemas para comer, quemaduras, depresión y mutagenicidad de células [16].

Debido a la alta incidencia de efectos secundarios en los tratamientos actuales, se ha comenzado a explorar distintos tratamientos alternativos o complementarios, entre ellos el uso de hongos. Los hongos han demostrado tener propiedades medicinales, de las cuales se han logrado obtener medicamentos que se utilizan en la actualidad, como la penicilina y la estatina. Sin embargo, en la actualidad no existe ningún fármaco con base en hongos indicado para el cáncer [17].

A pesar de eso, aunque en la actualidad no existan productos derivados de hongos como

tratamiento al cáncer, se ha ido demostrando que los hongos tienen capacidades anticancerígenas y antitumorales en sus compuestos bioactivos, como lo son los polisacáridos, terpenos y proteínas. Los polisacáridos tienen la capacidad de unirse a receptores específicos en la pared celular, estimulando así la respuesta inmunitaria y previniendo así la oncogénesis, especialmente cuando la combinan con la quimioterapia [9]. Los terpenos, modulan el sistema inmunológico, reducen el crecimiento de las células tumorales y pueden desencadenar apoptosis celular [10][11]. Las proteínas, por su parte, tienen propiedades citotóxicas y anticancerígenas, éstas tienen un efecto inmunomodulador [12].

Los hongos contienen una variedad de moléculas beneficiosas para la salud, como vitaminas, proteínas, polisacáridos, lípidos y minerales, que pueden obtenerse al ingerirlos [18]. Estas propiedades beneficiosas se han observado en diversas especies de hongos provenientes de diferentes ecosistemas, incluidos los marinos, terrestres, endófitos y aquellos cultivados in vitro.[17] [8] [19].

La presencia de estas moléculas en los hongos pueden ayudar a los pacientes con cáncer a recuperar nutrientes esenciales, compensando los efectos secundarios que afectan el apetito y la nutrición, como las náuseas y los vómitos [16]. Los hongos también juegan un papel importante en el sistema inmunológico, estimulando y regulando la respuesta inmunitaria del cuerpo a patógenos [9].

Las características medicinales y nutricionales de los hongos abren nuevas oportunidades de investigación, ofreciendo posibles soluciones a problemas no resueltos y esperanza a las personas que padecen cáncer. Los compuestos bioactivos en los hongos sugieren un potencial significativo para el desarrollo de tratamientos complementarios, de mayor eficacia y menor cantidad de efectos secundarios que los tratamientos convencionales.

### 4.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de las propiedades anticancerígenas de extractos de *Agaricus bisporus* (champiñón) y *Pleurotus ostreatus*(ostra) mediante un estudio *in vitro*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Implementar una metodología de maceración y liofilización que permita obtener los extractos y compuestos de los hongos.
- Evaluar la citotoxicidad de los extractos de hongos en cultivos de células cancerosas (UFH-001 y LAN-1) y no cancerosas (CHO) mediante ensayo MTT.
- Analizar la expresión génica de genes relacionados a la apoptosis (p21 y PUMA) en cultivos de células cancerosas (UFH-001 y LAN-1) y no cancerosas (CHO) mediante una PCR en tiempo real (RT-PCR).

El objetivo principal de este estudio es determinar las propiedades anticancerígenas de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, evaluando su efectividad en la inhibición y muerte celular de células cancerígenas. Para ello, se utilizan diversos métodos, como el análisis de la morfología celular, la prueba de MTT para evaluar la citotoxicidad de los extractos en las líneas celulares LAN-1, UFH-001 y CHO, y el análisis de la expresión génica relacionada con la apoptosis, mediante las técnicas de RT-PCR y qPCR. El estudio se lleva a cabo *in vitro*, en condiciones controladas de laboratorio, lo que permite examinar los efectos de los extractos de los hongos a nivel celular.

Este estudio se centra en tres líneas celulares específicas: LAN-1, UFH-001 y CHO. Se emplean diferentes concentraciones de los extractos y se analizan tanto los efectos sobre la morfología celular como sobre la viabilidad celular, además de observarse los cambios en la expresión de genes clave involucrados en la apoptosis.

Es importante señalar que, aunque los resultados obtenidos aportan información valiosa sobre la actividad anticancerígena de los extractos, el estudio está limitado a un entorno *in vitro*, lo que implica ciertas restricciones. La extrapolación de estos resultados a un organismo completo es compleja, dado que el comportamiento celular puede variar significativamente entre distintas líneas celulares y según las condiciones *in vitro*. Además, las características de cada línea celular pueden influir en los resultados, lo que representa un desafío en términos de reproducibilidad y aplicabilidad de los hallazgos a un contexto más amplio.

Este estudio se limita exclusivamente a las especies *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, por lo que futuras investigaciones deben explorar otros hongos con propiedades anticancerígenas potenciales. Asimismo, se sugiere realizar más pruebas *in vitro* para profundizar en los mecanismos de acción de estos hongos en diferentes tipos de células cancerígenas.

Los resultados obtenidos se presentan en cuadros, gráficos y fotos de la morfología celular, proporcionando una visión clara de los efectos de los extractos sobre la viabilidad y proliferación celular.

## 6.1. Cáncer

El término cáncer se utiliza para describir un grupo de enfermedades que afectan a organismos multicelulares y que pueden manifestarse en cualquiera de los sistemas del cuerpo [20]. Su característica principal es la alta producción de células anormales o mutadas, las cuales se extienden y se propagan a distintos sistemas u órganos adyacentes a través del sistema sanguíneo o linfático, en un proceso conocido como metástasis. Esta proliferación descontrolada de células también puede acumularse en un órgano o tejido específico, dando lugar a una neoplasia maligna o tumor [20][21].

La enfermedad es causada mediante los cambios en los genes, que controlan la producción y multiplicación de las células, se produce una sobreproducción de células genéticamente modificadas diseminando en tejidos aledaños [2][22]. Estas células mutadas se dan mediante la acumulación de mutaciones en el ADN de genes específicos [23]. Los principales genes que pueden sufrir mutaciones son los siguientes: Protooncogenes, genes supresores de tumor o genes supresores, genes vigía o vigilantes [24]. Los protooncogenes que son los encargados de dirigir la producción de las proteínas necesarias para la proliferación y diferenciación celular, al sufrir una mutación ocurre oncogenes, los cuales son causante de una multiplicación desordenada de células [24]. Por otro lado, los genes supresores son los que permiten que exista proliferación celular, al estar ausentes provoca que las células crezcan y proliferen de forma anormal, estos por su parte también tienen a su cargo la apoptosis celular [25]. Finalmente, los genes vigía, mantienen la integridad genómica, esto lo realizan mediante la detección de errores en el material genético y aplican corrección sobre el error, suprimen posibles mutaciones [24].

El cáncer tiene características comunes como ciclos repetidos de mutaciones, competición y selección natural. Además, presenta dos propiedades que lo vuelven altamente peligroso: se producen a pesar de las restricciones normales e invaden y proliferan territorios utilizados por otras células. Esta capacidad de invasión es esencial para las células cancerosas, ya que de esta forma pueden liberarse en el torrente sanguíneo o vasos linfáticos para producir tumores

o metástasis. Para la formación de un tumor la célula mutada debe heredar la anomalía [26].

Las células cancerosas, para sobrevivir, proliferar y diseminarse, poseen capacidades biológicas específicas que les confieren un comportamiento característico. Entre estas destacan la sustentación de señales proliferativas, al generar sus propias señales de crecimiento o alterar las vías de señalización; la evasión de supresores de crecimiento, desactivando genes que frenan el ciclo celular y permitiendo un crecimiento descontrolado; y la resistencia a la apoptosis celular, lograda mediante la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas que evitan la muerte celular programada. Además, presentan inmortalidad replicativa gracias a la activación de la telomerasa, que mantiene la longitud de los telómeros y permite divisiones ilimitadas, y promueven la inducción de la angiogénesis, produciendo factores que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos para garantizar el suministro de oxígeno y nutrientes. También adquieren capacidades de invasión y metástasis, al modificar la adhesión celular y obtener propiedades migratorias que les permiten diseminarse a otros órganos. A esto se suma la inestabilidad genómica, que incrementa mutaciones y fomenta la heterogeneidad tumoral, y la inflamación crónica, que facilita el desarrollo y la progresión de la enfermedad, ambas consideradas características habilitadoras. Finalmente, reprograman su metabolismo energético para generar la energía y biomoléculas necesarias para su crecimiento y logran la evasión de la destrucción inmunitaria mediante ligandos que inhiben la acción de las células T. Estas capacidades interconectadas aseguran la supervivencia, proliferación y diseminación de las células malignas [27]. La Figura 1 presenta las primeras seis características propuestas.

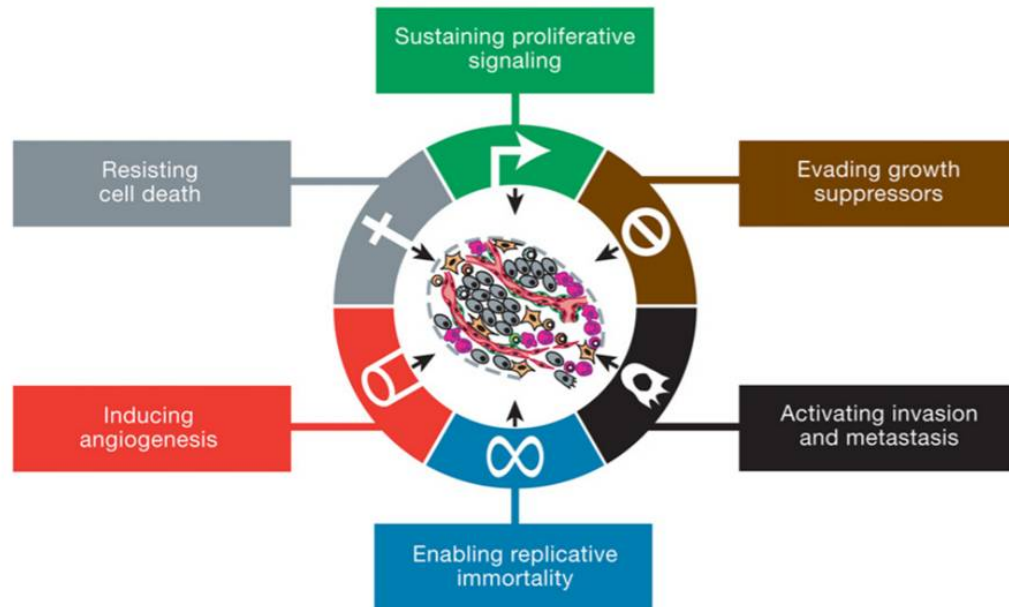


Figura 1: Características biológicas propuestas para el cáncer [27]

Estas capacidades interconectadas aseguran la supervivencia, proliferación y disemina-

ción de las células malignas. La generación del cáncer está directamente relacionada con un cambio en la secuencia del ADN, ya que la anomalía heredada suele originarse en alteraciones genéticas. Distintos tipos de cáncer comparten uno o más defectos en la secuencia del ADN, y este cambio puede ser provocado por carcinógenos químicos que alteran la secuencia de los nucleótidos, radiaciones ionizantes como los rayos X, que causan roturas cromosómicas y translocaciones, o luz ultravioleta, que induce alteraciones en las bases del ADN. Para que el cáncer se desarrolle, se requieren múltiples alteraciones, ya que una sola no es suficiente. Los factores mencionados generan desórdenes leves en el comportamiento celular que pueden evolucionar de manera gradual hasta provocar un cáncer completamente destructivo [26].

### 6.1.1. Tipos de tratamiento

#### Cirugía

La cirugía tiene como fin principal la erradicación de un tumor primario, extirpando el tejido u órgano afectado por cáncer o con una alta probabilidad de desarrollarlo. Este procedimiento se realiza con el fin de prevenir la progresión de la enfermedad y evitar su propagación. Para determinar la necesidad de cirugía, se pueden realizar estudios genéticos que identifiquen los riesgos específicos o llevar a cabo una cirugía diagnóstica, que permite extraer una pequeña muestra del tejido sobre el que se tiene sospecha de cáncer para realizar un estudio [28]. Además de ser un método preventivo en algunos casos, la cirugía permite que se pueda realizar una resección precisa del tumor, minimizando la posibilidad de diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo [29][28]. Previo a realizar la cirugía es necesario realizar una evaluación preparatoria que permita conocer el estado del paciente [29].

#### Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer que utiliza medicamentos para destruir las células cancerígenas hasta que no sean detectables. Este tratamiento busca detener el crecimiento de las células malignas, controlar la enfermedad y aliviar algunos de los síntomas que provoca. Sin embargo, uno de sus efectos secundarios es el daño a las células sanas [30]. El objetivo principal de la quimioterapia es inhibir la proliferación celular para evitar la metástasis, lo cual se logra afectando la síntesis de ADN, ARN o proteínas. Esta interferencia induce la apoptosis celular, observándose mayor eficacia de los fármacos durante la fase S del ciclo celular, momento en que ocurre la síntesis de ADN [31]. A nivel molecular, la quimioterapia actúa matando las células que están en proceso de división, dañando específicamente el núcleo y los genes de las células cancerígenas. Interfiere con el centro de control celular encargado de enviar los comandos de división, interrumpe los procesos químicos asociados a esta división y afecta la replicación de los genes durante la generación de copias. Debido a la alta tasa de división de las células cancerígenas, la quimioterapia tiene una mayor probabilidad de eliminarlas. No obstante, también impacta a las células sanas que se dividen rápidamente, como las del cabello, la médula ósea, la piel y el sistema digestivo, lo que explica los efectos secundarios comunes asociados a este tratamiento [32].

## Radioterapia

Se utilizan dosis controladas de radiación para dañar o destruir las células cancerígenas, con el objetivo de detener su crecimiento y proliferación. Este tratamiento generalmente afecta únicamente la parte del cuerpo expuesta a la radiación [33]. Se estima que el 50 % de los pacientes con cáncer reciben radioterapia como parte de su tratamiento, utilizándose tanto para curar el cáncer como para tratar el dolor de manera paliativa. Uno de los principales efectos de la radiación es provocar un daño profundo en el ADN [29].

La radiación interactúa con el tejido generando ionizaciones que producen radicales libres, los cuales son altamente reactivos y tienen la capacidad de romper enlaces químicos. Esto puede causar daños significativos en el ADN, incluidos enlaces cruzados, roturas de cadena simple y, especialmente, roturas de cadena doble, que son las más críticas por su dificultad de reparación. Por cada gray de radiación, se inducen aproximadamente 40 roturas de doble cadena, las cuales deben ser reparadas para evitar efectos letales o mutagénicos [34].

Existen dos principales mecanismos de reparación del ADN para abordar estas roturas: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). La vía NHEJ opera en cualquier fase del ciclo celular y no requiere una plantilla homóloga, aunque es más propensa a errores. En cambio, la recombinación homóloga es precisa y requiere una plantilla homóloga, lo que limita su funcionamiento a las fases S y G2, donde las células están activamente replicando su ADN. Sin embargo, si el daño en el ADN no puede ser reparado, las células activan mecanismos de señalización que detienen el ciclo celular o desencadenan la apoptosis para evitar la propagación de material genético defectuoso. Estas respuestas están mediadas por proteínas clave como ATM y ATR, que regulan la reparación, la detención celular y, en última instancia, la muerte programada de la célula en caso de fallo en la reparación [34].

## 6.2. Hongos

Conforme se han ido estudiando los hongos, se ha podido desmitificar la información y los conocimientos que diversas culturas nativas tenían ellos, permitiendo así su uso en diversas actividades, tales como la industria alimenticia, farmacéutica, biotecnología, formulación de antibióticos, pigmentos, vitaminas, enzimas, entre otros [35].

Los hongos tienen membrana y organelos rodeados de membrana, tal como las células eucariotas [35]. Además, cuentan con un núcleo que puede tener uno o dos nucleolos y cromosomas. Para poder tener energía, necesitan de carbohidratos complejos, ya que no poseen la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis, ni pueden fijar carbono, por tanto, son heterótrofos, es decir, que son consumidores de los compuestos producidos por otros organismos [36] [35]. Obtienen sus nutrientes mediante la absorción de compuestos degradados por exoenzimas, liberadas por ellos mismos. Esta característica provoca que se involucren también en los ciclos del carbono y nitrógeno [35].

Son aeróbicos estrictos, es decir, requieren de oxígeno libre para su crecimiento, ya que les sirve como aceptor de electrones. Aunque hay algunas especies que son anaeróbicos facultativos, pues utilizan otras moléculas como aceptores de electrones, en su pared poseen

principalmente polisacáridos, proteínas y lípidos. El tipo de polisacárido depende de cada grupo taxonómico, sin embargo, el principal polisacárido es el glucano [35].

Los hongos se pueden encontrar en el suelo, agua, madera viva o en descomposición, restos vegetales, excrementos, entre otros. Hay algunas especies que son endémicas debido a que dependen de su simbiote, hospederos o hábitat específico. Las estructuras macroscópicas, poseen bandas de micelio, rizomorfos y esclerocios. Las bandas de micelio, tiene como función principal la traslocación de materiales y el transporte de nutrientes. Por otro lado, los rizomorfos, tienen como función transportar nutrientes. Por último, los esclerocios, se encargan de aportar reposo y resistencia, permitiendo que los hongos puedan sobrevivir en condiciones adversas. Estos además poseen cuerpos fructíferos, que sirven como estructuras de reproducción [35].

Los hongos tienen hábitats terrestres, acuáticos y extremos. De estas observaremos específicamente en los hongos que crecen en un hábitat terrestre. El suelo es el material formado por minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos. Este posee una gran cantidad de microhábitats que vuelven el suelo un lugar adecuado para ser colonizado por los hongos. El mayor atractivo de este es la materia orgánica disponible. La distribución de estos depende de la materia orgánica y el oxígeno disponible, es decir que, a mayor presencia de estos compuestos, mayor cantidad de hongos [35].

Las especies de hongos varían dependiendo de su conformación y el hábitat en el que crezcan. La diversidad existente ha permitido que se amplíe el estudio en el reino fungi, logrando de esta forma que el interés por las propiedades nutricionales y medicinales, además, los hongos tienen un papel importante en los ecosistemas, se estima que hay alrededor de 1.5 millones de hongos, de los cuales se tiene conocimiento de una pequeña parte. En esta sección nos enfocaremos en dos especies en específico [35].

### 6.2.1. *Agaricus bisporus*

El *Agaricus bisporus*, conocido comúnmente como champiñón, es un hongo perteneciente a la clase Agaricomycetes y al género *Agaricus* [37]. Es una especie ampliamente consumida en todo el mundo, reconocida por su elevado contenido nutricional. Los cuerpos fructíferos de este hongo poseen propiedades biológicas destacadas, como actividades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, antitumorales, inmunomoduladoras y antimicrobianas, además de contener ergotioneína, un potente antioxidante [38]. Este hongo es el más popular y cultivado a nivel mundial.

Entre sus principales características morfológicas destacan su sombrero convexo y el velo, típicamente de colores blanco o marrón. Presenta láminas libres que, en estado inmaduro, son cremosas, pero que adquieren tonalidades café oscuro o negras al madurar. Su estípite es central y está unido al píleo mediante un anillo membranoso que puede ser sencillo o doble, y de ubicación superior o inferior [18].

En términos de composición, el champiñón contiene un 91.4% de humedad, mientras que el 8.6% restante es materia seca, de la cual el 19% corresponde a proteínas, 23% a fibra y 12% a minerales, con un contenido destacado de potasio, fósforo, cobre e hierro [18]. Está compuesto por metabolitos y compuestos biológicamente activos, como aminoácidos,

azúcares simples y complejos, indol, compuestos fenólicos, ácidos grasos, esteroides, estatinas, vitaminas, oligoelementos y minerales. Además, es rico en carbohidratos y proteínas, destacando los carbohidratos complejos y las proteínas como las principales macromoléculas [18].

Los compuestos bioactivos presentes en los champiñones están estrechamente relacionados con diversas actividades terapéuticas, como efectos antiinflamatorios, antidiabéticos, antihiperlipidémicos, antioxidantes, antivirales, antimicrobianos, anticancerígenos y antitumorales. Estas propiedades medicinales contribuyen a su uso potencial en el tratamiento de enfermedades y en la promoción de la salud [39].

### 6.2.2. *Pleurotus ostreatus*

La especie *Pleurotus*, conocida como hongo ostra, destaca por su elevado contenido de proteínas, vitaminas, minerales, grasas saludables y fibra, lo que lo convierte en un alimento ideal para prevenir enfermedades como la diabetes, la obesidad y afecciones cardiovasculares [40]. Este hongo pertenece al orden Agaricales y a la familia Pleurotaceae. En particular, el *Pleurotus ostreatus* presenta un píleo que mide entre 4 y 14 cm de diámetro, con tonalidades que van del blanco al gris [18].

En términos de su composición, el *Pleurotus ostreatus* se distingue por un contenido notable de proteínas, que representa el 17.5 % de su composición, y un 23 % de fibra. Además, este hongo es una fuente rica de vitaminas como la tiamina, riboflavina, piridoxina y cobalamina, así como de minerales esenciales como calcio y fósforo. También contiene flavonoides y compuestos fenólicos, que contribuyen a sus propiedades beneficiosas para la salud [18]. Con un 92.4 % de humedad y un 7.6 % de materia seca, su perfil nutricional incluye un 7.3 % de minerales totales, un 15.4 % de proteínas crudas y un 22 % de fibra cruda. Estas características, junto con su actividad antibiótica y antiviral, destacan a esta especie como un alimento funcional [18].

El *Pleurotus ostreatus* ofrece múltiples beneficios medicinales, gracias a compuestos como los fenólicos, flavonoides, betacarotenos, polisacáridos, beta-D-glucanos y glicopéptidos. Estos compuestos contribuyen a sus efectos antioxidantes, antibacterianos, antibióticos y antitumorales [18]. En particular, su acción antioxidante protege las células del estrés oxidativo, mejora el funcionamiento del sistema nervioso, reduce el cansancio y la fatiga, favorece el metabolismo y estimula la producción de colágeno [40].

## 6.3. Extracción de extracto

Es de interés obtener los extractos, ya que en ellos hay compuestos activos, que se pueden utilizar para combatir plagas y enfermedades. La eficacia que tenga el extracto depende de la metodología de extracción, la calidad de producto y la concentración utilizada [41]. Las técnicas más comunes empleadas para la extracción de compuestos bioactivos incluyen Soxhlet, maceración e hidrodestilación. La técnica Soxhlet, ampliamente utilizada para extraer lípidos, implica la evaporación completa del disolvente junto con el sólido de interés. A medida que el disolvente se condensa y regresa a la cámara de extracción, los compuestos

extraídos se separan en capas según su densidad. Aunque esta técnica ofrece un alto rendimiento en recuperación, se ha observado que los extractos obtenidos presentan un menor contenido de polifenoles en comparación con métodos no convencionales [42]. Por su parte, la maceración es una técnica sencilla y económica utilizada para obtener aceites esenciales y compuestos bioactivos. Este método consta de tres etapas principales: triturar o fragmentar el sólido para maximizar su superficie de contacto con el disolvente, dejar reposar la mezcla en un recipiente cerrado, y finalmente, filtrar el líquido resultante [42]. En cuanto a la hidrodestilación, esta técnica se emplea para extraer compuestos bioactivos y aceites esenciales, y se basa en tres procesos fundamentales: hidrofusión, hidrólisis y descomposición térmica. Estos se llevan a cabo a una temperatura cuidadosamente controlada para evitar la degradación de los compuestos bioactivos extraídos [42]. La elección del disolvente depende del objetivo de la extracción y está estrechamente relacionada con la polaridad del compuesto que se busca obtener. Entre los disolventes más utilizados en la extracción de materias primas y productos alimenticios se encuentran el propano, butano, acetato de etilo, etanol, dióxido de carbono, óxido de hidrógeno y acetona. No obstante, algunos disolventes presentan restricciones debido a su toxicidad, como el hexano, acetato de metilo, metiletilcetona, diclorometano, metanol, propanol-2, éter dimetílico, butanol-1, butanol-2, propano-1 y 1,1,1,2-tetrafluoroetano. Estos deben ser eliminados o separados adecuadamente del extracto para garantizar su seguridad [42]. Cada disolvente tiene aplicaciones específicas según los compuestos que se desean extraer. Por ejemplo, el agua es adecuada para compuestos como antocianinas, taninos, saponinas y terpenoides; el etanol, para taninos, polifenoles, flavonoles, terpenoides y alcaloides; el metanol, para antocianinas, terpenoides, saponinas, taninos, flavonas y polifenoles; el cloroformo, para terpenoides y flavonoides; el diclorometano, para terpenoides; el éter, para alcaloides y terpenoides; y la acetona, para flavonoides. Por lo tanto, seleccionar el disolvente adecuado es esencial para asegurar una extracción eficaz y segura de los compuestos de interés [42].

## 6.4. Expresión génica

Se define como gen a la unidad básica para la información genética, formado por una hebra larga de material genético. El gen no es autónomo, depende de otros componentes, para su debido funcionamiento y perpetuación [43]. Los genes forman secciones de las cadenas del ADN. El ADN es el material hereditario, contiene un código necesario para crear y mantener un organismo. Este código se lee mediante el orden o la secuencia de 4 bases químicas como lo son, la adenina (A), la citosina (C), la guanina (G) y la timina (T). Para poder formar las paredes de bases, estos grupos se agrupan en pares, A con T y C con G, estos grupos se unen a una molécula de azúcar y a una de fosfato, para poder crear un nucleótido [44] como se presenta en la Figura 2. Estas moléculas son cruciales para el funcionamiento correcto de las células ya que éstas tienen funciones específicas que deben realizar en el momento adecuado [44].

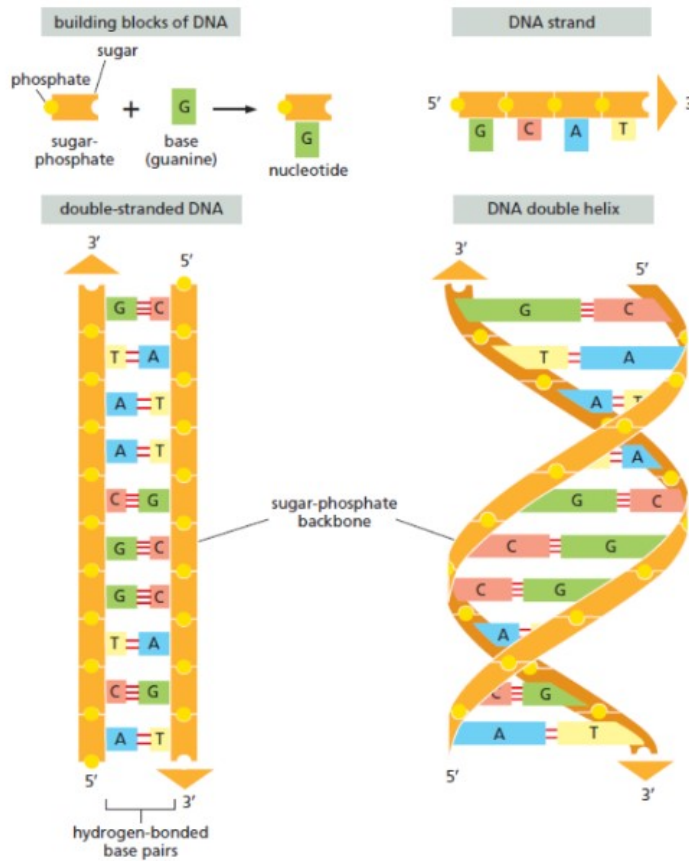


Figura 2: ADN y sus bloques de construcción [45]

La diferencia esencial entre el ADN y el ARN radica en su estructura y composición química. El ARN está formado por una sola cadena y presenta un azúcar diferente al del ADN, además de sustituir la base nitrogenada timina (T) por uracilo (U). La expresión génica es el proceso mediante el cual se decodifica la información genética contenida en los genes activos de una célula a lo largo de su vida [46]. Este proceso, definido por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, implica utilizar la información codificada en un gen para producir moléculas de ARN que codifican proteínas o ARN no codificantes. Funciona como un interruptorregulador, controlando cuándo y dónde se produce el ARN, y asegurando que se genere en la cantidad adecuada. La expresión génica está estrictamente regulada y puede modificarse según las condiciones específicas [47]. A través de este mecanismo, la célula produce las moléculas necesarias para su funcionamiento utilizando el código genético del ADN. Durante el proceso, la célula lee el código en grupos de tres letras (codones), donde cada codón indica un aminoácido específico. Estos aminoácidos se ensamblan para formar proteínas, esenciales para las funciones celulares. Así, la expresión génica asegura la producción tanto de proteínas como de ARN no codificantes, fundamentales para el desarrollo y la supervivencia celular [47].

### 6.4.1. ARN

El ARN, o ácido ribonucleico, es una molécula presente en las células vivas que contiene material genético y comparte similitudes con el ADN. Una diferencia clave es que el ARN está formado por un azúcar distinto y una base nitrogenada diferente: la timina (T) del ADN es reemplazada por el uracilo (U) en el ARN. Las demás bases nitrogenadas (adenina, citosina y guanina) permanecen iguales, y las bases del ARN se emparejan con sus complementarias, siguiendo el esquema A con T, U con A, C con G, y G con C del ADN [26]. La composición de la estructura química se puede observar en la Figura 3.

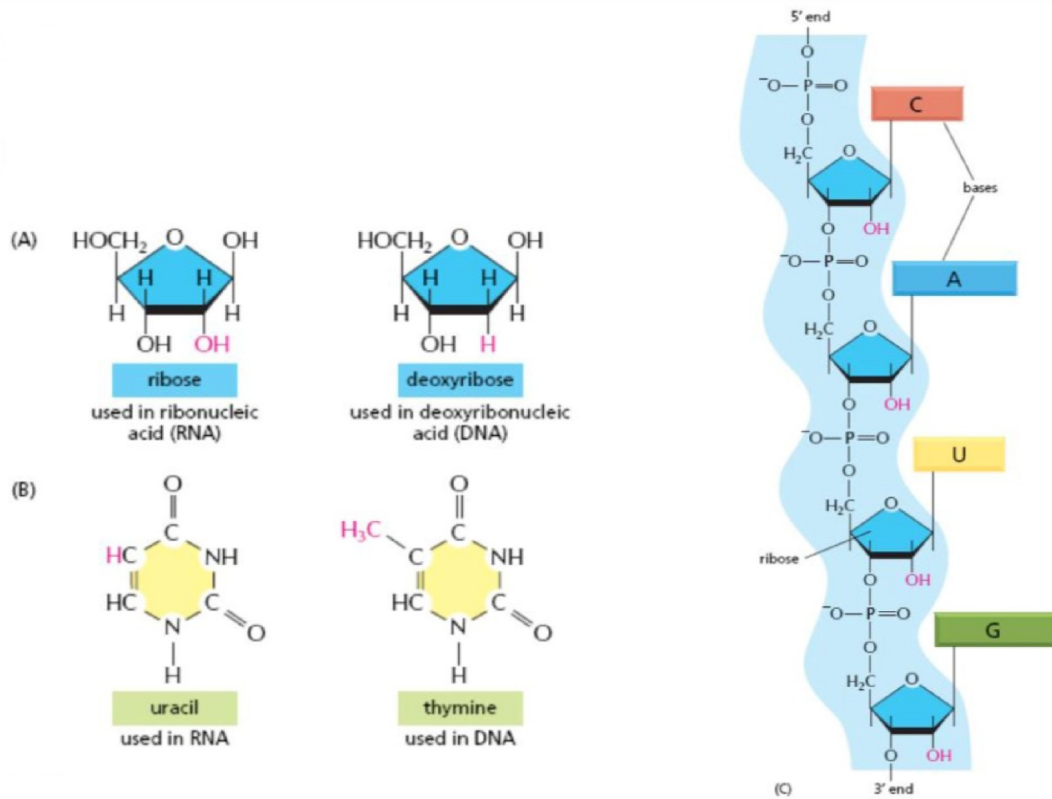


Figura 3: Estructura química del ARN [26]

La síntesis del ARN comienza con la transcripción, un proceso en el cual se seleccionan los monómeros del ARN a partir de una cadena moldeada de ADN. Durante la transcripción, se lleva a cabo la polimerización utilizando segmentos específicos de la secuencia de ADN como molde. El producto final es un polímero de ARN que contiene la información genética necesaria para dirigir procesos celulares [26]. El ARN sintetizado desempeña un papel esencial en la expresión genética, ya que dirige la síntesis de proteínas. Este proceso, que comienza con la transcripción del ADN, culmina en la producción de proteínas fundamentales para las funciones celulares. Este flujo de información genética desde el ADN hasta las proteínas se ilustra en la Figura 4 [26].

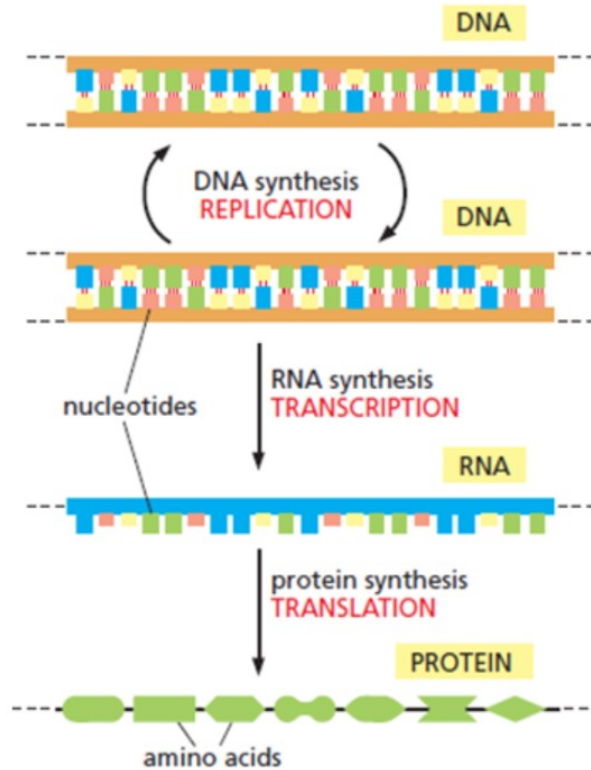


Figura 4: Dogma central de la biología molecular [26]

#### 6.4.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción es el proceso mediante el cual una cadena de ARN se convierte en una secuencia de ADN unicatenario (cDNA), que luego puede convertirse en un ADN bicatenario. Esta conversión es crucial para transferir la información genética del ARN al ADN, lo que permite que se almacene y se herede a las siguientes generaciones [26]. La retrotranscripción comienza cuando el ARN se une al sitio de inicio de la retrotranscriptasa, que es la enzima responsable de sintetizar el ADN complementario (cDNA) a partir de una plantilla de ARN [48]. Esta enzima empieza a sintetizar una cadena de ADN complementaria al ARN, añadiendo nucleótidos correspondientes a medida que avanza a lo largo del ARN. A medida que la retrotranscriptasa se mueve a lo largo de la cadena de ARN, se crea el ADN de cadena negativa (ADN  $-$ ), que es complementario a la secuencia de ARN [49].

Una vez que la retrotranscriptasa completa la síntesis del ADN de cadena negativa, entra en acción la enzima ribonucleasa H (RNasa H), que elimina la cadena de ARN de la estructura ADN. Esto deja únicamente el ADN negativo. En este momento, el ADN negativo se transfiere y se une a la parte opuesta del ARN (por sus secuencias repetidas). Después, la retrotranscriptasa sintetiza la cadena positiva de ADN utilizando la cadena negativa de ADN como molde. Esta acción continúa hasta que se completa el dúplex de ADN bicatenario [49]. Una vez terminada la síntesis de ambas cadenas de ADN, se obtiene un ADN de doble hebra completo, que puede ser integrado al genoma de la célula. Este proceso es fundamental para la conversión de la información genética de ARN a ADN, permitiendo su conservación

y transmisión [49].

### 6.4.3. RT-PCR

El método utilizado para crear copias de una secuencia genética con el fin de analizarla se basa en el uso de la enzima retrotranscriptasa y la enzima ADN polimerasa para convertir ARN en ADN y luego amplificar el ADN obtenido. Esta amplificación permite detectar cambios en genes o cromosomas, o estudiar la activación de genes específicos [50]. El proceso inicia con la retrotranscripción: se añade una muestra que contiene ARN, se incorporan primers específicos, que se eligen en función de la secuencia que se desea estudiar, y se combina con la retrotranscriptasa para sintetizar el cADN. Este paso ocurre a una temperatura de entre 37 y 55 °C durante 30 a 60 minutos. Posteriormente, en la amplificación, se añade cADN, primers, nucleótidos y ADN polimerasa. La mezcla resultante se somete a ciclos de desnaturalización, alineación y extensión, lo que permite la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Este ciclo se repite entre 25 y 40 veces para lograr una amplificación exponencial del cADN. La detección de la amplificación se realiza utilizando colorantes fluorescentes como SYBR Green o TaqMan, o con sondas específicas, lo que permite monitorear la amplificación en tiempo real y cuantificar la cantidad de cADN generado [51].

### 6.4.4. *Primers*

Un *primer* es un fragmento corto de ARN que actúa como punto de inicio para la síntesis de ADN en procesos de replicación y amplificación. Los *primers* tienen secuencias únicas y específicas que permiten identificar de manera precisa una región particular dentro de un gen, facilitando la amplificación dirigida. Estos suelen tener una longitud de entre 18 y 25 nucleótidos, lo que les permite unirse específicamente a la secuencia objetivo de ADN. Se dividen en dos tipos: *forward* (sentido), que se unen a la cadena molde en la dirección 5' a 3', y *reverse* (antisentido), que se unen en dirección 3' a 5'. El diseño de un *primer* debe ser específico para evitar amplificaciones no deseadas, garantizando la precisión del proceso de amplificación [52][53].

## 6.5. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada esencial para el desarrollo y mantenimiento del equilibrio celular. Durante el desarrollo embrionario, elimina células innecesarias, mientras que en la vida adulta se encarga de deshacerse de aquellas que han sufrido daños irreversibles o que han cumplido su función, permitiendo la renovación celular [54][55]. Este proceso se activa mediante señales bioquímicas y proteínas específicas que inician un mecanismo regulado por genes como Bcl-2 y p53, encargados de garantizar la precisión de la eliminación celular. La apoptosis se lleva a cabo de manera ordenada para evitar inflamación, y se caracteriza por cambios morfológicos como la formación de ampollas en la membrana, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, tal y como se presenta en la Figura 5. Ocurre en tres etapas principales: iniciación, regulación genética y activación de efectores, como las caspasas, que degradan componentes esenciales de la célula.

Su alteración puede dar lugar a enfermedades como el cáncer, cuando las células dañadas o peligrosas no son eliminadas correctamente [54][55].

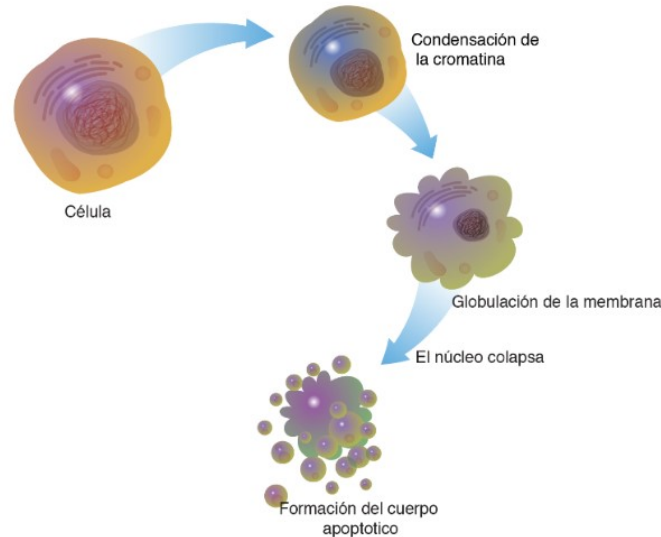


Figura 5: Apoptosis celular [54]

### 6.5.1. Proteínas reguladoras de la apoptosis

#### PUMA

PUMA es una proteína perteneciente a la familia de proteínas BH3-only, que actúan como reguladoras clave de la apoptosis celular. Su actividad está vinculada a su papel como gen objetivo, activándose en respuesta a señales de estrés y daño en el ADN. Su principal función es activar a p53 en situaciones de daño genético, facilitando la eliminación de células dañadas. En el contexto del cáncer, PUMA incrementa la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos, lo que refuerza su potencial como objetivo terapéutico [56].

#### BAX

BAX es una proteína proapoptótica perteneciente a la familia Bcl-2 cuya función principal es inducir la apoptosis en respuesta al estrés o daño celular. Actúa formando poros en la membrana mitocondrial, lo que permite la liberación de factores proapoptóticos responsables de activar la cascada de muerte celular. En el contexto del cáncer, niveles altos de esta proteína están asociados con un buen pronóstico, mientras que su ausencia o niveles reducidos se relacionan con resistencia a la apoptosis, progresión tumoral, metástasis y resistencia a los tratamientos. Por estas características, BAX se considera un marcador clave en la regulación de la apoptosis de células tumorales [57].

### 7.1. Obtención de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

Se utilizaron las especies de hongos *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, obtenidas de los distribuidores Unisuper, S.A. y Gastro Fungi. Para la preparación del extracto, se pesaron 250 gramos de micelio para ambas muestras, los cuales fueron cortados en pedazos y agregados a distintos morteros. Posteriormente, se añadieron 250 ml de etanol absoluto (Merck, Alemania) con una relación 1:1. Durante el proceso de maceración de 20 minutos, se agregaron los 250 ml de etanol de forma gradual para asegurar una extracción óptima. La mezcla obtenida fue transferida a frascos de vidrio sellados, cubiertos con papel aluminio para evitar la exposición a la luz, y se dejó macerar a temperatura ambiente durante 48 horas.

#### 7.1.1. Filtrado y evaporación del solvente

Posterior a la maceración, la mezcla fue sometida a un proceso de filtrado utilizando filtros de café y papel filtro. Este procedimiento se repitió varias veces hasta obtener un filtrado completamente libre de sólidos visibles.

A continuación, se llevó a cabo la evaporación del etanol en una campana de extracción. El extracto etanólico se transfirió a un vaso de precipitado de vidrio de borosilicato y se calentó gradualmente utilizando una estufa. La temperatura fue monitoreada constantemente hasta alcanzar los 80 °C, garantizando la completa evaporación del solvente, lo cual tomó aproximadamente 30 minutos.

Una vez enfriado, el extracto fue trasladado a una campana de flujo laminar previamente desinfectada con etanol al 70 %. En la campana se introdujeron filtros de jeringa (Whatman UNIFLO 25 mm), tubos de ensayo estériles de 5 ml de vidrio, los extractos, jeringas de 5 ml (Nypro Syringe) y vasos de precipitado de vidrio de borosilicato. Todo el material fue desinfectado con etanol, y la luz UV de la campana se encendió durante 20 minutos para garantizar la esterilidad de las muestras.

Posteriormente, se procedió al filtrado del extracto. Con una jeringa, se tomó una muestra evitando llegar al fondo del recipiente, colocándose un filtro de jeringa para transferirla a un vaso de precipitado limpio. Este proceso se repitió con una nueva jeringa y filtro para garantizar un filtrado más fino. Finalmente, el extracto fue almacenado en tubos de ensayo estériles y conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 7.1.2. Liofilización del extracto obtenido

Los extractos obtenidos fueron sometidos a un proceso de liofilización utilizando un liofilizador (Pro Freeze Dryer, Harvest Right, Utah, USA). Las muestras fueron transferidas a cajas de Petri de vidrio estériles y liofilizadas a una presión de 0.2 a 0.5 bar durante 48 horas.

Al finalizar el proceso, las muestras fueron trituradas hasta obtener una consistencia similar a polvo y transferidas a tubos cónicos estériles previamente pesados en una balanza analítica. Una vez registrado el peso del tubo vacío, se taró la balanza y se pesó la muestra para determinar el peso obtenido.

Finalmente, las muestras fueron almacenadas en frascos de vidrio herméticos con sílice gel para prevenir la rehidratación.

### 7.1.3. Resuspensión de extracto en medio de cultivo

Dentro de una campana de flujo laminar previamente esterilizada, se resuspendieron los extractos en 10 ml de medio, el cual fue agitado hasta disolver por completo las partículas sólidas. Una vez obtenido un líquido homogéneo, se procedió a tomar 5 ml para crear alícuotas en tubos de 0.25 ml (*Eppendorf*). Estos tubos fueron previamente rotulados y almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras iniciales tenían concentraciones de 171 mg/ml para *Agaricus bisporus* y 179 mg/ml para *Pleurotus ostreatus*. Fue necesario realizar dos diluciones para alcanzar concentraciones intermedias de 1710  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 1790  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para ello, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del extracto y se mezclaron con 900  $\mu\text{l}$  de medio. Posteriormente, de esta primera dilución, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  y se diluyeron nuevamente en 900  $\mu\text{l}$  de medio.

Una vez realizadas las diluciones intermedias, se llevaron a cabo cálculos para determinar la cantidad de extracto necesaria para exponer las líneas celulares a concentraciones finales de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los cálculos realizados se muestran a continuación:

$$V_1 = \frac{(100 \mu\text{g/ml})(2 \text{ ml})}{1710 \mu\text{g/ml}} = 0.11 \text{ ml} \quad (1)$$

$$V_1 = \frac{(200 \mu\text{g/ml})(2 \text{ ml})}{1710 \mu\text{g/ml}} = 0.23 \text{ ml} \quad (2)$$

Cálculos 1: Cálculo para determinar el contenido de exposición de *Agaricus bisporus* a utilizar para la concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y 200  $\mu\text{g/ml}$ .

$$V_1 = \frac{(100 \mu\text{g/ml})(2 \text{ ml})}{1790 \mu\text{g/ml}} = 0.11 \text{ ml} \quad (3)$$

$$V_1 = \frac{(200 \mu\text{g/ml})(2 \text{ ml})}{1790 \mu\text{g/ml}} = 0.22 \text{ ml} \quad (4)$$

Cálculos 2: Cálculo para determinar el contenido de exposición de *Pleurotus ostreatus* a utilizar para la concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y 200  $\mu\text{g/ml}$ .

## 7.2. Preparación de muestras biológicas – cultivo celular

### 7.2.1. Descongelación de líneas celulares y pasaje

Para los ensayos, se emplearon las siguientes líneas celulares: CHO (células de ovario de hámster chino), LAN-1 (neuroblastoma humano) y UFH-001 (células de cáncer de mama humano). La línea celular CHO se utilizó como grupo control. Las líneas celulares se almacenaron a una temperatura de  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

El descongelamiento se realizó retirando el criotubo del contenedor criogénico (*Mr. Frosty, Freezing Container*) y colocándolo en un baño de agua precalentado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , donde las células se descongelaron en un lapso de 2 a 5 minutos. Durante este proceso, se supervisó constantemente para transferir el criotubo a la campana de flujo laminar cuando quedara únicamente una pequeña perla de hielo.

Dentro de la campana de flujo laminar, el contenido descongelado se transfirió gota a gota a un tubo de centrifuga que contenía 1 ml de medio RPMI (*Gibco*), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, penicilina (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) y estreptomycin (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), previamente precalentado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . La mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió cuidadosamente en medio de cultivo fresco. Las células fueron transferidas a *flasks* de cultivo adecuados para su propagación.

Al descartar el medio de cultivo, se añadió a cada placa 2 ml de tripsina (*Gibco™ Tripsina-EDTA (0.05 %) con rojo fenol*) para facilitar el desprendimiento celular, incubando durante 5 minutos. Tras un ligero golpecito, las células se reincubaron por 5 minutos adicionales. Posteriormente, se añadió el doble del volumen de tripsina en medio de cultivo para resuspender las células. Estas se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm

durante 10 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 6 ml de medio fresco y se transfirieron a nuevas placas para su cultivo.

### 7.2.2. Viabilidad celular y citotoxicidad

La densidad celular se determinó utilizando una cámara de Neubauer de vidrio con espejo. Para el ensayo, se emplearon placas de 24 pocillos, en los cuales se sembraron  $0.3 \times 10^6$  células/mL en cada pocillo, junto con extractos de hongos en concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  y 200  $\mu\text{g/mL}$ , además de un grupo control sin extracto. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 horas, según el tratamiento asignado.

Para la preparación de las células, se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de medio con células y se mezclaron con 30  $\mu\text{L}$  de azul de tripano para evaluar la viabilidad celular mediante el conteo en la cámara de Neubauer. Las células muertas fueron fácilmente identificables debido a la tinción azul. Posteriormente, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla en un hemocitómetro. Las células fueron analizadas bajo un microscopio invertido con contraste de fase, donde se diferenciaron las células viables (sin teñir) de las no viables (teñidas de azul).

El número total de células por mililitro de muestra se calculó sumando las células viables y no viables, y multiplicando el resultado por el factor de dilución del azul de tripano. Para calcular el porcentaje de células viables, se utilizó la siguiente Ecuación:

$$\text{Porcentaje de células viables} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (5)$$

## 7.3. Extracción de ARN y síntesis de cADN

### 7.3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit GenElute™ E Viral ARN/DNA (Sigma Aldrich). Las columnas GenElute E-spin se prepararon mediante una breve agitación en vórtex e incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, seguidas de centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto para eliminar residuos del buffer. Posteriormente, se añadió a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL una suspensión de 50  $\mu\text{L}$  de células junto con 50  $\mu\text{L}$  de SmartLyse Viral Buffer. La mezcla resultante (90  $\mu\text{L}$ ) fue transferida cuidadosamente a columnas previamente preparadas y centrifugada a velocidad máxima para recolectar el ARN en tubos de recolección. El ARN extraído fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher), midiendo a 260 nm para determinar concentración y pureza, asegurando su aptitud para análisis posteriores. Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80 °C hasta ser utilizadas en la síntesis de ADN complementario (cDNA).

La transcripción reversa se llevó a cabo para convertir el ARN extraído en ADN complementario (cDNA), utilizando un sistema de transcriptasa reversa. En este proceso, la enzima sintetizó una hebra de ADN a partir del ARN plantilla con ayuda de nucleótidos libres y un cebador específico. Posteriormente, la enzima degrada parcialmente la hebra de ARN

mediante actividad RNasa H, permitiendo la síntesis de una segunda hebra de ADN para obtener un ADN bicatenario.

### 7.3.2. Síntesis y diluciones de ADN complementario (cADN)

La síntesis de ADN complementario (cADN) se realizó utilizando el kit GenElute E Viral RNA/DNA Swab Kit de Sigma Aldrich, siguiendo un protocolo optimizado para la conversión de ARN extraído en cADN. Para ello, se prepararon mezclas de retrotranscripción en tubos de PCR, incluyendo los siguientes reactivos por muestra: 5  $\mu\text{L}$  de ARN (1  $\mu\text{g}$ ), 11  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 1  $\mu\text{L}$  de hexámeros, 1  $\mu\text{L}$  de oligo dT, 1  $\mu\text{L}$  de nucleótidos, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  y 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa, alcanzando un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ . Las mezclas se incubaron en un termociclador a 70  $^\circ\text{C}$  durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y, posteriormente, se enfriaron en hielo. A continuación, se añadieron 11  $\mu\text{L}$  de un *máster mix* que contenía 10  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 5X y 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo utilizando un protocolo térmico que incluyó un anillamiento inicial a 25  $^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, seguido de una etapa de extensión a 42  $^\circ\text{C}$  durante 90 minutos, y finalizó con una inactivación de la enzima a 70  $^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Estas medidas se utilizaron por cada muestra, sumando un total de 36 muestras procesadas. El cADN obtenido fue cuantificado con un espectrofotómetro *NanoDrop* para evaluar su concentración y pureza, asegurando que cumpliera con los requisitos para análisis posteriores. Finalmente, el cADN fue almacenado a -20  $^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, se realizaron las diluciones del cADN utilizando la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (6)$$

El objetivo fue obtener una concentración final de al menos 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, utilizando crioviales previamente etiquetados. Las cantidades necesarias de cADN y agua ultrapura se calcularon y añadieron con micropipetas calibradas, garantizando precisión en la preparación. Las muestras diluidas se sellaron cuidadosamente y se almacenaron a -20  $^\circ\text{C}$  para su uso en posteriores análisis de PCR convencional y qPCR.

## 7.4. PCR Convencional y qPCR

### 7.4.1. Selección de genes de interés

Los genes seleccionados fueron BAX y PUMA debido a su papel clave en la regulación de la apoptosis, un proceso fundamental en la lucha contra el cáncer. BAX participa en la fase ejecutora de la vía mitocondrial, promoviendo la liberación de factores apoptóticos como el citocromo c, mientras que PUMA actúa como un regulador temprano en vías dependientes de p53, frecuentemente alteradas en el cáncer. Su selección se basa en su sensibilidad a estímulos proapoptóticos y su capacidad para reflejar etapas clave de la apoptosis, proporcionando una visión integral del proceso.

Para normalizar los valores de expresión génica, se utilizó el gen de control GAPDH. Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de estos genes se resumen en el siguiente Cuadro 1:

Cuadro 1: Secuencias de *primers* utilizados para la amplificación de GAPDH, PUMA y BAX.

Gen	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
PUMA	5'-GTGCCAGAGGAGAGGTTTC-3'	5'-TTGATGGGTCTCTTGGGTG-3'
BAX	5'-ATGAGTACCTGAACCGGCAG-3'	5'-TGGGAGGAGACACAGGGAAG-3'

#### 7.4.2. PCR convencional

La amplificación de los genes de interés, PUMA y BAX, se realizó mediante PCR convencional utilizando el kit GoTaq PCR Core System I (Promega) en un termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf). El programa térmico incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto. En el paso final, se llevó a cabo una desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos y una alineación a 57 °C por 30 segundos. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparado disolviendo agarosa en buffer de corrida y calentándola hasta su completa homogeneización. Una vez solidificado, el gel se tiñó con SYBR Green Safe DNA Stain (Invitrogen, Thermo Fisher), permitiendo la visualización de las bandas amplificadas bajo luz UV. Para comparar los tamaños de los fragmentos, se utilizó el marcador de peso molecular TrackIt Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher).

#### 7.4.3. QPCR

Para la cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR), se utilizaron los kits LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix y SYBR Green Quantitative RT-qPCR (*Merck*). Se preparó una mezcla maestra que contenía 5 µl de LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix, 3 µl de agua, 0.5 µl de cada *primer* específico para los genes PUMA o BAX, y 1 µl de cADN diluido a una concentración de 100 ng/µL. Las muestras fueron cargadas en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus en tiempo real, con las siguientes condiciones: activación a 50 °C por 2 minutos, desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y alineamiento a 61 °C por 60 segundos. Finalmente, se realizó una extensión a 72 °C durante 7 minutos. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron utilizando el gen control GAPDH. La expresión génica relativa de los genes PUMA y BAX se calculó utilizando la Ecuación 7.

$$2^{-(C_{tm} - C_{tc})} \quad (7)$$

Donde  $C_{tm}$  es el valor de Ct obtenido para PUMA y BAX, y  $C_{tc}$  es el valor de Ct del gen control.

## 7.5. Análisis de citotoxicidad de extracto mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT)

### 7.5.1. Ensayo MTT

El análisis de citotoxicidad de los extractos se realizó mediante el ensayo MTT. Para ello, se sembraron  $1.8 \times 10^6$  células/mL en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, ajustando el volumen final a 100  $\mu$ L por pocillo. Se utilizaron medios de cultivo suplementados con extractos de hongo a concentraciones de 100  $\mu$ g/mL y 200  $\mu$ g/mL, además de un control sin extracto. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para permitir la adherencia de las células y su posterior exposición a los extractos. Cada ensayo se realizó en duplicado.

Tras la incubación, se añadieron 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) preparado en PBS a cada pocillo. Después de 3 horas de incubación adicional, se retiraron 90  $\mu$ L del medio y se añadieron 100  $\mu$ L de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se utilizó un lector de microplacas (Elx800, BioTek Instruments, Agilent Technologies) para medir la absorbancia a 540 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la Ecuación 8.

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Células expuestas a extracto} - \text{Blanco}}{\text{Células control} - \text{Blanco}} \times 100 \quad (8)$$

### 8.1. Obtención de extractos etanólicos de hongos

Con el objetivo de evaluar la actividad antitumoral de los hongos *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, se llevó a cabo una extracción con etanol. Para ambas especies de hongos se inició con un total de 250 gramos de micelio. Luego del proceso de maceración, secado y liofilización, se obtuvo un total de 1.71 g para *Agaricus bisporus* y 1.79 g para *Pleurotus ostreatus*, como se detalla en el Cuadro 2, con un rendimiento de 0.684 % y 0.716 %, respectivamente.

Cuadro 2: Rendimiento de la preparación del extracto a partir de hongos secos

Especie	Masa de micelio (g)	Masa del extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
<i>Agaricus bisporus</i>	250	1.71	0.684
<i>Pleurotus ostreatus</i>	250	1.79	0.716

### 8.2. Cultivos celulares de células LAN-1, UFH-001 y CHO expuestas a extractos de *Agaricus bisporus*

Luego de la obtención de los extractos de hongos, se procedió a realizar diferentes cultivos celulares con las líneas LAN-1 (neuroblastoma), UFH-001 (cáncer de mama) y CHO (ovario de hámster chino) para estudiar la viabilidad celular, la morfología y la expresión génica en diferentes tiempos: 24 y 48 horas.

De la muestra obtenida para cada hongo, se preparó una suspensión en medio para estimular las líneas celulares LAN-1, UFH-001 y CHO. De esta suspensión, se obtuvo una

concentración inicial de 171 mg/ml para el *Agaricus bisporus* y 179 mg/ml para el hongo *Pleurotus ostreatus*, respectivamente. Estas concentraciones originales fueron diluidas para reducirlas a 1.71 mg/ml y 1.79 mg/ml. Posteriormente, se prepararon estímulos con concentraciones finales de 100 ug/ml y 200 ug/ml, que fueron aplicados a las diferentes líneas celulares.

En los experimentos realizados con extracto de *Agaricus bisporus* (Figura 6), se observó que en la línea celular LAN-1 hubo una inhibición del crecimiento, con cambios morfológicos, como una reducción en la confluencia celular y células con forma redondeada, lo que sugiere muerte celular. Este efecto fue más evidente a las 48 horas en comparación con el control. Los resultados del conteo celular confirmaron esta observación, ya que en el control se observaron células con morfología normal (similar a neuronas), mientras que en las muestras estimuladas se observó una menor confluencia celular del 65 %, un aumento en la cantidad de células redondas y muertas, y una disminución en la viabilidad celular al 65 % tanto a las 24 como a las 48 horas (Cuadro 3).

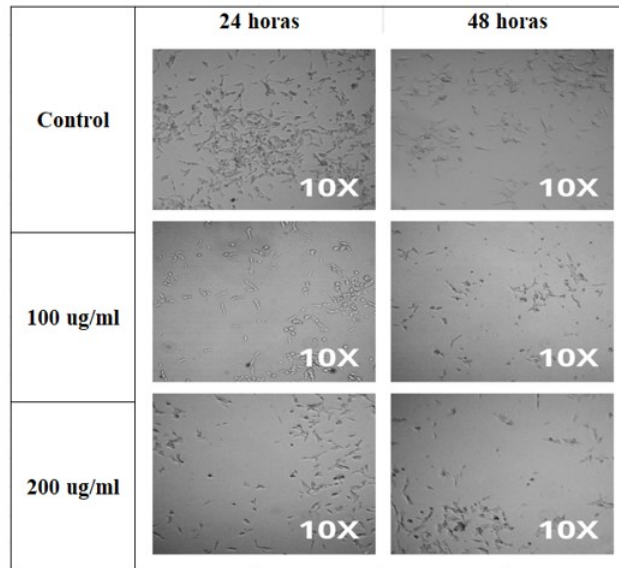


Figura 6: Resultados obtenidos para LAN-1 exposición con *Agaricus Bisporus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas

Para los experimentos realizados con la línea celular UFH-001 (Figura 7), se observó que las células expuestas a extractos de *Agaricus bisporus* mostraron una disminución en la acumulación y aglomeración celular en comparación con el control. Las células se presentaron más dispersas y separadas, lo que indica una alteración en el comportamiento de la población celular. Al igual que en LAN-1 (Figura 6), se observó inhibición del crecimiento, lo que posiblemente sea indicativo de muerte celular, ya que las células estaban flotando y presentaban una forma redonda en respuesta al extracto de *Agaricus bisporus*. Sin embargo, UFH-001 mostró mayor tolerancia al estímulo, al no verse tan afectada en su confluencia en comparación con LAN-1. La inhibición del crecimiento en UFH-001 fue menos pronunciada, con una reducción más moderada en la cantidad de células vivas. Este efecto se hizo más evidente a las 48 horas, pero de manera menos intensa que en LAN-1, lo que sugiere que UFH-001 es más resistente a la toxicidad del extracto. Los resultados del conteo celular

confirmaron esta observación, ya que las células expuestas a *Agaricus bisporus* presentaron una menor cantidad de células muertas en comparación con LAN-1 (Cuadro 3).

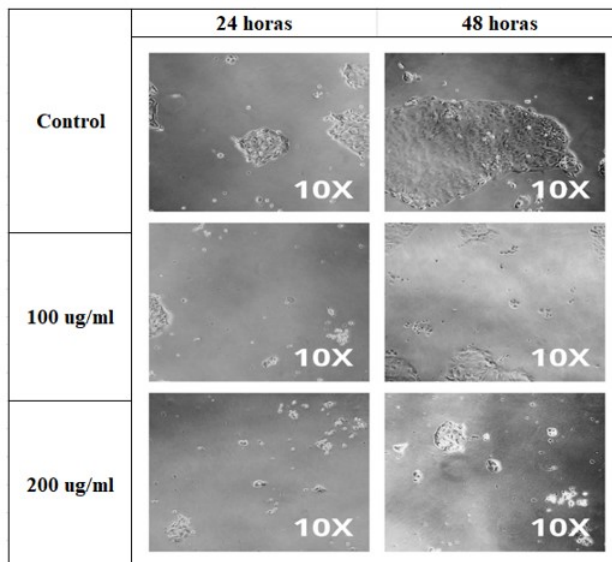


Figura 7: Resultados obtenidos para UFH-001 exposición con *Agaricus Bisporus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas

Finalmente, para la línea celular CHO (Figura 8), los cambios fueron menos evidentes o ausentes en la morfología y no hay indicios que sugieran la muerte celular, ya que la viabilidad de los cultivos a las 24 y 48 horas fue del 100%. Sin embargo, se detectó una leve inhibición del crecimiento, aunque mucho menos pronunciada en comparación con LAN-1 y UFH-001 (Cuadro 3).

Cuadro 3: % Viabilidad celular de tres líneas celulares para *Agaricus bisporus*

Tiempo	Concentración	CHO	LAN-1	UFH-001
24	Control	100.00	100.00	100.00
24	100 µg/ml	100.00	75.00	50.00
24	200 µg/ml	100.00	62.50	50.00
48	Control	100.00	100.00	100.00
48	100 µg/ml	100.00	66.67	60.00
48	200 µg/ml	100.00	62.50	66.67

### 8.3. Cultivos celulares de células LAN-1, UFH-001 y CHO expuestas a extractos de *Pleurotus ostreatus*

De manera similar, se realizaron cultivos de tres líneas celulares: LAN-1, UFH-001 y CHO, expuestas a *Pleurotus ostreatus*. Para los cultivos con la línea celular LAN-1, se observó una disminución en la confluencia celular (Figura 9). Además, se notaron algunos cambios en la morfología celular, como la forma redondeada, lo cual sugiere muerte celular. Esta

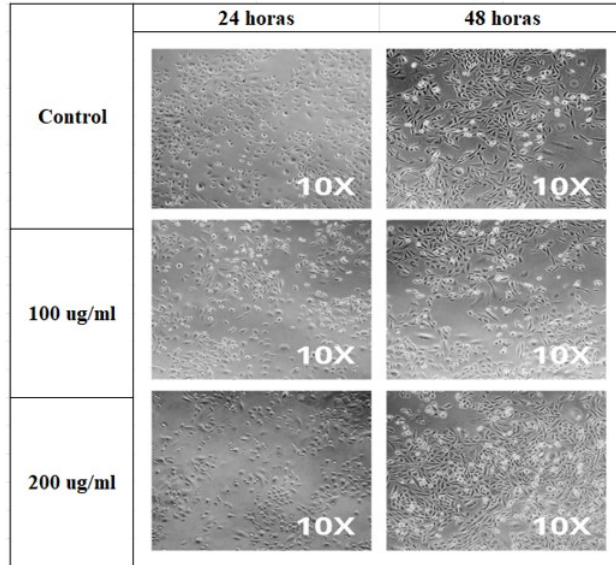


Figura 8: Resultados obtenidos para CHO exposición con *Agaricus Bisporus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas

observación fue más notoria a las 48 horas en comparación con el control. Al analizar el conteo celular, se puede notar la concordancia entre ambos resultados: en el control no hubo muerte celular, mientras que, bajo exposición con distintas concentraciones, se observó un menor crecimiento y presencia de células muertas (Cuadro 4). En comparación con los resultados obtenidos para *Agaricus bisporus*, el extracto de *Pleurotus ostreatus* mostró un efecto más pronunciado sobre la línea celular LAN-1.

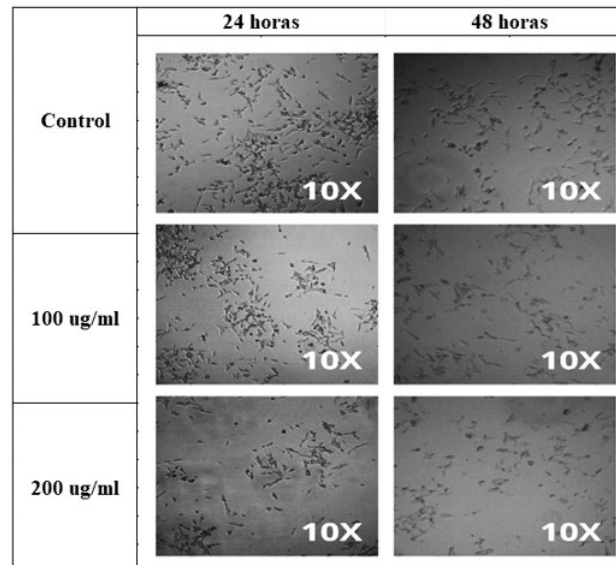


Figura 9: Resultados obtenidos para LAN-1 exposición con *Pleurotus Ostreatus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas

En la línea celular UFH-001 (Figura 10), al igual que en LAN-1 (Figura 9), se observó una inhibición en el crecimiento celular. Las células no se acumularon ni se aglomeraron tanto como en el control, lo que resultó en una población celular más dispersa. Además, se observó una mayor presencia de células muertas y un decrecimiento en la cantidad de células vivas del 60 %, indicando que el extracto de *Pleurotus ostreatus* tiene un efecto citotóxico sobre esta línea. Sin embargo, a diferencia de LAN-1, UFH-001 mostró una mejor tolerancia al extracto de *Pleurotus ostreatus*, ya que la inhibición del crecimiento fue menos intensa y la muerte celular no fue tan pronunciada. Los resultados fueron más evidentes a las 48 horas, con una mayor reducción en la población celular en comparación con *Agaricus bisporus*. Esto se puede ver claramente Cuadro 4.

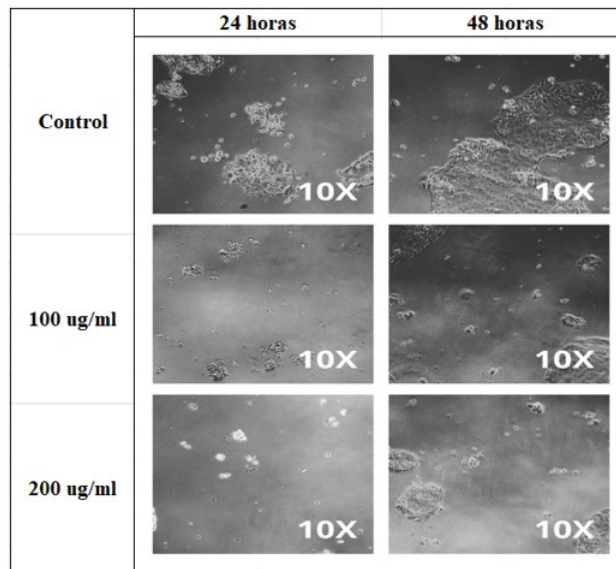


Figura 10: Resultados obtenidos para UFH-001 exposición con *Pleurotus Ostreatus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas

Finalmente, en cuanto a los resultados obtenidos para la línea celular CHO (Figura 11), no se observaron cambios en la morfología ni en la confluencia celular, lo que sugiere que probablemente no exista muerte celular. Sin embargo, hubo una leve inhibición del crecimiento, con una disminución del 15 %, aunque no tan pronunciada como en LAN-1 y UFH-001. Como se muestra en la Figura 11 y el Cuadro 4, a las 48 horas se observó que, de alguna forma, el extracto de *Pleurotus ostreatus* estimuló el crecimiento en las células.

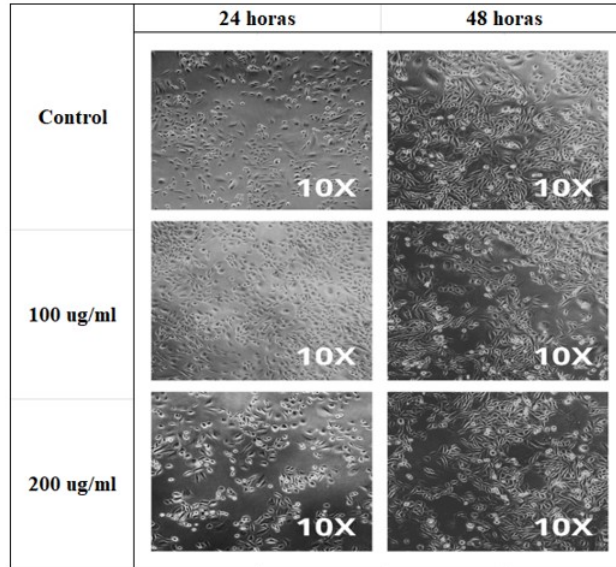


Figura 11: Resultados obtenidos para CHO exposición con *Pleurotus Ostreatus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas

Cuadro 4: % Viabilidad celular de tres líneas celulares para *Pleurotus ostreatus*

Tiempo	Concentración	CHO	LAN-1	UFH-001
24	Control	100.00	100.00	100.00
24	100 µg/ml	100.00	66.67	60.00
24	200 µg/ml	100.00	62.50	58.33
48	Control	100.00	100.00	100.00
48	100 µg/ml	100.00	66.67	60.00
48	200 µg/ml	100.00	58.33	60.00

#### 8.4. Concentraciones de ARN obtenidas luego de 24 y 48 horas de exposición para cultivos celulares

Con el objetivo de evaluar la expresión génica de los genes PUMA y BAX, se realizó una extracción de ARN después de 24 y 48 horas de cultivos celulares. Los resultados presentados en el Cuadro 5 muestran las concentraciones de ARN para *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* a las 24 y 48 horas, en distintas concentraciones.

En el caso de *Agaricus bisporus*, a las 24 horas, el control presenta valores entre 194 ng/µl y 288.2 ng/µl de ARN para CHO, y entre 292.4 ng/µl y 790.3 ng/µl para LAN-1, mientras que UFH-001 no muestra una diferencia marcada entre las diferentes condiciones evaluadas.

A las 24 horas, a medida que aumenta la concentración, se observa un incremento en las concentraciones de ARN: de 194 ng/µl a 288.2 ng/µl para CHO, de 292.4 ng/µl a 790.3 ng/µl para LAN-1 y de 257.9 ng/µl a 294.5 ng/µl para UFH-001.

A las 48 horas, los valores de ARN en CHO tienden a ser similares o mayores en las concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$  en comparación con el control, mientras que en LAN-1 se observa una disminución en la concentración de ARN a 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Cuadro 5: Concentración de ARN para *Agaricus bisporus*

Tiempo	Concentración	CHO (ng/ $\mu\text{l}$ )	LAN-1 (ng/ $\mu\text{l}$ )	UFH-001 (ng/ $\mu\text{l}$ )
24	Control	247.0	376.6	248.7
24	100 $\mu\text{g/ml}$	194.0	292.4	257.9
24	200 $\mu\text{g/ml}$	288.2	790.3	294.5
48	Control	228.9	359.8	233.8
48	100 $\mu\text{g/ml}$	247.1	318.6	269.8
48	200 $\mu\text{g/ml}$	253.0	305.9	282.8

Por otro lado, en el caso de *Pleurotus ostreatus*, a las 24 horas, el control muestra una alta concentración inicial de ARN, especialmente en la línea celular LAN-1, con un valor de 1252.9 ng/ $\mu\text{l}$ . Conforme aumenta la concentración del compuesto, se observa una redistribución, con un incremento en CHO (de 100.8 ng/ $\mu\text{l}$  en el control a 282.9 ng/ $\mu\text{l}$  con 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y un decremento en LAN-1 (de 1252.9 ng/ $\mu\text{l}$  en el control a 277.8 ng/ $\mu\text{l}$  con 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Para UFH-001, los valores no presentan grandes variaciones, oscilando entre 292.4 ng/ $\mu\text{l}$  en el control y 241.1 ng/ $\mu\text{l}$  con 100  $\mu\text{g/ml}$ .

A las 48 horas, los valores de ARN parecen estabilizarse en la concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , donde CHO alcanza 218.2 ng/ $\mu\text{l}$ , LAN-1 296.3 ng/ $\mu\text{l}$  y UFH-001 289.4 ng/ $\mu\text{l}$ . Sin embargo, con 200  $\mu\text{g/ml}$ , se observa una ligera disminución en todas las líneas celulares: CHO desciende a 203 ng/ $\mu\text{l}$ , LAN-1 a 261.4 ng/ $\mu\text{l}$  y UFH-001 a 212.4 ng/ $\mu\text{l}$ . Estos resultados se pueden apreciar con mayor claridad en el Cuadro 6.

Cuadro 6: Concentración de ARN para *Pleurotus ostreatus*

Tiempo	Concentración	CHO (ng/ $\mu\text{l}$ )	LAN-1 (ng/ $\mu\text{l}$ )	UFH-001 (ng/ $\mu\text{l}$ )
24	Control	100.8	1252.9	292.4
24	100 $\mu\text{g/ml}$	282.9	277.8	241.1
24	200 $\mu\text{g/ml}$	216.5	424.1	252.5
48	Control	153.6	271.5	125.1
48	100 $\mu\text{g/ml}$	218.2	296.3	289.4
48	200 $\mu\text{g/ml}$	203.0	261.4	212.4

## 8.5. Concentraciones de cADN obtenidas luego de 24 y 48 horas de exposición para cultivos celulares

Con el objetivo de evaluar la expresión génica de los genes PUMA y BAX, se realizó una extracción de cADN después de 24 y 48 horas de cultivos celulares. Los datos presentados en el Cuadro 7 no presentan una tendencia clara o evidente, ya que los valores obtenidos para cada una de las líneas están dispersos. Los valores varían desde 896.8 ng/ $\mu\text{l}$  hasta 2254.9 ng/ $\mu\text{l}$ .

Cuadro 7: Concentración de cADN para *Agaricus bisporus*

Tiempo	Concentración	CHO (ng/ $\mu$ l)	LAN-1 (ng/ $\mu$ l)	UFH-001 (ng/ $\mu$ l)
24	Control	896.8	1667.0	1078.5
24	100 $\mu$ g/ml	1251.8	1769.4	976.1
24	200 $\mu$ g/ml	819.8	1635.4	1251.6
48	Control	1976.7	1597.4	2254.9
48	100 $\mu$ g/ml	1655.7	1233.3	1965.7
48	200 $\mu$ g/ml	1750.7	1673.9	1633.9

Por otro lado, los resultados presentados en el Cuadro 8 no presentan una tendencia clara o evidente, ya que los valores obtenidos para cada una de las líneas están dispersos, a excepción de UFH-001, que presenta una tendencia para 48 horas, que es creciente. Los valores varían desde 820.2 ng/ $\mu$ l hasta 2012.4 ng/ $\mu$ l.

Cuadro 8: Concentración de cADN para *Pleurotus ostreatus*

Tiempo	Concentración	CHO (ng/ $\mu$ l)	LAN-1 (ng/ $\mu$ l)	UFH-001 (ng/ $\mu$ l)
24	Control	820.2	1696.0	1583.4
24	100 $\mu$ g/ml	902.3	1951.6	1491.2
24	200 $\mu$ g/ml	865.6	1868.8	1682.6
48	Control	1670.3	1219.9	1733.3
48	100 $\mu$ g/ml	1471.8	1658.9	1894.2
48	200 $\mu$ g/ml	1633.9	1542.8	2012.4

## 8.6. Amplificación génica de genes mediante un PCR convencional

Con el objetivo de amplificar los fragmentos de cADN asociados a la apoptosis celular, se realizaron una PCR en tiempo real y una qPCR para analizar la expresión de PUMA y BAX. En la Figura 12 se observa que no hubo un aumento en la expresión del gen PUMA a las 24 ni a las 48 horas tras la exposición con *Agaricus bisporus*. Por otro lado, a las 48 horas y con la exposición con *Pleurotus ostreatus* a una concentración de 200  $\mu$ g/mL, se observa un aumento en la expresión de dicho gen.

PCR para la línea celular CHO bajo exposición de *Agaricus Bisporus* y *Pleurotus Ostreatus* para PUMA

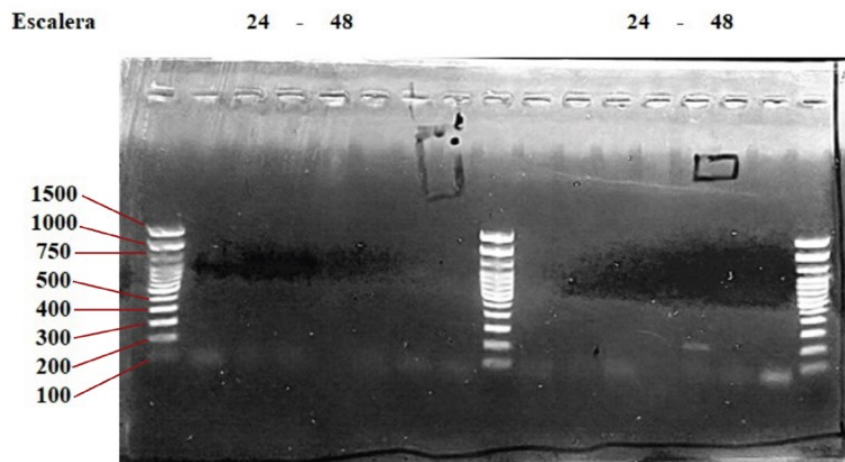


Figura 12: Expresión del gen PUMA tras la exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones y tiempos

Se observa en la Figura 13 que hubo un aumento en la expresión del gen PUMA en la línea celular UFH-001 tanto a las 24 como a las 48 horas tras la exposición con *Agaricus bisporus*, específicamente a una concentración de 100 ug/mL a las 24 horas y de 200 ug/mL a las 48 horas. Por otro lado, a las 24 horas, con la exposición con *Pleurotus ostreatus* a una concentración de 100 ug/mL, también se observa un aumento del gen en la misma línea celular.

PCR para la línea celular UFH-001 bajo exposición de *Agaricus Bisporus* y *Pleurotus Ostreatus* para PUMA

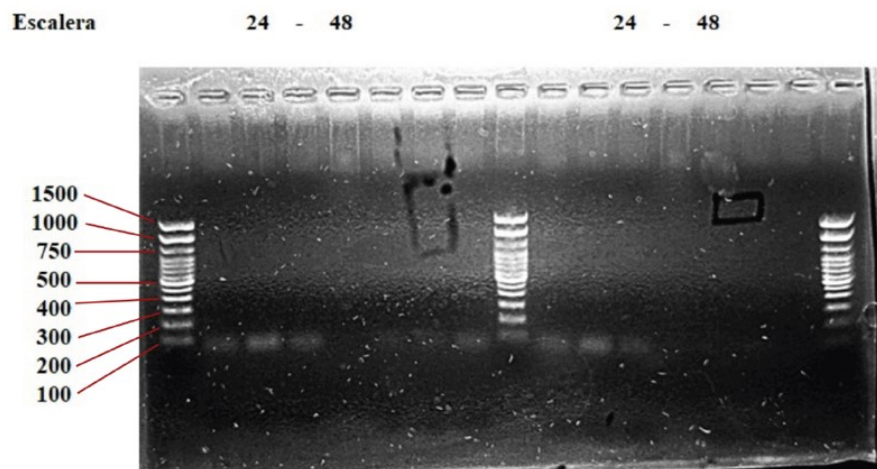


Figura 13: Expresión del gen PUMA en la línea celular UFH-001 tras la exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones y tiempos

Se visualiza en la Figura 14 que hubo sobreexpresión del gen PUMA en la línea celular LAN-1 tanto a las 24 como a las 48 horas tras la exposición con *Agaricus bisporus*, específicamente a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 24 horas y el control a las 48 horas. Por otro lado, con la exposición de *Pleurotus ostreatus*, a las 24 horas se observa una sobreexpresión del gen a concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que a las 48 horas también se observa un aumento en la expresión en ambas concentraciones.

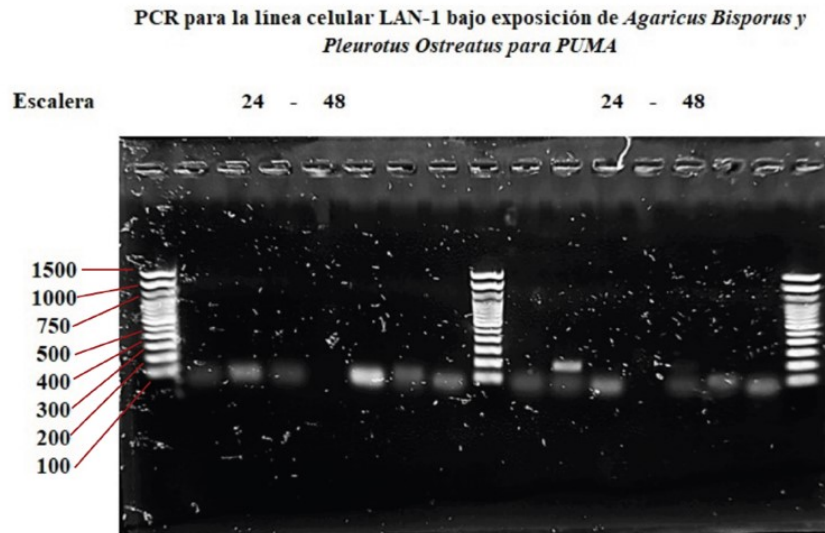


Figura 14: Expresión del gen PUMA en la línea celular LAN-1 tras la exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones y tiempos

Se observa en la Figura 15 que hubo un aumento en la expresión del gen BAX a las 24 horas tras la exposición con *Agaricus bisporus* en la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para el resto de los tiempos y con las otras concentraciones no se observó un aumento en la expresión del gen.

PCR para la línea celular CHO bajo exposición de *Agaricus Bisporus* y  
*Pleurotus Ostreatus* para BAX

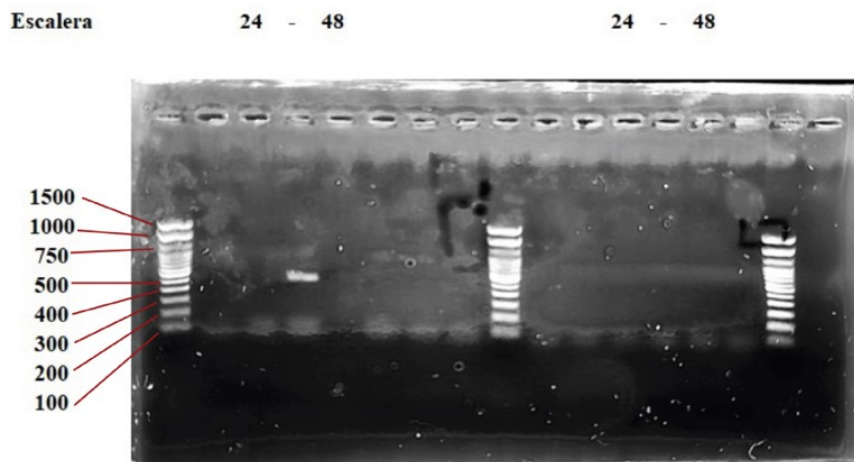


Figura 15: Expresión del gen BAX tras la exposición con *Agaricus bisporus* a diferentes concentraciones y tiempos

En la Figura 16, se visualiza que para las 24 y 48 horas de exposición con *Agaricus bisporus* hubo sobreexpresión del gen en los dos controles, en las dos concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en la concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 24 horas. Por otro lado, para *Pleurotus ostreatus*, se observa un aumento en la expresión, específicamente a las 24 horas en las dos concentraciones y el control.

PCR para la línea celular UFH-001 bajo exposición de *Agaricus Bisporus* y  
*Pleurotus Ostreatus* para BAX

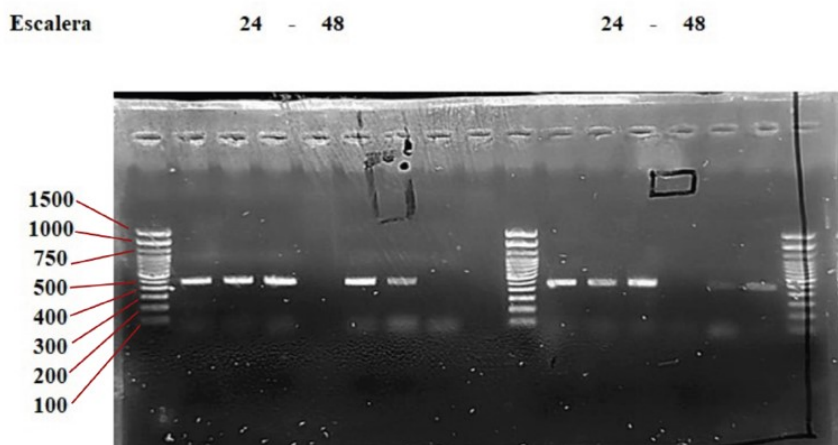


Figura 16: Sobreexpresión del gen BAX tras la exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones y tiempos

Se evidencia en la Figura 17 que, para la línea celular LAN-1, se obtuvo un aumento en la expresión del gen a las 48 horas bajo la exposición con *Agaricus bisporus*. A las 24 y

48 horas, se observó un aumento en la expresión en todas las concentraciones, así como en el control y en 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el caso de *Pleurotus ostreatus*, la sobreexpresión se observó únicamente a las 48 horas para el control y la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

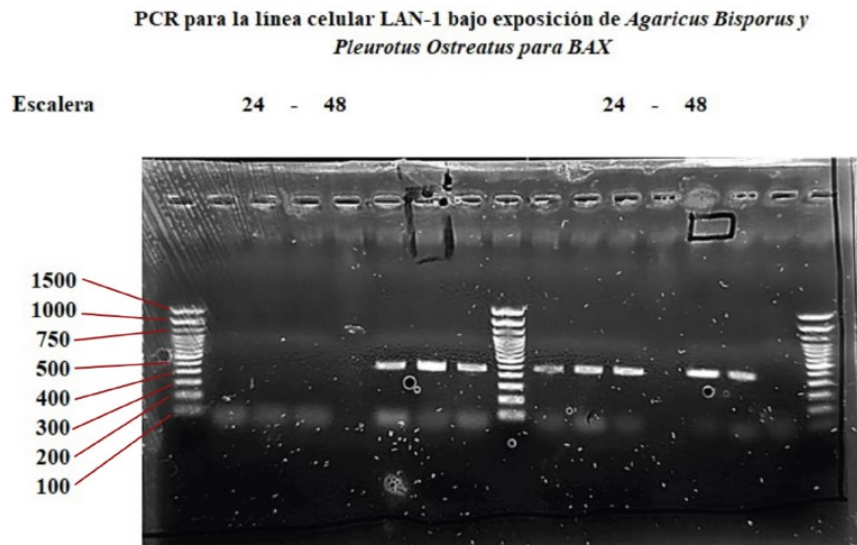


Figura 17: Expresión del gen en la línea celular LAN-1 tras la exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones y tiempos

## 8.7. Cuantificación génica de genes de interés mediante qPCR

Los resultados sugieren que el marcador BAX (Figura 8.7) podría no ser ideal para evaluar la viabilidad celular en todas las condiciones experimentales. A las 24 y 48 horas, BAX se expresó principalmente en el control y, de manera más evidente, en la línea celular LAN-1, mientras que en otras condiciones su expresión fue menos marcada. Esto sugiere que BAX puede no estar directamente relacionado con los procesos de muerte celular en estas condiciones específicas. Por otro lado, se observó que PUMA presenta un comportamiento diferente, por lo que sería importante analizar en detalle en qué momentos ambos marcadores, BAX y PUMA, se expresan y cuál es su relación con la viabilidad celular.

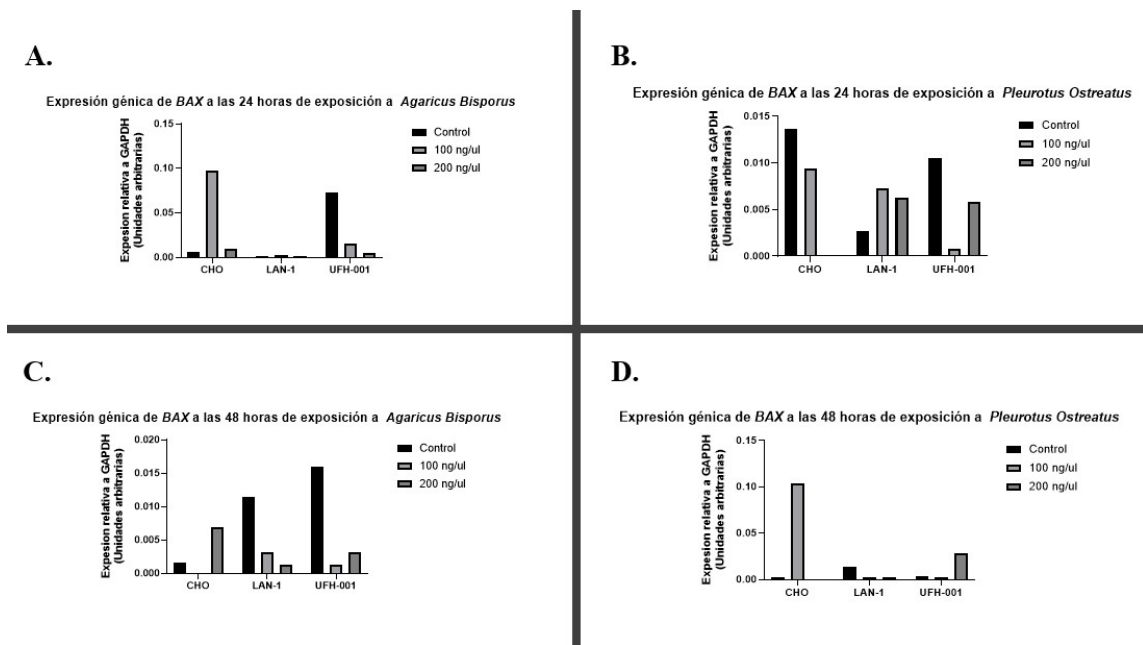


Figura 18: A. Expresión génica de BAX para *Agaricus bisporus* para 24 horas. B. Expresión génica de BAX para *Pleurotus ostreatus*, para 24 horas. C. Expresión génica de BAX para *Agaricus bisporus* para 48 horas. D. Expresión génica de BAX para *Pleurotus ostreatus*, para 48 horas.

Por otro lado, los resultados de la expresión génica del gen PUMA (Figura 19), evaluados mediante qPCR tras 24 y 48 horas de exposición a *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, muestran que a las 24 horas no se observan diferencias significativas entre el control y las condiciones tratadas, con un rango de expresión disperso que oscila entre 0.18 y 0.1, sugiriendo que PUMA no es un marcador confiable en este tiempo. Sin embargo, a las 48 horas se evidencia un incremento en la expresión del gen, indicando un efecto más directo de los hongos. En *Agaricus bisporus*, CHO mostró una expresión de 0.12 con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que LAN-1 presentó niveles bajos con ambas concentraciones. Por otro lado, *Pleurotus ostreatus* indujo una mayor expresión de PUMA en CHO. A pesar de esto, para CHO con el ensayo MTT no se observó muerte celular, lo que sugiere que la expresión génica podría no estar directamente relacionada con la citotoxicidad observada.

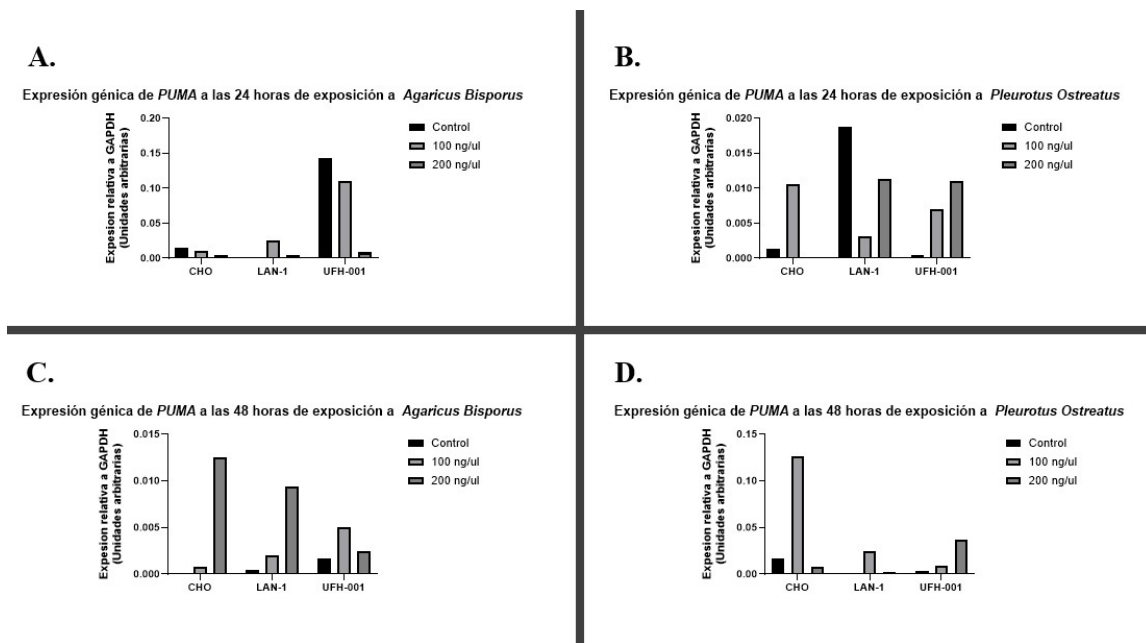


Figura 19: A. Expresión génica de PUMA para *Agaricus bisporus* para 24 horas. B. Expresión génica de PUMA para *Pleurotus ostreatus*, para 24 horas. C. Expresión génica de PUMA para *Agaricus bisporus* para 48 horas. D. Expresión génica de PUMA para *Pleurotus ostreatus*, para 48 horas.

## 8.8. Evaluación de citotoxicidad mediante ensayo MTT

Con el objetivo de evaluar la citotoxicidad de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, se llevó a cabo una prueba MTT cuyos resultados se encuentran detallados en la Figura 20. Para *Agaricus bisporus*, en LAN-1 se observó una disminución significativa de la viabilidad celular a las 48 horas, alcanzando 50 % a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.0378, *$ ). En UFH-001, la reducción fue aún más marcada, con valores de 40 % a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.0028, **$ ) y 30 % a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.0011, **$ ), reflejando que los efectos tóxicos fueron más pronunciados en UFH-001 a tiempos prolongados y concentraciones altas.

Por otro lado, para *Pleurotus ostreatus*, los mayores efectos se observaron a las 24 horas. En LAN-1, la viabilidad celular disminuyó a 40 % con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.0007, ***$ ) y a 30 % con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.0015, **$ ). En UFH-001, aunque los efectos fueron menos severos, se detectó una disminución significativa a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (60 %,  $p = 0.0290, *$ ). A las 48 horas, los efectos sobre LAN-1 fueron menores, con una disminución significativa únicamente a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (60 %,  $p = 0.0295, *$ ), mientras que en UFH-001 se mantuvo una reducción importante a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (50 %,  $p = 0.0103, *$ ).

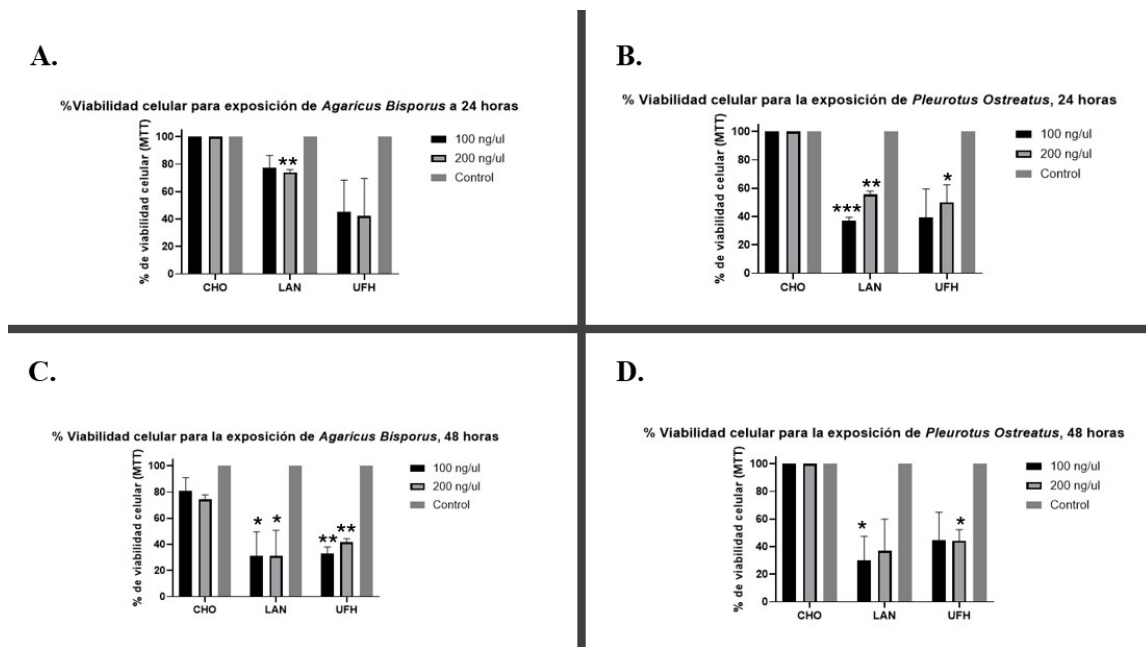


Figura 20: Resultados obtenidos para MTT exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas. A. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con *Agaricus bisporus* a 24 horas. B. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con *Pleurotus ostreatus* a 24 horas. C. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con *Agaricus bisporus* a 48 horas. D. Porcentaje de viabilidad obtenido para MTT exposición con *Pleurotus ostreatus* a 48 horas

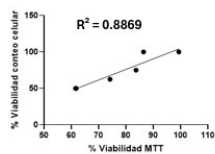
## 8.9. Regresión lineal entre la viabilidad celular obtenida en el conteo vs la viabilidad obtenida en el ensayo MTT

Con el objetivo de estudiar la relación entre los resultados obtenidos por el conteo celular y el ensayo de MTT, se realizó una regresión lineal para determinar qué tan estrecha es la relación entre ambas variables. En la Figura 21, se observa para las gráficas A, B, C y D que existe una relación positiva, con una correlación fuerte y directa entre los porcentajes de viabilidad celular obtenidos por conteo y los medidos mediante el ensayo de MTT. Esto indica que, a mayor viabilidad observada en el ensayo de MTT, mayor es el número de células vivas contadas. El valor obtenido para la correlación refuerza que la relación en el modelo es sólida, dado que se aproxima a uno, lo cual confirma que el modelo utilizado para evaluar la viabilidad celular en ambas especies estudiadas es adecuado.

Además, se observa que el modelo basado en *Pleurotus ostreatus* muestra mejores resultados a las 24 horas, mientras que el modelo basado en *Agaricus bisporus* demuestra una mayor eficiencia a las 48 horas. Estos hallazgos destacan la utilidad de ambos métodos y la importancia de considerar las diferencias en el tiempo y las especies para evaluar la viabilidad celular de manera precisa.

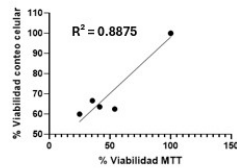
**A.**

Dispersión entre %viabilidad MTT y % viabilidad conteo celular para *Agaricus Bisporus* a 24 horas



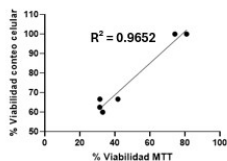
**B.**

Dispersión entre %viabilidad MTT y % viabilidad conteo celular para *Pleurotus Ostreatus* a 24 horas



**C.**

Dispersión entre %viabilidad MTT y % viabilidad conteo celular para *Agaricus bisporus* a 48 horas



**D.**

Dispersión entre %viabilidad MTT y % viabilidad conteo celular para *Pleurotus ostreatus* a 48 horas

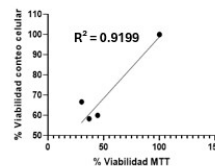


Figura 21: Resultados obtenidos para la dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, bajo distintas concentraciones para 24 y 48 horas. A. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con *Agaricus bisporus* para 24 horas. B. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con *Pleurotus ostreatus* para 24 horas. C. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con *Agaricus bisporus* para 48 horas. D. Dispersión entre la viabilidad celular de la MTT y del conteo celular exposición con *Pleurotus ostreatus* para 48 horas

A nivel mundial, se prevé un aumento del 60% en los casos de cáncer en las próximas décadas, lo que impactará en los sistemas de salud, así como en las personas y comunidades, con consecuencias mayores para los países de ingresos bajos y medios [1]. Actualmente, existe una gran variedad de tratamientos contra el cáncer que, si bien han demostrado ser efectivos, también presentan numerosos efectos secundarios que afectan la calidad de vida de los pacientes [16]. Debido a la alta incidencia de estos efectos secundarios, se ha comenzado a investigar tratamientos alternativos y complementarios, incluyendo el uso de hongos [17].

Estudios previos han demostrado que especies de hongos como *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes* y *Grifola frondosa* poseen propiedades anticancerígenas y antitumorales [58]. En el caso de *Ganoderma lucidum*, se ha identificado que los triterpenos poseen citotoxicidad frente a líneas celulares como Meth-A (sarcoma) y LLC (linfoma de Lewis) [59]. Por otro lado, para *Trametes versicolor* se ha determinado que esta especie tiene un efecto citotóxico sobre las líneas celulares A375 y SK-MEL-5 (melanoma) [60]. En ambas especies fue posible observar muerte celular e inhibición del crecimiento celular, atribuibles al daño provocado en el ADN de las células [59][60]. Sin embargo, estos hongos suelen ser de difícil acceso, ya que son silvestres y comúnmente complicados de cultivar en condiciones in vitro y controladas. Además, muchas de estas especies no son propias de ciertas áreas geográficas, lo que dificulta aún más su obtención y producción a gran escala. Por ello, el uso de especies comerciales de hongos podría representar una alternativa viable para superar estas limitaciones y facilitar su estudio y aplicación en el ámbito médico y científico. En efecto se ha observado que los hongos comestibles Champiñón *Agaricus bisporus* y Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) podrían tener propiedades anti-cancerígenas. Estas dos cepas fueron seleccionadas por sus propiedades medicinales, ya que se ha demostrado que poseen características anticancerígenas y antitumorales [18] [61].

*Pleurotus ostreatus* (hongo ostra) y *Agaricus bisporus* (hongo champiñón) son dos hongos conocidos por sus propiedades anticancerígenas y antitumorales, gracias a sus altos conteni-

dos de compuestos bioactivos, como los  $\beta$ -glucanos. En *Pleurotus ostreatus*, los  $\beta$ -glucanos estimulan células inmunitarias como linfocitos NK y monocitos, mejorando la vigilancia inmunitaria y mostrando una inhibición del 100 % en líneas celulares de sarcoma 180 y del 90 % en carcinoma de Ehrlich. Además, compuestos como la arabinosa y el pleuran presentan efectos antiinflamatorios y bactericidas que ayudan a reducir la inflamación crónica asociada con el cáncer. En estudios preclínicos, *Pleurotus ostreatus* ha demostrado mejorar la actividad de las células NK, lo que potencia la respuesta del sistema inmunológico y reduce el tamaño y proliferación de tumores [62] [63]. Por otro lado, *Agaricus bisporus* también contiene  $\beta$ -glucanos que refuerzan la respuesta inmunitaria, activando macrófagos, linfocitos T y células NK. Extractos de este hongo han mostrado inducir la apoptosis en células tumorales y reducir la proliferación celular, especialmente en modelos de cáncer de colon y mama. Sus compuestos antioxidantes, como terpenos y fenoles, protegen las células sanas del daño oxidativo, limitando así la formación de tumores. En un ensayo clínico de fase I con pacientes con cáncer de próstata, *Agaricus bisporus* redujo los niveles de PSA, sugiriendo su potencial para ralentizar la progresión de este tipo de cáncer. Aunque la evidencia sigue siendo preliminar en otros tipos de cáncer, ambos hongos muestran propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y antitumorales, posicionándolos como prometedores coadyuvantes en terapias contra el cáncer, aunque se requieren más estudios para confirmar estos efectos [64].

En este contexto, en este estudio se propuso realizar un extracto de los hongos *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* para evaluar sus propiedades anticancerígenas mediante un estudio in vitro utilizando tres líneas celulares, entre ellas dos cancerígenas: LAN-1 (Neuroblastoma) y UFH-001 (cáncer de mama), como también una línea celular derivada de Ovario de Hámster, CHO. Para obtener el extracto, se utilizó el método de maceración sólido-líquido, logrando obtener 1.71 g de extracto de *Agaricus bisporus* y 1.79 g de *Pleurotus ostreatus* tras el proceso de liofilización. Se observó que el peso del extracto de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus* fueron similares, a pesar de que los contenidos de humedad varían entre los hongos, siendo 92.4 % para *Pleurotus ostreatus* comparado con el 91.4 % de *Agaricus bisporus*; esta diferencia del 1 % podría haber causado la variación en los pesos de cada cepa [18] [61]. La maceración sólido-líquido fue empleada debido a que es una técnica económica y común que permite obtener el extracto con sus compuestos bioactivos [42], sin embargo, presenta desventajas como largos tiempo de extracción y alta cantidad de disolventes [65].

Después de obtener el extracto, se expusieron las líneas celulares LAN-1, UFH-001 y CHO con el objetivo de evaluar la citotoxicidad de los extractos y cambios en la expresión génica de genes pro-apoptóticos. Para estudiar la citotoxicidad, se realizaron estudios de viabilidad celular, como el conteo celular y el ensayo MTT. En el estudio “Anticancer Activities of Mushrooms: A Neglected Source for Drug Discovery”, se observó que para las células de cáncer de mama (MCF-7), los extractos de hongos reducen su viabilidad y promueven la apoptosis. En las células de cáncer de pulmón (A549), los estudios indicaron que los extractos pueden inhibir su crecimiento e inducir muerte celular. Asimismo, para las células de cáncer de colon (HT-29), se reportó un efecto citotóxico significativo, con reducción de la viabilidad celular y alteraciones en la proliferación. En contraste, las células no cancerosas (MCF-10A) presentaron una alta viabilidad, lo que indica un efecto selectivo de los extractos hacia las células tumorales [64]. Asimismo, en los ensayos MTT realizados en líneas celulares como MCF-7, A549 y HT-29, se reportaron resultados prometedores. Por ejemplo, los extractos de

*Grifola frondosa* demostraron reducir la viabilidad celular en un 50 % o más, promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activando vías apoptóticas. En las células A549, los extractos de *Ganoderma lucidum* disminuyeron significativamente la viabilidad celular, con un IC50 que refleja su potente actividad antitumoral e inducción de apoptosis a través de la activación de caspasas. En HT-29, los extractos de *Phellinus rimosus* y otros hongos mostraron una reducción en la viabilidad celular con un efecto dosis-dependiente, inhibiendo el crecimiento y alterando la expresión de genes relacionados con la proliferación y apoptosis [64].

A las 24 horas, en el conteo celular para LAN-1, se observó que la exposición con 200 µg/ml mostró una disminución en la viabilidad celular, alcanzando un 62.5 % con *Pleurotus ostreatus* y un resultado similar con *Agaricus bisporus*. En la línea UFH-001, *Agaricus bisporus* demostró un mejor desempeño, reduciendo la viabilidad celular al 50 %, mientras que *Pleurotus ostreatus* mostró un valor ligeramente superior, del 58.33 %. Por otro lado, las células no cancerosas (CHO) mantuvieron una viabilidad del 100 %, sin cambios significativos en comparación con el control. Estos resultados a 24 horas sugieren que *Agaricus bisporus* tiene un mayor efecto citotóxico inicial en la línea UFH-001, mientras que *Pleurotus ostreatus* mantiene un desempeño constante tanto en LAN-1 como en UFH-001.

A las 48 horas, en el conteo celular para LAN-1, *Pleurotus ostreatus* presentó un mejor desempeño, reduciendo la viabilidad celular al 58.33 %, mientras que *Agaricus bisporus* mostró un valor de 62.5 %. En la línea UFH-001, *Pleurotus ostreatus* mantuvo una viabilidad del 60 %, mientras que *Agaricus bisporus* presentó una recuperación leve, con una viabilidad de 66.666 % a 200 µg/ml. Nuevamente, las células no cancerosas (CHO) permanecieron sin cambios en su viabilidad, manteniéndose al 100 %, lo que refuerza la selectividad citotóxica de los metabolitos bioactivos de ambos hongos hacia las células tumorales. Entre los metabolitos bioactivos presentes en los extractos de estos hongos se encuentran los polisacáridos, conocidos por sus propiedades inmunomoduladoras y anticancerígenas al estimular el sistema inmunológico y promover la apoptosis en células tumorales; los terpenoides, que interfieren con las vías de señalización celular e inducen la muerte celular en líneas cancerosas; los fenoles, que actúan como antioxidantes reduciendo la proliferación tumoral; los esteroides y alcaloides, que afectan la proliferación celular y promueven la apoptosis, y los ácidos grasos, con propiedades antiinflamatorias que podrían modular el crecimiento tumoral [64].

Por otro lado, cuando se analizó la morfología celular, se observaron cambios en la morfología y en la forma de agrupación para LAN-1 y UFH-001. En particular, para LAN-1, las células adoptaron una forma más redonda en comparación con su aspecto estrellado original, asimilando neuritas de neurona. En UFH-001, se observó un cambio en el patrón de aglomeración, siendo posible visualizar cómo había más células solas en comparación con el control; a diferentes concentraciones, las células aparecieron más dispersas, siendo este efecto más notable a 200 µg/ml. A concentraciones mayores, los extractos de hongos pueden aumentar la disponibilidad de compuestos bioactivos, lo que potencia su efecto antiproliferativo sobre las células cancerosas. Estas concentraciones elevadas pueden facilitar la activación de vías de señalización que inducen apoptosis y reducen la viabilidad celular en tumores. Sin embargo, es crucial equilibrar la dosis, ya que concentraciones excesivas pueden resultar en toxicidad para células sanas [64]. Al igual que en LAN-1, se observó un cambio en la morfología de UFH-001, pasando de una forma de rombo a una más circular, lo que podría sugerir muerte celular. Este cambio también fue observado en un estudio previamente realizado con hon-

gos extremófilos, en el cual se determinó que los metabolitos bioactivos inducen apoptosis y pérdida de la estructura celular como mecanismos de acción citotóxica [66]. Para ambas líneas celulares, se observó una inhibición en el crecimiento, especialmente evidente a las 48 horas. Los cambios fueron más evidentes a 48 horas debido a la mayor exposición a estos agentes bioactivos. En contraste, en la línea CHO no se observaron cambios en la morfología ni en la inhibición del crecimiento celular. Es posible que a tiempos de incubación mayores se disminuya aún más la confluencia celular y que predominen los cambios en la morfología observados.

Para respaldar los resultados obtenidos en el conteo celular, se realizó la prueba de MTT a las 24 y 48 horas para verificar la citotoxicidad de los extractos de hongos. A las 24 horas de exposición, se observó que el extracto de *Pleurotus ostreatus* mostró una correlación positiva entre el porcentaje de viabilidad celular obtenido en el ensayo MTT y el obtenido en el conteo celular, indicando que ambas metodologías arrojaron resultados consistentes. Por otro lado, *Agaricus bisporus* presentó una correlación menos consistente; al aumentar el porcentaje de viabilidad en MTT, se observó una disminución en el porcentaje de viabilidad en el conteo celular. Esto podría deberse a una mayor dispersión en los datos y menor precisión en los valores de viabilidad celular en MTT a las 24 horas, posiblemente debido a variaciones en el procedimiento de siembra, exposición de las células o cambios en las condiciones durante la prueba. La actividad observada para ambos hongos puede atribuirse a las características bioquímicas y bioactivas específicas de cada especie, impactando de diferentes maneras [67].

A las 48 horas, la correlación para ambos extractos fue positiva, lo que indica que el porcentaje de viabilidad celular en MTT y el del conteo celular están relacionados, mostrando mejores resultados con mayor tiempo de exposición. A diferencia de las 24 horas, a las 48 horas el extracto de *Agaricus bisporus* mostró un mejor desempeño en comparación con *Pleurotus ostreatus*. Se observó que, en la mayoría de los casos, la concentración de 100 µg/ml presentó los resultados más significativos a las 48 horas.

En ambas pruebas, tanto a las 24 como a las 48 horas, se observó que el porcentaje de viabilidad celular en MTT disminuía drásticamente en las líneas celulares tumorales en comparación con la línea celular CHO, cuyo porcentaje de viabilidad se mantuvo alto y constante. Esto fue especialmente notable en el caso de *Pleurotus ostreatus*, donde el porcentaje de viabilidad de CHO se mantuvo al 100 %.

Para observar que estaba sucediendo a nivel molecular, se estudió la expresión génica de los genes BAX y PUMA, esto demostraron en los resultados obtenidos demuestran que BAX no es un marcador universalmente confiable para evaluar la viabilidad celular bajo todas las condiciones experimentales. A las 24 y 48 horas, BAX mostró una mayor expresión en el control y en la línea celular LAN-1, pero una menor expresión en las demás condiciones experimentales. Este comportamiento es consistente con estudios previos que resaltan que la activación de BAX depende de señales específicas que activan la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, procesos esenciales para la apoptosis intrínseca. Sin embargo, en ciertos contextos, como las líneas celulares resistentes al estrés, BAX puede no desempeñar un papel prominente, ya que su activación está regulada por un balance dinámico entre proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, como Bcl-2 [68][69].

En contraste, la expresión de PUMA, evaluada mediante qPCR, mostró un comportamiento diferente. A las 24 horas no se observaron diferencias significativas en su expresión

entre el control y las condiciones tratadas, sugiriendo que PUMA no es un marcador sensible en fases iniciales de la exposición a los extractos de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus*. Sin embargo, a las 48 horas se detectó un incremento significativo en su expresión, particularmente en CHO con *Pleurotus ostreatus*. Este comportamiento es consistente con el papel de PUMA como un mediador inducido por p53 que activa a BAX y otras proteínas pro-apoptóticas para iniciar la apoptosis[68][69]. La ausencia de muerte celular en CHO, pese al aumento en la expresión de PUMA, podría explicarse por mecanismos compensatorios que impiden la activación completa de la vía apoptótica, como la regulación diferencial de caspasas o la interacción con factores de supervivencia. Por lo tanto, los resultados muestran que la respuesta en las líneas celulares tumorales (LAN-1 y UFH-001) es diferente, lo que sugiere una especificidad en los mecanismos de acción de los extractos.

Esta especificidad podría deberse a la composición bioactiva de los extractos de *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus*, ricos en compuestos como polisacáridos y terpenoides, que modulan las vías de señalización celular de manera distinta según el tipo de célula. Estos resultados están alineados con investigaciones que destacan el papel de los hongos medicinales en la inducción de apoptosis y la inhibición de la proliferación tumoral mediante vías específicas de señalización [69] hallazgos subrayan que, aunque BAX y PUMA son marcadores clave en los procesos apoptóticos, su expresión no siempre refleja directamente la citotoxicidad o la viabilidad celular bajo condiciones experimentales específicas. Por lo tanto, es crucial integrar estos datos con ensayos adicionales, como la activación de caspasas y la evaluación funcional de las células, para obtener una comprensión más completa de los efectos de los tratamientos. La variabilidad observada también resalta la necesidad de considerar las diferencias entre tipos celulares y tiempos de exposición al interpretar estos marcadores en estudios futuros [68][69].

1. El presente estudio permitió obtener extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* mediante una metodología de maceración y liofilización previamente establecida. Aunque el rendimiento del proceso de extracción fue similar para ambas especies, se obtuvieron 1.71 g de extracto para *Agaricus bisporus* (0.684 %) y 1.79 g para *Pleurotus ostreatus* (0.716 %). Esta diferencia puede estar influenciada por la cantidad de humedad presente en las especies o por el método utilizado, lo cual resulta relevante para optimizar procesos de obtención de metabolitos bioactivos.
2. La viabilidad celular evaluada mediante el conteo celular mostró que ambos hongos afectan principalmente a las líneas cancerígenas. A las 24 horas, *Agaricus bisporus* redujo la viabilidad de UFH-001 al 50 %, mientras que *Pleurotus ostreatus* mostró una reducción del 58.33 % en LAN-1. A las 48 horas, *Pleurotus ostreatus* presentó un mejor desempeño en LAN-1, con una viabilidad de 58.33 %. Estos resultados evidencian el efecto diferencial de los extractos según el tipo de línea celular, aportando evidencia sobre su potencial acción selectiva.
3. Los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* demostraron efectos citotóxicos en las líneas celulares cancerígenas LAN-1 y UFH-001, disminuyendo significativamente su viabilidad celular. En contraste, la línea celular CHO mantuvo una viabilidad cercana al 100 %, indicando la selectividad citotóxica de los extractos y su potencial anticancerígeno. Este comportamiento sugiere la presencia de compuestos bioactivos con actividad específica contra células tumorales, sin afectar notablemente células sanas.
4. Los resultados de los extractos en las pruebas con LAN-1, UFH-001 y CHO sugieren que estos hongos contienen metabolitos capaces de inducir apoptosis selectiva en células tumorales. Este hallazgo refuerza la utilidad de los hongos como fuentes naturales para el desarrollo de agentes terapéuticos con acción dirigida, lo que responde a la necesidad de terapias menos invasivas y más eficaces.
5. La expresión génica evaluada mediante qPCR mostró que el marcador BAX no presentó una correlación consistente con la viabilidad celular en todas las condiciones

experimentales, lo que indica que su utilidad como marcador universal puede ser limitada. En contraste, PUMA mostró un aumento significativo en su expresión a las 48 horas, especialmente en la línea celular CHO tratada con *Pleurotus ostreatus*. Este comportamiento podría atribuirse a mecanismos compensatorios en CHO, como la regulación diferencial de caspasas o la interacción con factores de supervivencia, que impiden la activación completa de la vía apoptótica, a pesar del incremento en la expresión de PUMA. Estos resultados permiten inferir que PUMA podría desempeñar un papel más relevante en la regulación de la apoptosis inducida por los extractos, dependiendo del contexto celular.

6. En conjunto, los hallazgos obtenidos permiten establecer una conexión clara entre los efectos observados a nivel celular y molecular, respaldando la capacidad de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* para inducir citotoxicidad y apoptosis selectiva en células cancerígenas. Estos resultados proporcionan evidencia experimental del potencial de estas especies como fuentes de compuestos con actividad anticancerígena, cumpliendo así con los objetivos planteados en esta investigación.

1. Estudiar las propiedades bioquímicas de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus* para identificar los compuestos específicos responsables de la reducción de la viabilidad celular. Se sugiere emplear métodos como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS) para la separación e identificación de metabolitos secundarios. Posteriormente, realizar estudios funcionales con estos compuestos individuales en líneas celulares para determinar su actividad citotóxica. En el caso de *Pleurotus ostreatus*, enfocar los análisis en flavonoides, fenoles,  $\beta$ -glucanos, ergosterol y lectinas. Para *Agaricus bisporus*, investigar fenoles, lectinas, ácidos grasos insaturados y ergosterol.
2. Profundizar en los mecanismos de acción de los extractos de *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*, centrándose en la identificación de las rutas genéticas y los receptores implicados en la apoptosis. Se recomienda realizar pruebas funcionales adicionales, como inmunohistoquímica (IHQ) para identificar receptores específicos, la prueba TUNEL para evaluar fragmentación de ADN, y ensayos de Caspasas para confirmar la activación de vías apoptóticas. Estas pruebas permitirán complementar los resultados actuales y aportar una comprensión más detallada de los mecanismos moleculares subyacentes.
3. Ampliar las condiciones experimentales aumentando los tiempos de exposición y evaluando los extractos en una mayor variedad de líneas celulares tumorales y no tumorales. También se sugiere incluir controles adicionales y establecer un rango óptimo de tiempos de incubación para análisis de expresión génica. Estas medidas permitirán explorar con mayor detalle los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos y su selectividad hacia células tumorales.
4. Mantener estrictas condiciones de control para asegurar la reproducibilidad de los experimentos. Esto incluye conservar los extractos liofilizados en condiciones adecuadas, evitando la exposición a humedad o contaminantes que puedan afectar su calidad. Asegurar el uso de líneas celulares en pasajes bajos para minimizar variaciones, y documentar cuidadosamente las características químicas y físicas de los extractos, como

su pH, contenido de humedad y color, al momento de los experimentos. Estas medidas son cruciales para evitar sesgos en los resultados.

## Bibliografía

- 
- [1] O. P. de la Salud, *Día Mundial contra el Cáncer 2021: Yo Soy y voy a OPS/OMS*, Visitado el 6 de Mayo, 2024, Organización Panamericana de la Salud. dirección: <https://www.paho.org/es/campanas/dia-mundial-contra-cancer-2021-yo-soy-voy>.
- [2] N. C. Institute, *What Is Cancer?* Visitado el 5 de Mayo, 2024, National Cancer Institute. dirección: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#:~:text=Cancer%20is%20a%20disease%20caused>.
- [3] M. A. Knowles y P. J. Selby, *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Oxford University Press, 2005. dirección: [https://www.google.com.gt/books/edition/Introduction\\_to\\_the\\_Cellular\\_and\\_Molecul/\\_ZMUDAAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=Introduction+to+the+cellular+and+molecular+biology+of+cancer&printsec=frontcover](https://www.google.com.gt/books/edition/Introduction_to_the_Cellular_and_Molecul/_ZMUDAAAQBAJ?hl=es&gbpv=1&dq=Introduction+to+the+cellular+and+molecular+biology+of+cancer&printsec=frontcover).
- [4] CDC, *Cancer Treatments*, Visitado el 5 de Mayo, 2024, Cancer Survivors. dirección: [https://www.cdc.gov/cancer-survivors/patients/treatments.html?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/cancer/survivors/patients/treatments.htm](https://www.cdc.gov/cancer-survivors/patients/treatments.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/cancer/survivors/patients/treatments.htm).
- [5] M. Clinic, *Qué hay que saber sobre la cirugía contra el cáncer*, Visitado el 5 de Mayo, 2024, Mayo Clinic. dirección: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/cancer/in-depth/cancer-surgery/art-20044171>.
- [6] I. N. D. Cáncer, *Quimioterapia para tratar el cáncer*, Visitado el 5 de Mayo, 2024, Instituto Nacional Del Cáncer. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia#:~:text=La%20quimioterapia%20no%20solo%20destruye>.
- [7] I. N. D. Cáncer, *Radioterapia para el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer*, Visitado el 5 de Mayo, 2024, Instituto Nacional Del Cáncer. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia#:~:text=En%20dosis%20altas%2C%20la%20radioterapia>.
- [8] H.-T. Wu, F.-H. Lu, Y.-C. Su et al., “In Vivo and In Vitro Anti-Tumor Effects of Fungal Extracts,” *Molecules*, vol. 19, págs. 2546-2556, feb. de 2014. DOI: 10.3390/molecules19022546.

- [9] S. Wasser, “Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges,” *Biomedical Journal*, vol. 37, pág. 345, 2014. DOI: 10.4103/2319-4170.138318.
- [10] Y. A. Nevzorova, J. Grossmann y C. Trautwein, “Anti-tumorigenic and anti-angiogenic effects of natural conifer *Abies sibirica* terpenoids in vivo and in vitro,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 89, págs. 386-395, mayo de 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.035. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332216319898>.
- [11] P. Pandey, F. Khan, K. Yadav et al., “Screen natural terpenoids to identify potential Jab1 inhibitors for treating breast cancer,” *Trends in immunotherapy*, vol. 7, págs. 2055-2055, jun. de 2023. DOI: 10.24294/ti.v7.i1.2055.
- [12] A. Zajac, M. Pięć, D. Stefaniuk et al., “Pro-Health and Anti-Cancer Activity of Fungal Fractions Isolated from Milk-Supplemented Cultures of *Lentinus* (*Pleurotus*) *Sajorcaju*,” *Biomolecules*, vol. 11, pág. 1089, jul. de 2021. DOI: 10.3390/biom11081089.
- [13] N. R. Mužinić, M. V. Bratinčević, M. Grubić et al., “Golden Chanterelle or a Gold Mine? Metabolites from Aqueous Extracts of Golden Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) and Their Antioxidant and Cytotoxic Activities,” *Molecules*, vol. 28, págs. 2110-2110, feb. de 2023. DOI: 10.3390/molecules28052110.
- [14] I. N. de Estadísticas Guatemala, *Tasa de mortalidad de cancer por año*, Visitado el 6 de Mayo, 2024, Instituto Nacional de Estadísticas Guatemala. dirección: <https://www.ine.gob.gt/2019/04/12/tasa-de-mortalidad-de-cancer-por-ano/>.
- [15] M. Piñeros, M. Laversanne, E. Barrios et al., “An updated profile of the cancer burden, patterns and trends in Latin America and the Caribbean,” *The Lancet Regional Health - Americas*, vol. 13, pág. 100294, sep. de 2022. DOI: 10.1016/j.lana.2022.100294.
- [16] CDC, *Side Effects of Cancer Treatment*, Visitado el 6 de Julio, 2024, CDC. dirección: <https://www.cdc.gov/cancer-survivors/patients/side-effects-of-treatment.html>.
- [17] C. W. How, Y. S. Ong, S. S. Low, A. Pandey, P. L. Show y J. B. Foo, “How far have we explored fungi to fight cancer?” *Seminars in Cancer Biology*, vol. 86, págs. 976-989, nov. de 2022. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.03.009.
- [18] A. Cano-Estrada y L. Romero-Bautista, “Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres,” *Revista chilena de nutrición*, vol. 43, págs. 75-80, mar. de 2016. DOI: 10.4067/S0717-75182016000100011. dirección: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182016000100011](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182016000100011).
- [19] K. Ranta, K. Nieminen, T. Saariaho et al., “Evaluation of fungal extracts to determine immunomodulatory properties,” *National Institutes of Health*, vol. 23, págs. 226-33, ene. de 2013.
- [20] O. M. de la Salud, *Cáncer*, es, Visitado el 11 de Julio, 2024, 2022. dirección: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [21] I. N. del Cáncer, *Diccionario de cáncer del NCI*, Visitado el 11 de Julio, 2024, 2011. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia-maligna>.
- [22] J. Garza y P. Juárez, *El Cáncer*, 2014. dirección: <https://isbn.cloud/9786072702158/el-cancer/>.

- [23] I. N. del Cáncer, *Genética del cáncer*, Visitado el 12 de Julio, 2024, 2015. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>.
- [24] E. A. Iñaki Gutiérrez, *paliativossinfronteras.org*, 2016. dirección: <https://paliativossinfronteras.org/wp-content/uploads/04-LA-GENETICA-EN-EL-CANCER-gutierrez-col.pdf>.
- [25] N. H. G. R. Institute, *Gen supresor de tumores*, [Visitado el 14 de Julio, 2024], 2024. dirección: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen-supresor-de-tumores>.
- [26] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, 4th. Garland Science, 2002.
- [27] D. Hanahan y R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation,” en, *Cell*, vol. 144, n.º 5, págs. 646-674, mar. de 2011.
- [28] H. Albaba, T. A. Barnes, Z. Veitch et al., “Acceptability of routine evaluations using patient-reported outcomes of common terminology criteria for Adverse Events and other patient-reported symptom outcome tools in cancer outpatients: Princess Margaret Cancer Centre experience,” *Oncologist*, vol. 24, n.º 11, e1219-e1227, nov. de 2019.
- [29] I. A. for Research on Cancer, *Cancer management Cancer management Cancer management*, Visitado el 12 de Julio, 2024.
- [30] N. C. Institute, *Support for People with Cancer, Chemotherapy and you*, Visitado el 12 de Septiembre, 2024. dirección: <https://www.cancer.gov/publications/patient-education/chemo-and-you>.
- [31] M. T. Amjad, A. Chidharla y A. Kasi, “Cancer chemotherapy,” en *StatPearls*, Visitado el 12 de Septiembre, 2024, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, ene. de 2024.
- [32] C. R. UK, *How chemotherapy works*, Visitado el 13 de Septiembre, 2024. dirección: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/treatment/chemotherapy/how-chemotherapy-works>.
- [33] Cancer Council, *Understanding Radiation Therapy: A Guide for People with Cancer, Their Families and Friends*. Australia: Cancer Council, 1995.
- [34] C. M. West y G. C. Barnett, “Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: towards prediction,” en, *Genome Med.*, vol. 3, n.º 8, pág. 52, ago. de 2011.
- [35] M. Cepero De García, *Biología de hongos*. Universidad de los Andes, 2012.
- [36] N. Campbell y J. Reece, *Biología*. Editorial Médica Panamericana S.A., 2007.
- [37] H. Gonzáles, M. Serrano, G. Campos y G. Guzmán, *La experiencia de la familia González Serrano*, “Aspectos básicos en la producción de champiñones *Agaricus bisporus*,” 2012. dirección: <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-1539.pdf>.
- [38] B. Muszyńska, K. Kała, J. Rojowski, A. Grzywacz y W. Opoka, “Composition and biological properties of *Agaricus bisporus* fruiting bodies – a review,” *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, vol. 67, n.º 3, págs. 173-182, sep. de 2017.
- [39] L. K. Jagadish, V. V. Krishnan, R. Shenbhagaraman y V. Kaviyaranan, “Comparitive study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling,” en, *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 8, n.º 4, 2009.
- [40] V. G. G. Rubio, *Potencialidades de la ovinocultura y los hongos comestibles (*Pleurotos spp.*) en la seguridad alimentaria y el desarrollo rural*, es. Laberinto Ediciones, jun. de 2022.

- [41] G. de México y M. de agricultura, *MANUALES PRÁCTICOS PARA LA ELABORACIÓN DE BIOINSUMOS 10. Elaboración de Extractos Vegetales*, jun. de 2022. (visitado 18-11-2024).
- [42] V. Arciniegas Cabrera et al., “Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/agua presurizadas,” *Universidad de Burgos*, 2020.
- [43] B. Lewin, *Genes Tomo 1*, es, 1ra Edición. Barcelona, España: Reverté Ediciones, jun. de 2000.
- [44] Genetic Alliance y The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services, *Understanding genetics: A New York, Mid-Atlantic guide for patients and health professionals*, en. Washington (DC): Genetic Alliance, jul. de 2009.
- [45] B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, 6.<sup>a</sup> ed. New York, NY: Garland Publishing, nov. de 2014.
- [46] E. Passarge, *GENETICA TEXTO Y ATLAS*. Médica Panamericana, 2009. dirección: [https://books.google.com.mx/books?id=bgQ\\_xyJYkigC](https://books.google.com.mx/books?id=bgQ_xyJYkigC).
- [47] N. H. G. R. Institute, *Expresión génica*, 2024. dirección: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Expresion-genica>.
- [48] I. N. D. Cáncer, *Diccionario de cáncer del NCI*, [Visitado el 17 de Julio, 2024], 2011. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/retrotranscripcion>.
- [49] J. M. Coffin, S. H. Hughes y H. E. Varmus, *Retroviruses*, en, J. M. Coffin, S. H. Hughes y H. E. Varmus, eds. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, sep. de 1999.
- [50] *Diccionario de cáncer del NCI*, [Visitado el 18 de Julio, 2024], 2011. dirección: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/rt-pcr>.
- [51] I. M. Artika, Y. P. Dewi, I. M. Nainggolan, J. E. Siregar y U. Antonjaya, “Real-time polymerase chain reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis,” en, *Genes (Basel)*, vol. 13, n.º 12, pág. 2387, dic. de 2022.
- [52] N. H. G. R. Institute, *Primer*, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Primer>, [Visitado el 18 de Julio, 2024], 2024.
- [53] F. Wright y K. Fessele, “Primer in genetics and genomics, article 5-further defining the concepts of genotype and phenotype and exploring genotype-phenotype associations,” *Biol. Res. Nurs.*, vol. 19, n.º 5, págs. 576-585, oct. de 2017.
- [54] N. H. G. R. Institute, *Apoptosis*, [Visitado el 19 de Julio, 2024], 2024. dirección: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/apoptosis>.
- [55] A. G. Renehan, C. Booth y C. S. Potten, “What is apoptosis, and why is it important?” en, *BMJ*, vol. 322, n.º 7301, págs. 1536-1538, jun. de 2001.
- [56] T. Zhao, C. Zhao, Y. Lu et al., “Noxa and Puma genes regulated by hTERT promoter can mitigate growth and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma mouse model,” *J. Cancer*, vol. 13, n.º 6, págs. 2001-2013, mar. de 2022.

- [57] N. Kunac, N. Filipović, S. Kostić y K. Vukojević, “The expression pattern of Bcl-2 and Bax in the tumor and stromal cells in colorectal carcinoma,” en, *Medicina (Kaunas)*, vol. 58, n.º 8, pág. 1135, ago. de 2022.
- [58] I. N. del Cáncer, *Hongos Medicinales: Información para Pacientes (PDQ®)*, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca/paciente/hongos-pdq>, [Visitado el 28 de Noviembre, 2024], 2024.
- [59] A. Johnson, M. Williams y K. Brown, “A Cochrane Review of the Efficacy of Medicinal Mushrooms in Cancer Treatment,” *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 7, pág. CD007731, 2019. DOI: 10.1002/14651858.CD007731.pub3.
- [60] M. López-García, S. Fernández y L. Rodríguez, “Fungal Polysaccharides and Their Potential Anticancer Applications: A Molecular Perspective,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 160, págs. 212-223, 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.212123.
- [61] F. Atila, M. N. Owaid y M. A. Shariati, “THE NUTRITIONAL AND MEDICAL BENEFITS OF AGARICUS BISPORUS : A REVIEW,” *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 7, págs. 281-286, dic. de 2017. DOI: 10.15414/jmbfs.2017/18.7.3.281-286.
- [62] I. N. del Cáncer, *Hongos medicinales (PDQ®) – Información para profesionales de salud*, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca/pro/hongos-pdq>, [Visitado el 28 de Noviembre, 2024], 2024.
- [63] N. E. Ayala Sánchez, L. J. Villarreal Gómez, R. Rico Mora e I. E. Soria Mercado, “Los hongos como fuente de recursos farmacológicos: Ganoderma lucidum, Grifola frondosa y Pleurotus ostreatus,” *Repositorio Nacional CONACYT*, vol. 20, págs. 25-36, 2016.
- [64] T. Smith, J. Doe y R. Lee, “A Comprehensive Review of the Role of Fungal Metabolites in Cancer Therapy,” *Pharmaceuticals*, vol. 15, págs. 176-190, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceuticals15010176.
- [65] L. A. C. Naranjo y J. P. Neri, “Nanotecnología: fuente de nuevos paradigmas,” *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 7, n.º 12, págs. 45-49, 2014.
- [66] A. Kiss, F. Hariri Akbari, A. Marchev, V. Papp e I. Mirmazloum, “The Cytotoxic Properties of Extreme Fungis Bioactive Components An Updated Metabolic and Omics Overview,” *Life*, vol. 13, pág. 1623, jul. de 2023. DOI: 10.3390/life13081623. (visitado 21-11-2024).
- [67] D. Hamad, H. El-Sayed, W. Ahmed, H. Sonbol y M. A. H. Ramadan, “GC-MS Analysis of Potentially Volatile Compounds of Pleurotus ostreatus Polar Extract: In vitro Antimicrobial, Cytotoxic, Immunomodulatory, and Antioxidant Activities,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, feb. de 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.834525. (visitado 21-11-2024).
- [68] R. Fernández-Martínez y M. Sánchez-Varela, “Analysis of apoptotic pathways in neuroblastoma cells: Insights from Bax and PUMA expressions,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 24, n.º 6, págs. 3451-3463, 2023. DOI: 10.1016/j.cellmolmed.2023.x2253.

- [69] H. González, M. Serrano, G. Campos y G. Guzmán, “Targeting apoptotic markers in cancer therapy: A review of Bax and PUMA expressions,” *Dianas Moleculares en Terapias Antitumorales: Casos de Estudio*, vol. 10, págs. 123-135, 2020. DOI: 10.1007/s13556-020-0158.