
Evaluación de la actividad anticancerígena de extractos de especies endémicas de hongos de Guatemala en las líneas celulares de neuroblastoma Humano (LAN-1) y de cáncer de mama (UFH-001)

Luisa Fernanda Rivera López



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Facultad de Ciencias y Humanidades




Evaluación de la actividad anticancerígena de extractos de especies
endémicas de hongos de Guatemala en las líneas celulares de
neuroblastoma Humano (LAN-1) y de cáncer de mama (UFH-001)

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Luisa
Fernanda Rivera López para optar al grado académico de Licenciada en
Bioquímica y Microbiología


Guatemala,
2024

Vo.Bo.:

(f) 
Diego Archila, PhD.

Tribunal Examinador:

(f) 
Diego Archila, PhD.

(f) 
Patrizia Lupo, PhD.

(f) 
Krisztina Ríos, PhD.

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2024.

La elaboración del presente trabajo de graduación surge del interés de poner en práctica todos los conocimientos adquiridos a lo largo de la formación profesional en la Universidad del Valle de Guatemala y el deseo de contribuir a la generación de nuevo conocimiento sobre posibles tratamientos alternativos al cáncer.

Quiero agradecer principalmente a Dios y a mis padres, Ligia y Daniel, por todo el apoyo durante mi carrera universitaria. Agradezco cada esfuerzo realizado por ellos para que yo completara mis estudios, a mi hermana por su cariño y apoyo durante esta trayectoria.

A las instituciones involucradas en el trabajo de graduación. A la Universidad del Valle de Guatemala por brindarme todos los conocimientos y herramientas necesarias para formarme como profesional; a los catedráticos por compartir sus conocimientos y experiencias. Especialmente, me gustaría agradecer a mi asesor de tesis, Diego Archila PhD., por creer en mis habilidades y brindarme todo su apoyo. Además, quisiera agradecer a Patrizia Lupo PhD., directora de mi departamento, ya que su apoyo y conocimientos fueron importantes para la realización de este trabajo.

Finalmente, me gustaría agradecer a todas las personas que me acompañaron en este viaje, gracias por todo lo compartido, sin duda hicieron mi experiencia en la universidad única. A mis abuelos, César Francisco, Blanca Isabel y Marta Elena, por el amor y aprendizaje que fue esencial para alcanzar este gran logro, los llevo en el corazón siempre.

Prefacio	III
Lista de figuras	VIII
Lista de cuadros	IX
Resumen	X
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Justificación	4
4. Marco teórico	6
4.1. Hongos	6
4.1.1. Diversidad y clasificación de especies de hongos	6
4.1.2. Potencial terapéutico	10
4.1.3. Especies de hongos con propiedades anticancerígenas	10
4.2. Cáncer	15
4.2.1. Descripción	15
4.2.2. Invasión y metástasis	16
4.3. Tipos de cáncer	16
4.3.1. Carcinoma	17
4.3.2. Sarcomas	18
4.3.3. Leucemias	19
4.3.4. Linfomas	19
4.4. Epidemiología del cáncer	20
4.4.1. Mundial	20
4.4.2. Latinoamérica	20
4.4.3. Guatemala	21
4.5. Factores de riesgo	23
4.5.1. Intrínsecos	24
4.5.2. Extrínsecos	24

4.6.	Biología celular del cáncer	24
4.6.1.	Células cancerosas	24
4.6.2.	Muerte celular programada	24
4.6.3.	Regulación de la apoptosis	27
4.6.4.	Métodos de diagnóstico	28
4.6.5.	Tratamientos	29
4.7.	Investigación traslacional	32
4.7.1.	Líneas celulares como modelo de estudios <i>in vitro</i>	32
4.7.2.	Cultivo celular	33
5.	Alcance	36
6.	Metodología	37
6.1.	Sitio de estudio	37
6.2.	Diseño, enfoque y tipo de investigación	37
6.3.	Tipo y tamaño de muestra	38
6.4.	Variables	38
6.5.	Hipótesis	39
6.5.1.	Hipótesis principal	39
6.5.2.	Hipótesis nula	39
6.5.3.	Hipótesis alternativa	39
6.6.	Metodología	40
6.6.1.	Obtención de muestras y preparación de extractos	40
6.6.2.	Identificación de grupos funcionales presentes en los extractos	41
6.7.	Cultivo celular	41
6.7.1.	Descongelación de líneas celulares y pasajes	41
6.7.2.	Viabilidad celular y citotoxicidad	42
6.7.3.	Expresión génica de genes proapoptóticos	44
6.8.	Análisis estadístico	46
7.	Resultados	47
7.1.	Preparación del extracto, rendimiento e identificación de grupos funcionales	47
7.1.1.	Rendimiento de etanólica	47
7.1.2.	Identificación de grupos funcionales presentes en extractos	48
7.2.	Evaluación de la morfología y viabilidad celular mediante el uso de azul de tripano	50
7.2.1.	Evaluación de morfología celular en las líneas celulares CHO, LAN-1, UFH-001	50
7.2.2.	Evaluación de viabilidad celular utilizando azul de tripano	62
7.2.3.	Determinación de viabilidad celular a través del ensayo MTT	65
7.3.	Evaluación de la expresión de los genes <i>Puma</i> y <i>Bax</i>	68
8.	Discusión de resultados	73
8.1.	Rendimiento de extracción y grupos funcionales presentes	74
8.1.1.	Método de extracción	74
8.1.2.	Grupos funcionales presentes	74
8.2.	Morfología y viabilidad celular con azul de tripano y MTT	75
8.2.1.	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	75
8.2.2.	<i>Trametes versicolor</i>	76
8.2.3.	<i>Trametes menziensis</i>	76
8.2.4.	<i>Schizophyllum commune</i>	77
8.2.5.	Métodos empleados para determinar la viabilidad celular	77
8.3.	Expresión génica de <i>Puma</i> y <i>Bax</i>	78
9.	Conclusiones	80
10.	Recomendaciones	81

<i>ÍNDICE</i>	VI
11. Referencias	82
Referencias	82
12. Anexos	92
A. Evaluación de viabilidad celular	92
B. Cuantificación de ADNc	93
C. Cebadores y secuencias	96
D. Curvas de amplificación y niveles de expresión	96
E. Espectros IR	99
F. Mecanismos celulares propuestos del potencial antitumoral	101

Lista de figuras

Figura 1.	<i>Historia evolutiva del reino Fungi</i>	7
Figura 2.	Árbol de la vida del reino <i>Fungi</i>	9
Figura 3.	<i>Características morfológicas de T. versicolor</i>	11
Figura 4.	<i>Efecto del extracto de T. versicolor en las líneas celular MCF-7 y HUVEC</i>	12
Figura 5.	Morfología de <i>S. commune</i> cultivado	13
Figura 6.	Efecto de extractos de etanol en la proliferación celular de la línea KKU-M213	14
Figura 7.	Morfología de <i>P. sanguineus</i>	14
Figura 8.	Evaluación de apoptosis y necrosis del extracto de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (PS4-II)	15
Figura 9.	Proceso del desarrollo de cáncer y carcinogénesis	16
Figura 10.	Frecuencia de mutaciones y variantes patogénicas presentes en el cáncer de mama	17
Figura 11.	Incidencia del cáncer a nivel mundial	20
Figura 12.	Incidencia de diferentes tipos de cáncer en Latinoamérica y el Caribe en ambos sexos durante 2022	21
Figura 13.	Incidencia de diferentes tipos de cáncer en Guatemala en 2022	22
Figura 14.	Diferentes mecanismos de muerte celular programada	25
Figura 15.	Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis	26
Figura 16.	Red de señalización apoptótica mitocondrial dependiente de p53	27
Figura 17.	Esquematación de diferentes porcentajes de confluencia celular	34
Figura 18.	Preparación de extractos e identificación de grupos funcionales por FTIR	40
Figura 19.	Flujo de trabajo y condiciones de cultivo celular	41
Figura 20.	Observación de morfología y ensayo de viabilidad con azul de tripano	42
Figura 21.	Ensayo de MTT	43
Figura 22.	Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR	44
Figura 23.	Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo <i>P. sanguineus</i>	51
Figura 24.	Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo <i>T. versicolor</i>	52
Figura 25.	Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo <i>T. mensienzii</i>	53
Figura 26.	Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo <i>S. commune</i>	54
Figura 27.	Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>P. sanguineus</i>	55

Figura 28. Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>T. versicolor</i>	56
Figura 29. Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>T. mensienzii</i>	57
Figura 30. Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>S. commune</i>	58
Figura 31. Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>P. sanguineus</i>	59
Figura 32. : Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>T. versicolor</i>	60
Figura 33. Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>T. mensienzii</i>	61
Figura 34. Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo <i>S. commune</i>	62
Figura 35. Efecto del extracto del hongo <i>P. sanguineus</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas .	63
Figura 36. Efecto del extracto del hongo <i>T. versicolor</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas .	63
Figura 37. Efecto del extracto del hongo <i>T. menziensii</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas .	64
Figura 38. Efecto del extracto del hongo <i>S. commune</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas .	64
Figura 39. Efecto del extracto del hongo <i>P. sanguineus</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas	65
Figura 40. Efecto del extracto del hongo <i>T. versicolor</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas	66
Figura 41. Efecto del extracto del hongo <i>T. menziensii</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas	67
Figura 42. Efecto del extracto del hongo <i>S. commune</i> a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas	68
Figura 43. Niveles de expresión génica de <i>Puma</i> y <i>Bax</i> en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de <i>P. sanguineus</i> en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)	69
Figura 44. Niveles de expresión génica de <i>Puma</i> y <i>Bax</i> en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de <i>T. versicolor</i> en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)	69
Figura 45. Niveles de expresión génica de <i>Puma</i> y <i>Bax</i> en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de <i>T. menziensii</i> en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)	71
Figura 46. Niveles de expresión génica de <i>Puma</i> y <i>Bax</i> en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de <i>S. commune</i> en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)	72
Figura 47. Curva de amplificación de <i>Puma</i>	96
Figura 48. Curva de amplificación de <i>Bax</i>	97
Figura 49. Curva de amplificación de <i>GAPDH</i>	97
Figura 50. Curva de amplificación de los controles negativos	98
Figura 51. Espectro infrarrojo del extracto de <i>P. sanguineus</i>	99
Figura 52. Espectro infrarrojo del extracto de <i>T. versicolor</i>	99
Figura 53. Espectro infrarrojo del extracto de <i>T. menziensii</i>	100
Figura 54. Espectro infrarrojo del extracto de <i>S. commune</i>	100
Figura 55. Mecanismo celular propuesto del potencial antitumoral a través de la activación de <i>Bax</i>	101
Figura 56. Mecanismo celular propuesto del potencial antitumoral a través de la activación de otro tipo de proteína BH3	102
Figura 57. Mecanismo celular propuesto del potencial antitumoral a través de la activación <i>Bak</i>	103

Lista de cuadros

Cuadro 1.	Porcentajes de riesgo en las firmas de mutaciones extrínsecas (Conocido (C) y Desconocido (D)) e intrínsecas de diferentes tipos de cáncer	23
Cuadro 2.	Fortalezas y Limitaciones de Diferentes Métodos de Detección	29
Cuadro 3.	Operacionalización de las variables evaluadas en la investigación	38
Cuadro 4.	Preparación de la reacción de retrotranscripción	45
Cuadro 5.	Volúmenes de reactivos para la reacción de qPCR con SYBR® Green.	45
Cuadro 6.	Rendimiento de la preparación del extracto a partir de hongos secos.	47
Cuadro 7.	Análisis de espectro IR del extracto del hongo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	48
Cuadro 8.	Análisis de espectro IR del extracto del hongo <i>Trametes versicolor</i>	48
Cuadro 9.	Análisis de espectro IR del extracto del hongo <i>Trametes menziensii</i>	49
Cuadro 10.	Análisis de espectro IR del extracto del hongo <i>Schizophyllum commune</i>	49
Cuadro 11.	Resultados del ensayo con Azul de Tripano (TB) y MTT a diferentes tiempos y concentraciones.	92
Cuadro 12.	Cuantificación de ADNc de la línea celular LAN-1	93
Cuadro 13.	Cuantificación de ADNc de la línea celular UFH-001	94
Cuadro 14.	Cuantificación de ADNc de la línea celular CHO	95
Cuadro 15.	Genes y secuencias de cebadores	96
Cuadro 16.	Niveles de expresión relativos de <i>Bax</i> y valores de Ct para diferentes muestras	98
Cuadro 17.	Niveles de expresión relativos de <i>Puma</i> y valores de Ct para diferentes muestras	98

El cáncer es una problemática a nivel mundial con una alta prevalencia de casos en Asia, Europa y Norteamérica. En Guatemala, las enfermedades no transmisibles representan el 61.6% de la tasa de mortalidad en 2019, incluyendo el cáncer. En 2022 el Observatorio Global del Cáncer (GCO) reportó 17,801 nuevos casos y 10,369 muertes debido a esta enfermedad en el país. Las terapias convencionales como la quimioterapia, inmunoterapia y cirugías, generalmente comprometen la calidad de vida del paciente, existen casos de recaídas y no son específicos para las células cancerosas; por lo que encontrar terapias alternativas o adyuvantes para mejorar el tratamiento es de suma importancia para optimizar la terapia y mejorar la calidad del vida de los pacientes. Los hongos han demostrado tener propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias debido a que contiene sustancias bioactivas; se han encontrado que los extractos de hongos poseen un potencial antitumoral inhibiendo la proliferación en modelos *in vitro*; el estudio del potencial de diferentes hongos ha sido poco explorado en Guatemala. El objetivo de este estudio consiste en determinar el potencial citotóxico de extractos derivados de especies de hongos endémicas de Guatemala *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensis* y *Schizophyllum commune* mediante ensayos de viabilidad celular y expresión génica relacionada a la ruta de muerte celular programada (PCD). Se determina que existe un efecto negativo en la viabilidad celular y morfología en las líneas celulares evaluadas UFH-001 principalmente en todos los extractos evaluados indistintamente de su concentración y en LAN-1 a una concentración de 200µg/mL. Se observa un aumento en la expresión de genes relacionados a PCD, *Puma* y *Bax* en la línea celular UFH-001 indicando una relación entre ambos genes. Se encuentra expresión de *Bax* y no de *Puma* lo que indica que su activación se dio mediante otro tipo de proteína BH3. Para futuros estudios se recomienda el estudio de otros genes pro-apoptóticos, otras líneas celular e identificar compuestos bioactivos presentes en los extractos.

Palabras clave: cáncer, línea celular, hongo, antitumoral, tumor, viabilidad celular, morfología, CHO, LAN-1, UFH-001

Cancer is a global problem with a high prevalence of cases in Asia, Europe, and North America. In Guatemala, non-contagious diseases accounted for 61.6% of the mortality rate in 2019, including cancer. In 2022, the Global Cancer Observatory (GCO) reported 17,801 new cases and 10,369 deaths due to this disease in the country. Conventional therapies such as chemotherapy, immunotherapy, and surgery generally compromise patients' quality of life. There are cases of relapse, and are not specific for cancer cells. Therefore, finding alternative or adjuvant therapies to improve treatment is very important to optimize therapy and improve patients' quality of life. Mushrooms have been shown to have anticancer and anti-inflammatory properties due to their content of bioactive compounds. Mushroom extracts have been found to have antitumor potential by inhibiting proliferation evaluated in *in vitro models*. The study of the cytotoxic potential of different fungi has been underexplored in Guatemala. The objective of this study is to determine the cytotoxic potential of extracts derived from endemic Guatemalan fungal species *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensii* and *Schizophyllum commune* through cell viability assays and gene expression related to the programmed cell death (PCD) pathway. It is determined that there is a negative effect on cell viability and morphology in the evaluated cell lines UFH-001 mainly in all extracts evaluated regardless of their concentration and in LAN-1 at a concentration of 200µg / mL. An increase in the expression of genes related to PCD, *Puma* and *Bax* is observed in the UFH-001 cell line indicating a relationship between both genes. Expression of *Bax* is found and not of *Puma* which indicates that its activation occurred through another type of BH3 protein. For future studies, the study of other pro-apoptotic genes, consider the use of other cell lines and the identification of bioactive compounds present in the extracts is recommended.

Key words: cancer, cell line, mushrooms, antitumor, cell viability, morphology, CHO, LAN-1, UFH-001

El cáncer es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial. En países en vías de desarrollo donde los recursos para la prevención, diagnóstico y tratamiento son limitados o inexistentes, el riesgo es mayor. Por ello, es un desafío mundial encontrar tratamientos eficientes para esta enfermedad y permitir que sea accesible para toda la población. Actualmente, se siguen utilizando terapias convencionales para el tratamiento del cáncer como la cirugía, quimioterapia, radioterapia. La terapia depende del tipo de cáncer y la etapa del tumor en desarrollo. Sin embargo, estas terapias pueden provocar efectos adversos que comprometen la calidad de vida del paciente. Por lo que es de suma importancia encontrar terapias alternativas que sean efectivas y específicas. Los extractos naturales provenientes de distintas fuentes como plantas y hongos se han utilizado en la medicina alternativa para el tratamiento de todo tipo de infecciones, enfermedades inflamatorias y cardiovasculares. Se ha comprobado que los extractos de algunas especies de hongos tienen un potencial para ser esta alternativa debido a que poseen constituyentes químicos, micro y macronutrientes que demuestran tener efectos antitumorales y anticancerígenos (Figueiredo y Régis 2017).

Roca-Lema et al. 2019 evaluaron los efectos antitumorales de extractos ricos en polisacáridos de la especie *Trametes versicolor* en las líneas celulares de cáncer de colon LoVo (adenocarcinoma de colon) y HT-29 (adenocarcinoma colorrectal), mediante ensayos de citotoxicidad, proliferación e invasión. Se determinó que *Trametes versicolor* disminuyó la proliferación celular e indujo la citotoxicidad en células de cáncer de colon en la línea LoVo. Además, el extracto inhibió el potencial oncogénico, la migración y la invasión en las células cancerígenas utilizando una cámara de invasión y una matriz extracelular. En otro estudio realizado por Ekowati et al. 2020 se determinó que los compuestos bioactivos producidos por *Schizophyllum commune* son terpenoides, flavonoides y alcaloides que inhiben a las líneas celulares HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (carcinoma mamario), T47D (carcinoma mamario) y WiDr (carcinoma colorrectal) e inducen apoptosis. Por último, en el estudio realizado por Pię̧t et al. 2021, se evaluaron las propiedades antitumorales de los extractos de *Cerrena unicolor* y *Pycnoporus sanguineus* y su suplementación con leche de vaca debido a que puede mejorar las propiedades medicinales del extracto. Se encontró que dichos extractos exhibieron propiedades anticancerígenas al reducir la viabilidad celular y provocar cambios en la morfología celular. Los extractos evaluados a una concentración de 200 µg/mL disminuyeron significativamente la viabilidad de las líneas celulares cancerígenas HT-29 y SW948, además, exhibieron propiedades pro-apoptóticas a través del ensayo de MTT y el ensayo de rojo neutral. Por último, la suplementación con leche de vaca demostró mejorar las propiedades de estos extractos.

El presente estudio pretende determinar el potencial citotóxico de extractos derivados de especies de hongos endémicas de Guatemala *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensis* y *Schizophyllum commune*. Para esto se han diseñado diferentes ensayos que miden la actividad antitumoral en diferentes niveles: a nivel de citotoxicidad, viabilidad celular y expresión de génica de genes relacionados a la ruta de muerte celular programada en las líneas celulares de neuroblastoma humano (LAN-1), cáncer de mama (UFH-001) y de ovario de hámster chino (CHO). Esta investigación es de suma importancia debido a que el potencial anti-tumoral de estas especies de hongos endémicos de Guatemala no ha sido evaluado in vitro. Además, se busca generar suficiente conocimiento pre-clínico para poder ampliar el estudio de terapias naturales alternativas a las tradicionales y minimizar los efectos adversos de la mismas que comprometen la calidad de vida del paciente.

2.1. Objetivo general

Determinar el potencial citotóxico de extractos derivados de especies de hongos endémicas de Guatemala *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensii* y *Schizophyllum commune* mediante ensayos de viabilidad celular y expresión génica relacionada a la ruta de muerte celular programada.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar los grupos funcionales presentes en los extractos derivados de las especies de hongos *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensii* y *Schizophyllum commune* a través de espectroscopía infrarroja.
- Cuantificar la viabilidad celular después de la exposición de las líneas celulares a cada extracto de hongos endémicos de Guatemala *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensii* y *Schizophyllum commune* a través del conteo con azul de tripano y el ensayo MTT.
- Evaluar la expresión génica en las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 de genes proapoptóticos *Puma* y *Bax* expuestas a extractos de hongos mediante una PCR cuantitativa.

Se estima que existen entre 1.5 y 10 millones de especies de hongos en la tierra, de las cuales solo el 8% han sido caracterizadas e identificadas. Aproximadamente 270 especies de hongos se han evaluado como terapia en para diversas enfermedades como las infecciones de todo tipo, cáncer, enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, respiratorias, entre otros. Algunas de estas especies tienen potencial para el desarrollo de fármacos y han sido utilizados para fines medicinales desde la prehistoria (Panda et al. 2022). Estudios previos sugieren que los hongos pertenecientes a los géneros *Agaricus*, *Amauroderma*, *Coprinus*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Lentinula*, *Phellinus*, *Pleurotus*, y *Polyozellus* han demostrado favorecer a la salud del sistema inmune y respuestas inflamatorias. Se ha demostrado el impacto de los hongos en las terapias para el cáncer debido a sus efectos antitumorales y anticancerígenos (Figueiredo y Régis 2017).

El cáncer es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial y genera grandes costos en la salud pública. De acuerdo con el Observatorio Global de Cáncer (GCO) se estima que para 2025 los casos a nivel mundial aumenten de 19.3 millones, reportados en 2020, a 28.4 millones de casos (Papież y Krzyściak 2021). En 2022 se reportaron 17,801 nuevos casos en Guatemala y 10,369 muertes (GCO 2022). A pesar de que existen diferentes tipos de tratamiento muchos pacientes recaen y en algunos casos el mismo tratamiento es el que genera efectos secundarios. Se deben de explorar opciones terapéuticas innovadoras y más seguras para bordar esta creciente problemática. Existe una necesidad en encontrar terapias alternativas, debido a que la quimioterapia clásica está llegando a sus límites de efectividad. Por lo que ha surgido la necesidad de desarrollar terapias que no afecten la calidad de vida del paciente y sea específicas para las células cancerosas (Papież y Krzyściak 2021).

En este estudio se utiliza un modelo de cáncer derivado del sistema nervioso central y el cáncer de Mama. El neuroblastoma es un tipo de cáncer que surge en células derivadas de la cresta neural del sistema nervioso central. Los tumores pueden desarrollarse en cualquier parte del sistema nervioso simpático. El tumor sólido extracraneal es común en niños. La severidad del tumor y pronósticos está relacionado a las aberraciones cromosómicas; la amplificación del gen *MYCN* se correlaciona con un pronóstico desfavorable y una enfermedad de alto riesgo y deleciones en el cromosoma 1 afectan la regulación de la apoptosis y está asociada a casos más agresivos. En Estados Unidos se reportan 700 casos anuales. A pesar de que la terapia combinada es utilizada en este tipo de cáncer muchos niños no se recuperan. Por ello, es importante el desarrollo de terapias específicas y eficientes (Chung et al. 2021).

El cáncer de mama es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo con el GCO se reportan 2.3 millones de casos nuevos. Se categoriza según la presencia o ausencia de marcadores moleculares. Las aberraciones cromosómicas están asociadas a la agresividad del tumor y resistencia al tratamiento; la amplificación del gen *HER2* está relacionada a un peor pronóstico y un comportamiento más agresivo del tumor y la ganancia del cromosoma 1q está vinculada a una proliferación celular descontrolada. Los tratamientos tradicionales para este tipo de cáncer incluyen la cirugía, quimioterapia, inmunoterapia y terapia endocrina. Además, se han desarrollado nuevos métodos para su tratamiento, a pesar de estos esfuerzos la respuesta en general es baja. Además, estos tratamientos pueden ocasionar efectos adversos severos como la mielosupresión, desordenes gastrointestinal, cistitis hemorrágica, alopecia y otros efectos que pueden comprometer la calidad de vida del paciente. Por lo que encontrar una alternativa efectiva que pueda ser utilizada como adyuvante para potenciar las terapias y reducir los efectos secundarios es de suma importancia (Gariboldi et al. 2023).

Una terapia alternativa para el cáncer son los fármacos derivados de productos naturales, sin embargo, se ha descrito poco sobre la aplicación de distintas especies de hongos y su potencial terapia para el cáncer. Un ejemplo de esto es la aplicación del extracto de *T. vesicolor* como una terapia integrada en China. Se ha descrito *in vitro* la actividad anticancerígena de extractos de especies de hongos, en donde los extractos inducen la muerte celular programada en células tumorales. Estos extractos se componen de sustancias bioactivas producidas por los hongos como proteínas, carbohidratos, compuestos fenólicos, lípidos, entre otros. Dichos componentes confieren actividades anticancerígenas, inmunoestimulantes y antiinflamatorias (Matuszewska et al. 2019). En un estudio realizado por Matuszewska et al. 2019, se encontró que los extractos evaluados de *Cerrena unicolor* inhibieron la proliferación celular en células de cáncer de colon etapa I (HT-29).

Un tumor maligno caracterizado por tiene la habilidad de expandirse descontroladamente y destruir la arquitectura del tejido. Esto debido a que se generan mutaciones que promueven la proliferación celular o inactivan genes supresores de tumores, al inducir la angiogénesis y la expresión de proteínas inmunosupresoras. Algunos tumores poseen deleciones, inversiones y otras mutaciones que afectan a los genes supresores de tumores y oncogenes. Los genes supresores de tumores juegan un rol importante actuando como un mecanismo para mantener la estabilidad celular y eliminar las células cancerosas; estos genes regulan procesos como el ciclo celular, reparación de ADN e inducción de la muerte celular programada al activar la expresión de genes proapoptóticos. Por otro lado, los tumores desarrollan estrategias para contrarrestar estos mecanismos, por ejemplo, la activación de oncogenes que promueven la proliferación celular descontrolada y la inactivación de genes supresores de tumores. Por lo que es importante el desarrollo y descubrimiento de terapias específicas que promuevan la expresión génica de genes supresores (Delbridge, Valente y Strasser 2012). Los genes proapoptóticos evaluados en este estudio son *Puma* y *Bax*, que están involucrados en la vía intrínseca de la muerte celular programada, cuya expresión se relaciona a un aumento en la liberación de especies reactivas de oxígeno desde la mitocondria.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se pretende determinar si la exposición con diferentes extractos de *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensis* y *Schizophyllum commune* en líneas tumorales podrían tener un potencial citotóxico mediante a la evaluación de viabilidad celular, citotoxicidad y expresión génica de genes relacionados con la muerte celular programada. Esto permitirá evaluar si los extractos de estas especies de hongos tienen potencial anti-tumoral y lograr identificar de manera preliminar la ruta que podrían activar para poder considerarlos como posible terapia alternativa para cáncer.

Para la realización del presente estudio se cuenta con todos insumos necesarios que serán brindados por la Universidad del Valle de Guatemala. Se contará la línea celular de neuroblastoma humano (LAN-1), línea celular de cáncer de mama (UFH-001) y la línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Esto para realizar los diferentes tratamientos de los extractos y utilizar las células CHO como grupo control.

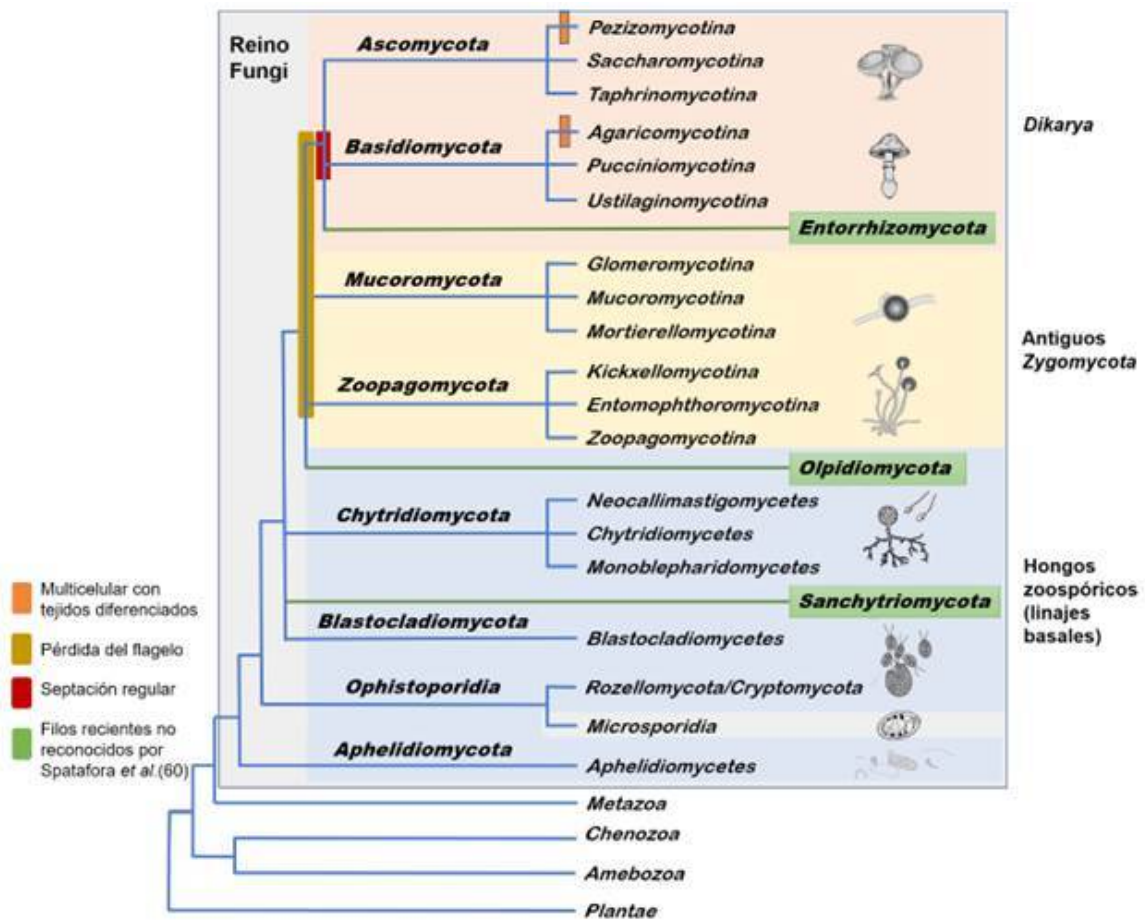
4.1. Hongos

4.1.1. Diversidad y clasificación de especies de hongos

Los hongos son especies pertenecientes al reino *Fungi* que comprende al menos 12 filos. Se estiman alrededor de 2.2 a 3-8 millones de especies distribuidas en todo el mundo. Hasta el momento, se han descrito aproximadamente 148,000 especies de todo este reino (Zhou y May 2023). Este reino comprende un clado de eucariotas hiperdiversos, que se caracterizan por la presencia de una pared celular de quitina. Debido a su diversidad se pueden encontrar en diferentes ambientes y juegan un rol ecológico importante ya que reciclan el carbón y movilizan nitrógeno, fósforo y otros elementos; proveen un soporte importante para la vida de las plantas en forma de endófitos y micorrizas. Mientras que otros son patógenos que pueden infectar a plantas, animales y humanos (Naranjo-Ortiz y Gabaldón 2019).

Su metabolismo ha permitido la obtención de alimentos, bebidas y medicinas para el ser humano, además de que muchos compuestos producidos por los hongos se utilizan a nivel industrial. Los hongos verdaderos generalmente comparten rasgos como: la presencia de una pared celular de β -glucano y quitina, suelen ser unicelulares o crecer como micelio, presencia de la vía amino adipídica para síntesis de lisina y presencia de cristales aplanados. Sin embargo, existen excepciones en estos rasgos, basados en lo anterior se definieron nueve linajes principales en función de sus características morfológicas y reproductivas : *Opisthospordia*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mucoromycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Como se muestra en la figura 1, se muestra la división de los hongos zoosporicos que son el clado más primitivo del reino Fungi su estilo de vida y morfología son simples pero evidencian diferentes importantes según los linajes y se muestran los zigomicetos. Sin embargo, debido a los avances tecnológicos como los métodos de secuenciación se han podido reconocer nuevos clados de organismos con diferentes características que son parte de este reino (Rúa-Giraldo 2023)

Figura 1: Historia evolutiva del reino Fungi



Se muestran los eventos representativos como la pérdida de flagelo, septos regulares de las hifas y la formación de estructuras multicelulares con tejidos diferenciados. Adaptado de (Rúa-Giraldo 2023)

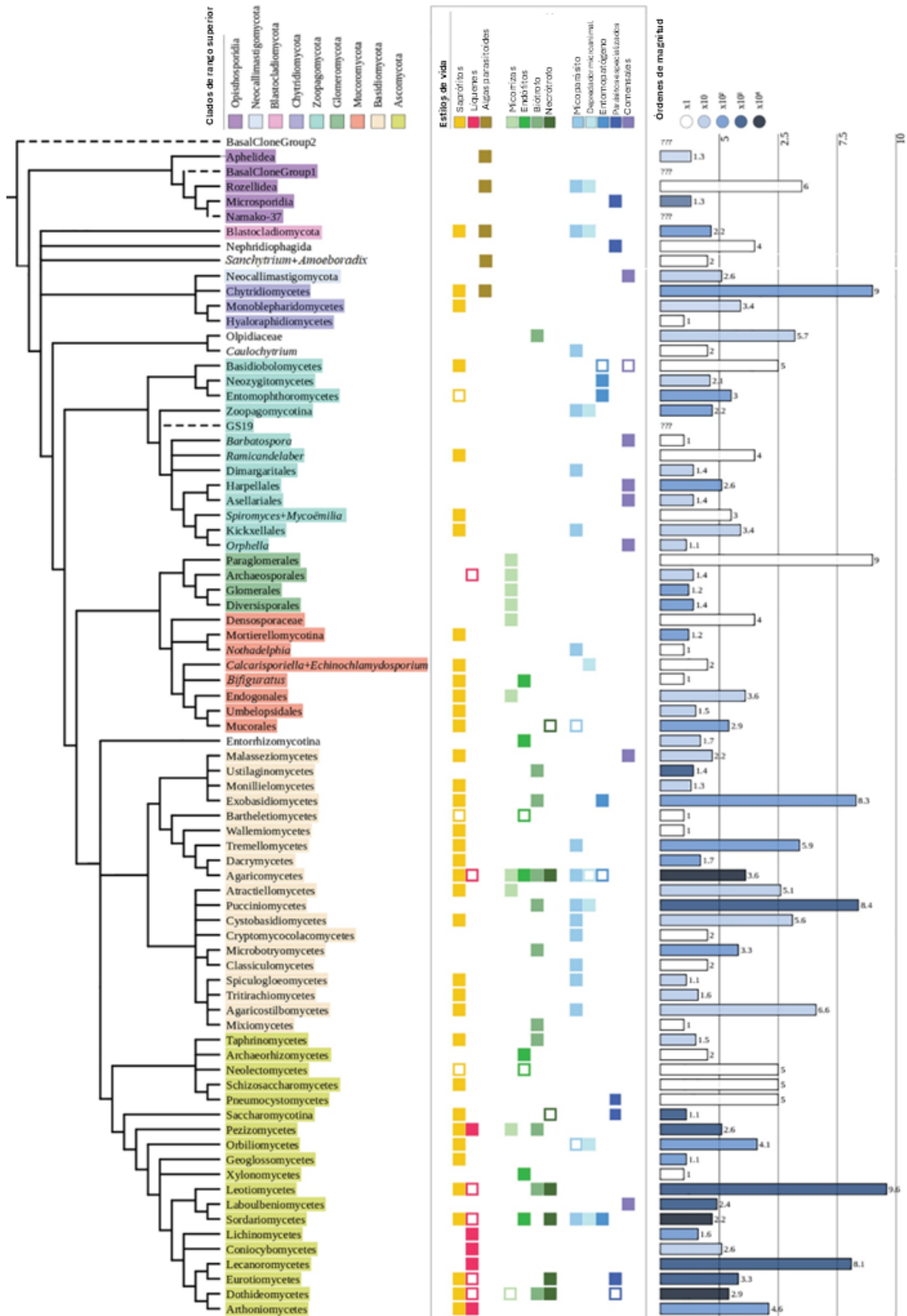
Los hongos zoospóricos presentan un estilo de vida simple y se diferencian según su estado de vida. Los opistosporidios están conformados por tres linajes principales: *Aphelidea*, *Rozellidea* y *Microsporidia*, las especies de este clado son parásitos intracelulares o parasitoides. Los microsporidios comprenden 1440 especies y grupos diversos de parásitos intracelulares obligados de 16 filos de metazoos y 4 de protozoos. Debido a su estilo de vida presentan genomas reducidos, a diferencia de los opistosporidios carecen de estructuras móviles y verdaderas mitocondrias; en su lugar tienen miosomas. Los *Blastocladiomycota* y *Chytridiomycota* su linaje no está resuelto y han sido propuestos análisis multigénicos. Los *Blastocladiomycota* presentan una amplia gama de morfologías de crecimiento desde monocéntricas hasta policéntricas. Los *Chytridiomycota* son hongos que habitan en el agua y son parásitos de agua y oomicetes (Rúa-Giraldo 2023).

La aparición de los zigomicetos se caracterizó por la pérdida del flagelo fúngico y surgimiento de hongos terrestres filamentosos. Los *Zoopagomycota* son un grupo divergente de hongos no flagelados y comprende tres subfilos: *Zoopagomycotina*, *Kickxellomycotina* y *Entomophthoromycotina*, son hongos patógenos y comensales de animales, parásitos de otros hongos y amebas o están raramente asociados con plantas. Tienen la capacidad de formar micelios verdaderos. Los *Mucoromycota* su estilo de vida es asociado a plantas y comprende el grupo más grande y mejor estudiado de los zigomicetos. Presentan asociaciones vegetales y ecología basada en plantas como las micorrizas. Por último, el subdominio *Dikarya* comprende a los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*, su nombre hace referencia

a la condición de poseer dos núcleos genotípicamente diferentes. El filo *Ascomycota* es el más grande y comprende dos tercios de todas las especies descritas, generalmente son descomponedores de múltiples sustratos, simbiotas y asociados con plantas y animales; habitan ecosistemas marinos y terrestres y la mayoría de especies patógenos para los humanos. Los *Basidiomycota* son el segundo filo más rico en especies, cerca de 32,000 especies descritas. Comprenden especies con ciclos celulares y multicelularidad más compleja; su principal característica es la producción de basidias (Rúa-Giraldo 2023).

Como se observa en la figura 2, la taxonomía más actualizada divide a los hongos en nueve linajes principales previamente mencionados y ofrece una vista más detallada de las relaciones evolutivas. En esta figura se muestra el árbol de la vida del reino *Fungi* la primera columna representa los *cluster* correspondientes a cada filo, la segunda columna comprende el estilo de vida de cada grupo y la tercera columna muestra el número de especies descritas de cada grupo de acuerdo con el programa del catálogo de la vida, una base de datos que recopila, clasifica y relaciona los genomas completos de todas las especies del reino *Fungi*. (Bisby y Roskov 2010; Naranjo-Ortiz y Gabaldón 2019).

Figura 2: Árbol de la vida del reino *Fungi*



Se muestra el árbol de la vida del reino Fungi; clasificación según clado y estilo de vida. Adaptado de (Naranjo-Ortiz y Gabaldón 2019).

4.1.2. Potencial terapéutico

La diversidad de hongos ha permitido al ser humano utilizarlos como fuente de alimento, se ha convertido en un alimento básico en dietas en todo el mundo. Son un grupo extremadamente diverso en términos de morfología, ecología, metabolismo y filogenia. Además, de ser reconocidos por sus beneficios nutricionales se han utilizado por presentar propiedades terapéuticas; han sido utilizado en la medicina occidental por mucho tiempo para promover el bienestar físico y tratar afecciones (Naim 2024). Distintas especies de hongos medicinales producen aproximadamente 130 actividades beneficiosas para la salud como: antitumorales, inmunomoduladoras, antioxidantes, eliminan radicales libres, cardioprotectoras, hepatoprotectoras y antivirales. Esto debido que producen compuestos bioactivos que les confieren estas propiedades; estos compuestos pueden ser polisacáridos, alcaloides, proteínas, gasas, minerales, carotenoides, glucósidos, terpenoides, folatos, fenoles, enzimas, entre otros (Chugh et al. 2022).

Se han utilizado en la medicina oriental durante siglos para la prevención y tratamiento de una variedad de enfermedades. Los extractos de hongos están disponibles como suplementos dietéticos para aumentar función inmunológica y actividades anticancerígenas (Chugh et al. 2022). Por ejemplo, los extractos de *Corioulus versicolor* en China han sido aprobados por la Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos (SAFD) para su uso clínico como terapia integrada del cáncer junto con la quimioterapia o radioterapia (Venturella et al. 2021).

Se ha encontrado que los polisacáridos provenientes de estos hongos poseen actividades antitumorales, inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Las características específicas como el grado de ramificación, el enlace de la cadena principales, tipo de monosacáridos, influyen en el tipo de actividad biológica. Los α y β -glucanos son los más abundantes y otros glicanos son los ejercen actividades biológicas importantes (Gariboldi et al. 2023).

Por otro lado, las proteínas producidas por estos hongos tienen propiedades citotóxicas y anticancerígenas, estas se conocen como proteínas inmunomoduladoras fúngicas, que tienen diversos mecanismos. Además, se han encontrado lectinas que están relacionadas a la inmunidad innata, interacción celular e inmunomodulación. Otros compuestos desempeñan un rol fundamental en estas bioactividades como los compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes. Varios compuestos derivados de las especies de los géneros: *Agaricus*, *Albatrellus*, *Antrodia*, *Calvatia*, *Clitocybe*, *Cordyceps*, *Flammulina*, *Fomes*, *Funlia*, *Ganoderma*, *Inocybe*, *Inonotus*, *Lactarius*, *Phellinus*, *Pleurotus*, *Russula*, *Schizophyllum*, *Suillus*, *Trametes*, y *Xerocomus*, han demostrado tener actividad inhibitoria en diferentes tipos de cáncer (Gariboldi et al. 2023).

Esta actividad inhibitoria en diferentes tipo de cáncer se puede dar a través de diferentes mecanismos, como la inhibición de proliferación celular, inducción de muerte celular programa y autofagia, regulación del sistema inmune y pueden revertir la resistencia a tratamiento y aumentar la sensibilidad de la quimioterapia (Xu et al. 2022).

4.1.3. Especies de hongos con propiedades anticancerígenas

4.1.3.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor también conocido como *Coriolus versicolor* o *Polyporus versicolor* pertenece a una clase de Basidiomicetos; crece en troncos de árboles alrededor del mundo en climas diversos (Standish et al. 2008). Se conoce comúnmente como “Cola de pavo” debido a que su morfología incluye zonas multicolores concéntricas en la parte superior y poliporos portadores de esporas en la parte inferior, como se muestra en la figura 3 (Habtemariam 2020).

Figura 3: Características morfológicas de *T. versicolor*



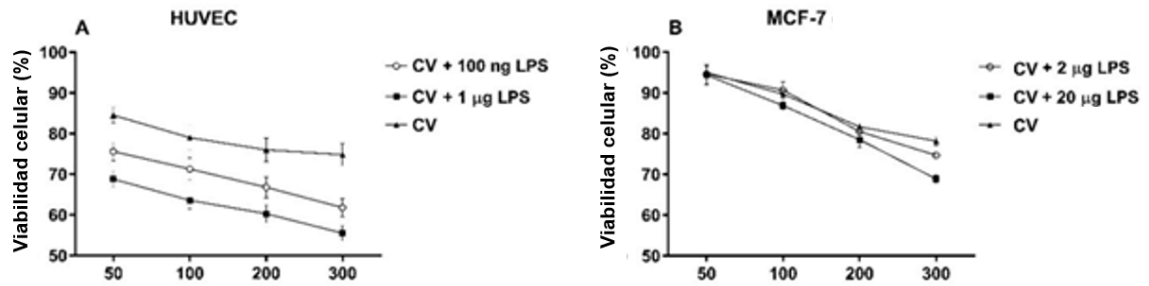
Se muestra la morfología del hongo *T. versicolor* que incluye zonas concéntricas y poliporos. Obtenido de (Habtemariam 2020)

Ha sido parte de la medicina China tradicional para promover la salud y longevidad. Además, se ha utilizado como adyuvante para la quimioterapia o radioterapia para mejorar la potencia de la terapia o reducir los efectos adversos. Se han identificado dos productos importantes extraídos de este hongo, polisacárido Krestin (PSK) y péptido polisacárido (PSP), que están compuestos por una mezcla de β -glucanos; se consideran como no tóxicos y no producen efectos adversos (He et al. 2022).

La citotoxicidad de los polisacáridos provenientes de *T. versicolor* se ha demostrado en células cancerosas y tumorales, incluyendo: cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de colon, leucemia, cáncer de cérvix, entre otros. La inhibición de la proliferación celular se ha asociado al ciclo celular y al tipo de células. Además, se han asociado genes y proteínas que inducen la muerte celular programada como *Bax* y *MAPK* se ha encontrado regulados positivamente (Habtemariam 2020). Como se muestra en la figura 4, el tratamiento con el extracto en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 demostró ser efectivo al reducir la viabilidad celular en una dosis de 300 μ g/mL (Jędrzejewski

et al. 2020).

Figura 4: Efecto del extracto de *T. versicolor* en las líneas celular MCF-7 y HUVEC



Se observa en la figura que la exposición de *T. versicolor* reduce la viabilidad de la línea celular MCF-7. Adaptado de (Jędrzejewski et al. 2020).

4.1.3.2. *Schizophyllum commune*

Schizophyllum commune pertenece al filo *Basidiomycota* y a la familia de los *Schizophyllaceae* se distribuye en áreas boscosas en todo el mundo. Tiene forma de concha y su superficie está cubierta por pelos finos y suaves de color blanco a gris-rosáceo, como se muestra en la figura 5.

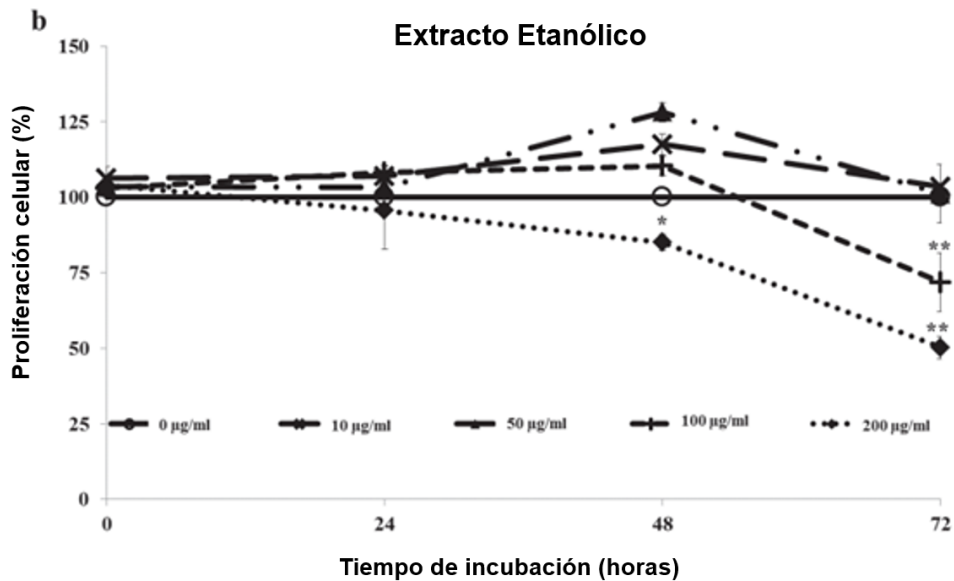
Figura 5: Morfología de *S. commune* cultivado



Se observa en la figura la morfología de *S. commune*. Obtenido de (Mahajan 2022)

Produce un polisacárido conocido como *schizophyllan* que ha demostrado tener efectos antitumorales, anticancerígenos, inmunomoduladores y antiinflamatorios (Mišković et al. 2021). Se ha encontrado que los compuestos bioactivos aislados de *S. commune* presentaron potencial para inhibir cuatro líneas celulares (HeLa, MCF7, T47D y WiDr) en concentraciones entre 5-400 µg/mL (Ekowati et al. 2020). Además, se ha reportado una inhibición de la proliferación celular en células de colangiocarcinoma KKMU-M313 y también se demostró que tiene efectos antimigratorios. Como se muestra en la figura 6, los extractos de *S. commune* etanólicos redujeron la viabilidad celular en un 50 % a las 72 horas de tratamiento a una dosis de 200 µg/mL en las células de colangiocarcinoma humano KKU-M213 (Apaporn Menakongka et al. 2019).

Figura 6: Efecto de extractos de etanol en la proliferación celular de la línea K KU-M213



En la figura se observa que *S. commune* tiene un efecto en la proliferación celular de las células K KU-M213. Adaptado de (Apaporn Menakongka et al. 2019)

4.1.3.3. *Pycnoporus sanguineus*

Pycnoporus sanguineus es un hongo que pertenece el filo *Basidiomycota* y a la familia *Polyporaceae*. Causante del decaimiento de varios tipos de maneras en bosques de las áreas tropicales y subtropicales. Este hongo a sido utilizado en la medicina por tribus en América y África (Smânia et al. 1995). Tiene una consistencia corchosa, píleo semicircular, es de color naranja rojizo cuando está maduro con una superficie velutinosa y crece sobre madera muerta, como se observa en la figura 7 (Téllez-Téllez 2016).

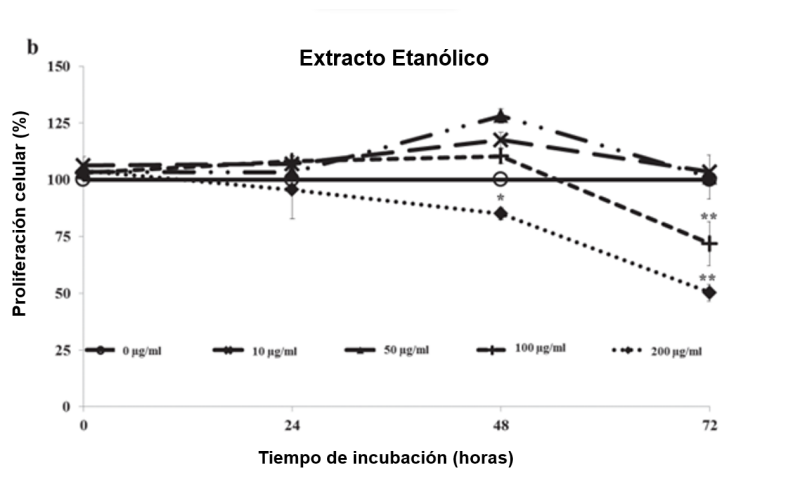
Figura 7: Morfología de *P. sanguineus*



En la figura se observa la morfología de corchosa de *P. sanguineus*. Adaptado de: (Téllez-Téllez 2016)

Esta especie de hongo ha demostrado ser una fuente de compuestos bioactivos que tienen propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias. Las biomoléculas responsables de dicho efecto son los polisacáridos y fenoles. Se encontró que el extracto de este hongo a una concentración de 200 µg/mL redujo la viabilidad celular en las líneas de células HT-29, LS180 y SW948; además exhibió propiedades que promueven la muerte celular, como se muestra en la figura 8 donde se muestra que el tratamiento aumentó el porcentaje de células muertas en las distintas líneas celulares. Además, se identificó la composición bioquímica de este extracto encontrando en su mayoría proteínas y compuestos fenólicos (Pię et al. 2021).

Figura 8: Evaluación de apoptosis y necrosis del extracto de *Pycnoporus sanguineus* (PS4-II)



Se muestra que el extracto etanólico de *P. sanguineus* reduce la viabilidad celular. Adaptado de (Pię et al. 2021)

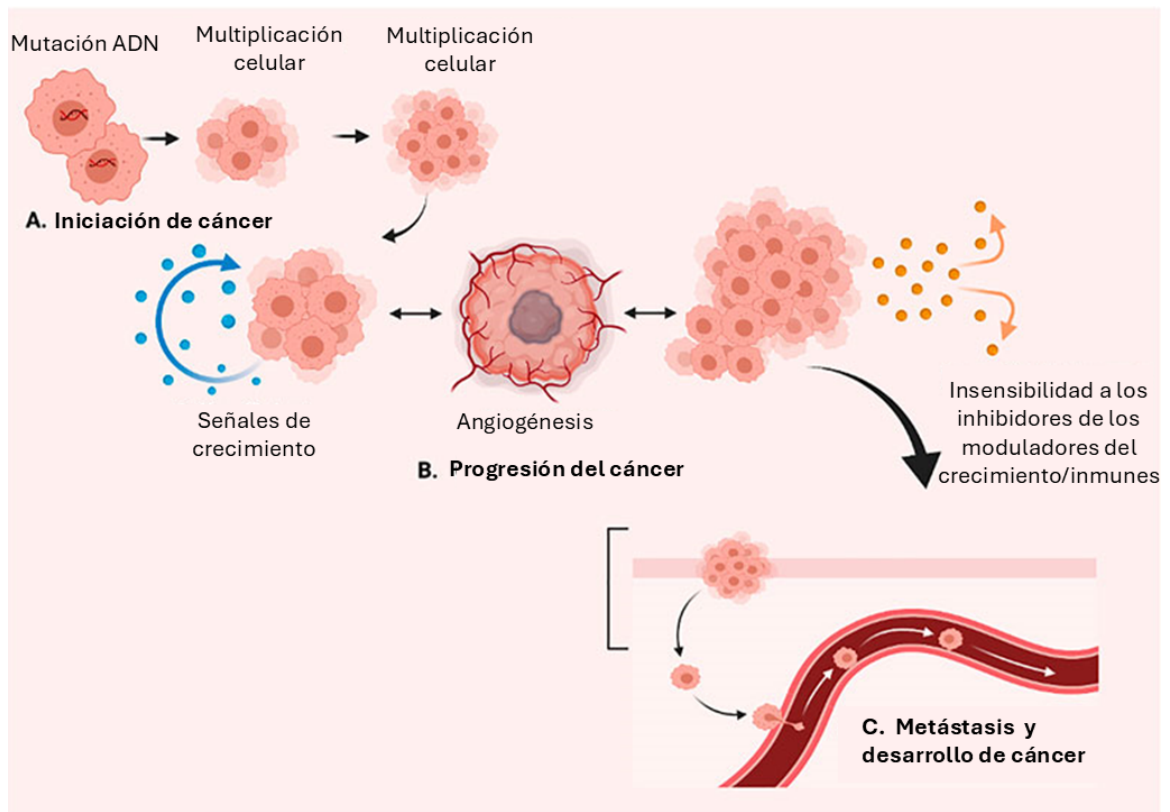
4.2. Cáncer

4.2.1. Descripción

El cáncer es un conjunto de enfermedades complejas y la progresión tumoral depende de una serie de cambios para que las células sean capaces de superar barreras de selección. Estos cambios proporcionan poder proliferativo lo que provoca que los tumores puedan expandirse y evolucionar (Solé & Aguadé-Gorgorió, 2021). En humanos la formación de tumores se caracteriza por una transformación progresiva de células que adquieren características como señales proliferativas sostenidas, evasión de la supresión del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, inmortalidad replicativa y activación de la invasión, estas se conocen como las características del cáncer, como se muestra en la figura 9 (Recillas-Targa 2022).

La carcinogénesis es un proceso con múltiples etapas que implica una serie de mutaciones en genes que desempeñan un rol en el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación celular y apoptosis. Estas mutaciones podrían conducir al crecimiento celular descontrolado, degradación del tejido celular, invasión de células cancerosas de tejidos adyacentes y finalmente metástasis (Kontomanolis et al. 2021). Además, se ve estimulada la expresión de genes relacionados a la proliferación celular. El gen que codifica para la beta-catenina CTNNB1 en 10-20% de varios tipos de cáncer en la piel se encuentra interrumpido mientras que otros genes involucrados en este proceso son APC, MYC y CCND1. El actor principal del crecimiento celular incluye receptores de membrana como el EGFR (El receptor del factor de crecimiento epidérmico) (WHO 2018).

Figura 9: Proceso del desarrollo de cáncer y carcinogénesis



Se muestra el proceso de carcinogénesis. Adaptado de (Chaudhry et al. 2022)

4.2.2. Invasión y metástasis

La metástasis es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer. El curso de la metástasis tumoral implica una serie de etapas que provocan la formación de tumores secundarios en órganos distantes. Una vez que las células adquieren la capacidad de penetrar tejidos circundantes se inicia al proceso de invasión; a medida que pasan a través de la membrana basal y la matriz extracelular, progresando hacia la intravasación a medida que penetran la circulación linfática o vascular. Estas células se unen a una nueva ubicación y proliferan para producir el tumor secundario (Martin et al. 2013).

4.3. Tipos de cáncer

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer los tipos de cáncer se pueden clasificar según el tipo de tejido en el cual se origina el cáncer y por sitio primario o por la ubicación en el cuerpo donde se desarrolló. La clasificación estándar y nomenclaturas de los tipos de cáncer está dada por la Clasificación Internacional de Enfermedades de Oncología; se pueden agrupar en cuatro categorías principales: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas (Institute 2023).

4.3.1. Carcinoma

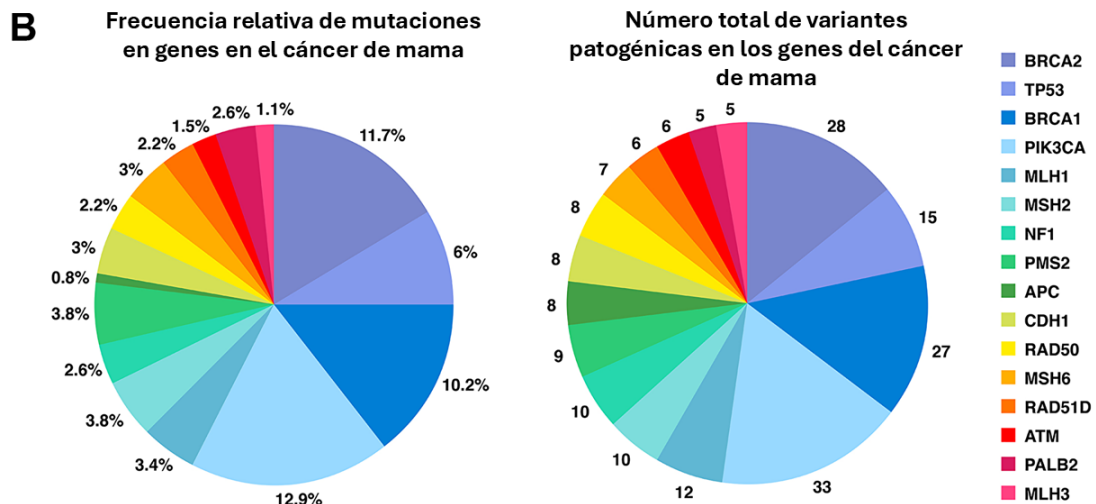
El carcinoma es un cáncer que surge de las células epiteliales que recubren un órgano o tejido; son neoplasias derivadas de las células epiteliales. Estas se clasifican según el tipo de epitelio del surgen; los dos tipos más comunes son el carcinoma de células escamosas que se deriva de cualquier tejido u órgano revestido de epitelio escamoso y adenocarcinoma derivado de tejidos glandulares. Este puede ser invasivo si la membrana basal se rompe debido a que permite que las células malignas invadan el estroma circundante. Los carcinomas más comunes son el carcinoma de mama, colorrectal, pulmón, páncreas, hepatocelular y de próstata (Avery et al. 2022, 1 de enero).

4.3.1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más prevalente en todo el mundo, describe una variedad de neoplasias malignas que ocurren en las glándulas mamarias. La mayoría de los cánceres son adenocarcinomas que en un 85% surgen de los conductos mamarias y 15% surge del epitelio lobulillar. Otras formas de cáncer incluyen la enfermedad de Page de mama, cáncer de mama inflamatorio y carcinomas papilares. La tumorigenesis se produce por desregulación en la proliferación celular y apoptosis. La presencia o ausencia de receptores de estrógeno, progesterona y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano 2 en las células cancerosas determinar las opciones de tratamiento (Katsura et al. 2022).

Comúnmente se presenta como un bulto en la mama indoloro, pero también pueden presentarse como un bulto en la axila duro e irregular o provocar hinchazón de los senos, cambios en la piel como picaduras, ulceración, cambios en el pezón como secreción. Factores como predisposición genética, envejecimiento, mutaciones en *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, y *NF1*, obesidad, exposición a hormonas exógenas se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, como se muestra en la figura 10 (Katsura et al. 2022).

Figura 10: Frecuencia de mutaciones y variantes patogénicas presentes en el cáncer de mama



En la figura se presentan las mutaciones en genes en el cáncer de mama. Adaptado de (Barakeh et al. 2021)

4.3.2. Sarcomas

Los sarcomas son tumores de origen mesenquimal putativo, representan aproximadamente el 21 % de todos los cánceres sólidos pediátricos y el 1 % de cánceres sólidos en adultos. Representan múltiples neoplasias malignas; existen más de 50 subtipos histológicos diferentes y pueden ocurrir en cualquier edad y no están restringidos a una ubicación específica en el cuerpo. Son relativamente raros y bastantes mortales, en especial los sarcomas de tejidos blandos; carecen de síntomas en etapa temprana dificultando su diagnóstico. Los sarcomas de tejidos blandos se forman en los músculos, articulaciones, grasa, nervios, tejidos profundos de la piel y vasos sanguíneos del cuerpo. Entre tipos de sarcomas se pueden mencionar los osteosarcomas, los sarcomas de Ewing y el neuroblastoma (Burningham et al. 2012).

4.3.2.1. Neuroblastoma

El neuroblastoma es un cáncer que surge de células derivadas de la cresta neuronal y los tumores se pueden desarrollar en cualquier sitio del sistema nervioso simpático. Es el tumor sólido más común en niños y se han diagnóstico niños menores de 5 años con un promedio de 17 meses de edad. Los síntomas dependen de la ubicación del tumor primario. Estos incluyen una masa y dolor abdominal, problemas para respirar y síntomas neurológicos. Los pacientes que presentan metástasis presentan fiebre, dolor de huesos y pérdida de peso. Algunos casos de neuroblastoma puede progresar espontáneamente mientras que otros se puede comportar agresivamente (Chung et al. 2021).

El tratamiento de neuroblastoma incluye quimioterapia, resección quirúrgica, quimioterapia en dosis altas con rescate de células madre autólogas (ASCR) y radioterapia de haz externo (EBRT). Una biopsia del tumor primario o de una lesión metastásico de tejidos blandos para realizar un diagnóstico. Además, se diagnóstica a través de la cuantificación catecolaminas, imágenes anatómicas del sitio primario y biopsia de médula ósea. La estadificación se basa en la presencia o ausencia de factores de riesgo definidos por imágenes (IDRF); se reconocen cuatro estadios: enfermedad localizada sin (L1) y con (L2) factores de riesgo, enfermedad metastásica (M) y enfermedad metastásica en niños muy pequeños limitado a sitios específicos (MS). Se define a un paciente con riesgo que sea de cualquier edad con L2, M o MS con amplificación del oncogén *MYCN*. La cirugía es de alto riesgo y generalmente se realiza después de cuatro ciclos de quimioterapia; permite remover al menos 90% de tumor primario con preservación de órganos adyacentes y estructuras neurovasculares. Se recomienda la radioterapia tras las quimioterapia de inducción y la resección quirúrgica (Chung et al. 2021).

4.3.3. Leucemias

Las leucemias son el grupo de trastornos malignos en donde se presenta un aumento en el número de leucocitos en la sangre y/o en la médula ósea. Es un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas que surgen de la proliferación disfuncional de los leucocitos en desarrollo. Se pueden clasificar como agudas o crónicas según su rapidez de proliferación y mieloides o linfoides según la célula origen. Los subtipos predominantes son : leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) que afectan al linaje mieloide; la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia linfocítica crónica (LLC) que afecta al linaje linfoide (Chennamadhavuni et al. 2024).

4.3.4. Linfomas

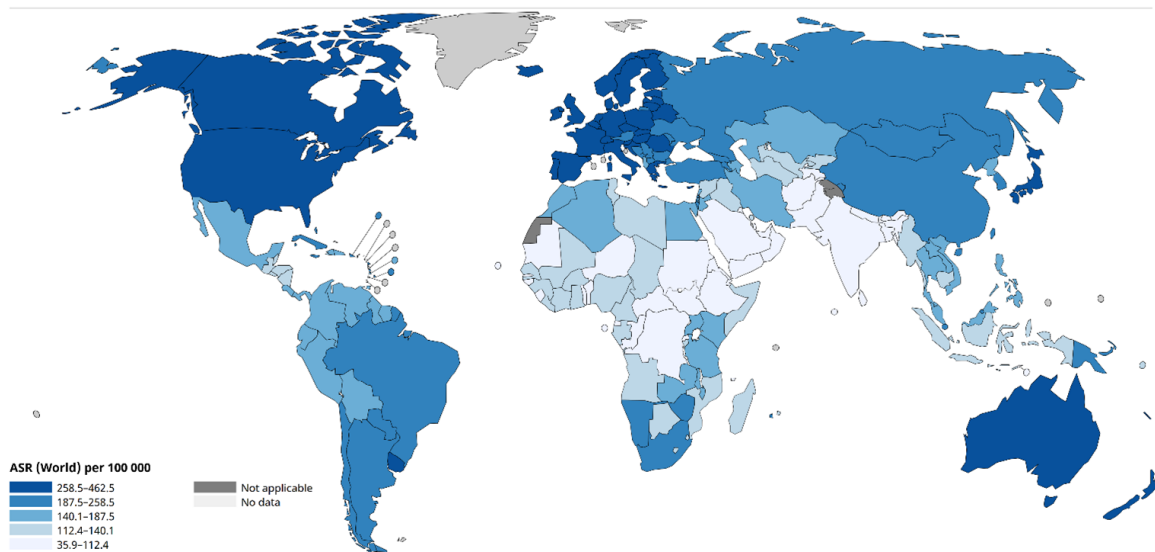
Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias malignas linfoides que tienen patrones variados de manifestaciones clínicas y respuestas al tratamiento. Su pronóstico depende del tipo histológico, factores clínico y características. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las neoplasias linfoides derivadas de células linfoides precursores de las derivadas de células linfoides maduras y separa si son de origen de células B y células T. Las neoplasias maduras comprenden linfomas no Hodgkin y los linfomas de Hodgkin se consideran una clasificación diferente (Jiang, Bennani y Feldman 2017).

4.4. Epidemiología del cáncer

4.4.1. Mundial

El cáncer es una de las mayores causas de muerte a nivel mundial (Panda et al. 2022). De acuerdo con el Observatorio Global del Cáncer (GCO) en 2022 se reportaron 19,976,499 de casos nuevos y 9,743,832 de fallecimientos debido al cáncer. La incidencia de casos es mayor en Asia, seguido de Europa y Norteamérica como se observa en la figura 11 (GCO 2022).

Figura 11: Incidencia del cáncer a nivel mundial

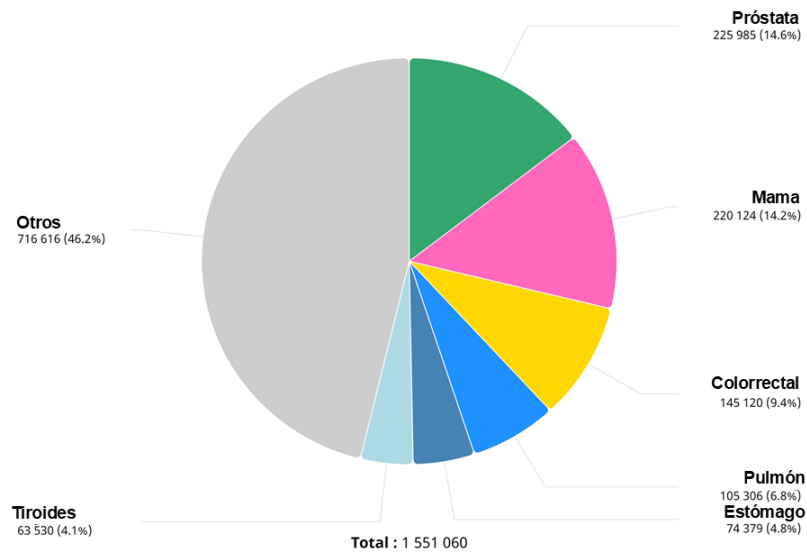


Se muestra que la incidencia del cáncer es mayor en Asia, Europa y Norteamérica. Obtenido de (GCO 2022)

4.4.2. Latinoamérica

En América Latina y el Caribe, el GCO reportó 1,551,060 nuevos casos y 749,242 muertes en 2022. Siendo los más comunes el cáncer de próstata, de mama y colorrectal, en ambos sexos, como se muestra en la figura 12. Brasil, México y Argentina siendo los países que más incidencia de casos presentaron (GCO 2022).

Figura 12: Incidencia de diferentes tipos de cáncer en Latinoamérica y el Caribe en ambos sexos durante 2022



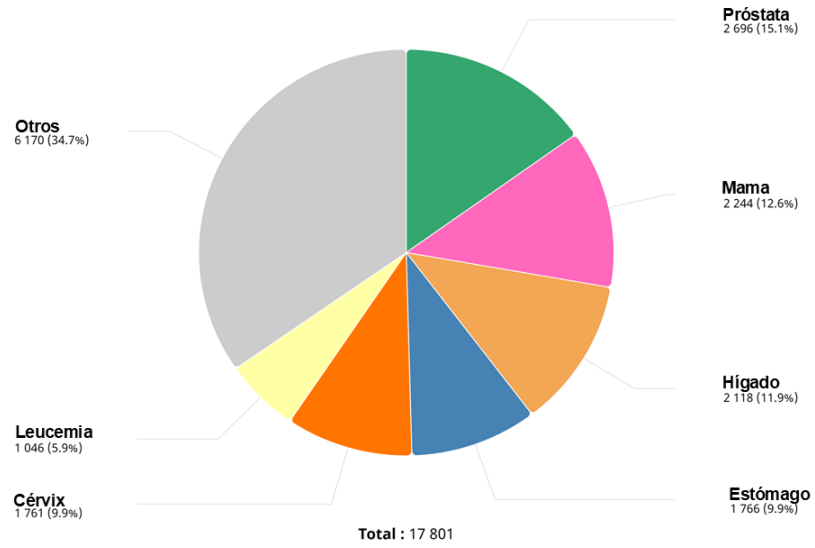
Adaptado de (GCO 2022).

4.4.3. Guatemala

En Guatemala las enfermedades no transmisibles representan el 61.6 % de la tasa de mortalidad en 2019, incluyendo el cáncer (de la Salud 2022, 23 de septiembre). En 2022 el Observatorio Global del Cáncer (GCO) reportó 17,801 nuevos casos y 10,369 muertes debido a esta enfermedad (GCO 2022). De acuerdo con GCO en 2022 el cáncer más prevalente en Guatemala es el de próstata seguido del de mama, hígado y estómago, como se muestra en la figura 13. El Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) reporta que en el área de oncología se atiende aproximadamente 130 pacientes al día, 40 % en tratamiento activo, recibiendo quimioterapias, radioterapias y otros tratamientos dirigidos, mientras que el otro 60 % son pacientes a los que se les da seguimiento (IGSS 2022, 4 de febrero). Recientemente, el Congreso de la República se aprobó el decreto 7-2024, Ley de Atención Integral del Cáncer en Guatemala que tiene como objetivo ordenar las acciones de respuesta del Estado para fortalecer políticas públicas y acciones que garanticen una atención integral para reducir la morbilidad y mortalidad por cáncer en el país (Morales 2024).

A pesar de la atención social y los avances en la política se estima que los casos de cáncer aumenten en un 40 % para 2040. Además, Guatemala carece de una base de datos acerca de los casos de cáncer y existe una brecha en la cobertura a la salud donde la mayoría de la población tiene acceso a pocos servicios (Ola 2023, 14 de diciembre). Por lo que fortalecer el sistema de salud es vital para la prevención y tratamiento de cáncer en el país. Además, el estudio de terapias alternativas que puedan ser accesibles para la población es de vital importancia debido a los altos costos que la terapia y la falta de accesibilidad a la misma.

Figura 13: Incidencia de diferentes tipos de cáncer en Guatemala en 2022



Adaptado de (GCO 2022).

4.5. Factores de riesgo

Un factor de riesgo para el cáncer es un determinante que ha sido asociado con el aumento de la incidencia de cáncer (Weeden et al. 2023). Esto se pueden clasificar como intrínsecos, no intrínsecos, exógenos y endógenos. Los factores intrínsecos son mutaciones espontáneas que no se puede evitar que resultan de error en la replicación del ADN, los factores no intrínsecos que pueden incluir factores exógenos como una infección viral o factores del estilo de vida y factores endógenos que tienen que ver con el sistema inmune, metabolismo, respuesta del daño del ADN y niveles hormonales (Wu et al. 2018). En la tabla ?? se muestran los porcentajes de firmas mutacionales de factores extrínsecos e intrínsecos de causas conocidas y desconocidas en los distintos tipos de cáncer.

Cuadro 1: Porcentajes de riesgo en las firmas de mutaciones extrínsecas (Conocido (C) y Desconocido (D)) e intrínsecas de diferentes tipos de cáncer

Tipo de Cáncer	Intrínseco	Extrínseco C	Extrínseco D
ALL (Leucemia Linfoblástica Aguda)	65.8	34.2	0.0
AML (Leucemia Mieloide Aguda)	100.0	0.0	0.0
Vejiga	14.2	71.2	14.6
Mama	35.5	60.1	4.4
Cervical	25.3	74.7	0.0
CLL (Leucemia Linfocítica Crónica)	76.7	23.3	0.0
Colorrectal	17.1	66.0	16.9
Esófago	48.0	25.3	26.7
Glioblastoma	53.8	0.0	46.2
Glioma de Bajo Grado	9.2	2.8	88.0
Cabeza y Cuello	24.9	75.1	0.0
Riñón Cromóforo	17.4	37.5	45.1
Riñón Células Claras	66.5	4.1	29.4
Riñón Papilar	0.0	15.7	84.3
Hígado	10.9	21.3	67.8
Pulmón	9.1	73.8	17.1
Adenocarcinoma			
Linfoma de Células B	46.3	33.4	20.3
Meduloblastoma	48.4	0.0	51.6
Melanoma	7.2	90.9	1.9
Mieloma	0.0	19.9	80.1
Neuroblastoma	53.2	0.0	46.8
Ovario	36.6	63.4	0.0
Páncreas	49.9	50.1	0.0
Próstata	32.2	10.2	57.6
Estómago	22.3	6.1	71.6
Tiroides	0.0	39.7	60.3
Útero	10.7	65.5	23.8

Adaptado y traducido de (Wu et al. 2016)

4.5.1. Intrínsecos

Los factores de riesgo intrínsecos surgen de la tasa de mutación basal que existe en todas las células en división. Es un factor biológico que causa mutaciones en el ADN de los humanos, estas pueden ser impulsoras que llevan al desarrollo del cáncer o pasajeras que no afectan a la formación de cáncer. Los modelos sugieren que el 64% de las probabilidades de el desarrollo de cáncer se deben a errores aleatorios no modificables, sin embargo, en otros estudios han encontrado que el riesgo no distingue entre factores intrínsecos y extrínsecos. Los tejidos con un mayor número de divisiones celulares son más susceptibles tanto a un mayor número de mutaciones intrínsecas como a mutaciones inducidas por factores. Se ha encontrado una correlación de los niveles de metilación de ADN en los tejidos y el cáncer, sin embargo, estos cambios epigenéticos pueden ser influenciado tanto por factores exógenos y endógenos (Wu et al. 2018).

4.5.2. Extrínsecos

Los mecanismos de los factores no intrínsecos que impulsan el cáncer son multifacéticos. Algunos pueden ser impulsados por sustancias químicas o infecciones que inducen la activación de oncogenes o represión de genes moduladores de cáncer. Estos son distintos del error de replicación e incluyen factores exógenos y endógenos. Los factores exógenos como el humo del tabaco, radiación UV y VPH se han reportado en la incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer. Además, la incidencia muestra patrones geográficos distintivos, con regiones de alta incidencia y de baja incidencia. Por último, los mutágenos como la radiación ultravioleta o el tabaco producen mutaciones relacionada con la incidencia de cáncer endógenos (Wu et al. 2018).

4.6. Biología celular del cáncer

4.6.1. Células cancerosas

Las células cancerosas son genéticamente inestables. Esta heterogeneidad genética puede provocar sensibilidad variada a los fármacos o resistencia. La persistencia del cáncer puede deberse a mecanismos que incluyen procesos epigenéticos, transcripcionales. Existen cuatro estrategias: ralentización de la proliferación celular, adaptación del metabolismo celular, cambio de identidad celular y secuestro del microambiente (Shen, Vagner y Robert 2020). Estas células pueden presentar múltiples aberraciones cromosómicas durante la progresión del tumor como reordenamientos, deleciones y duplicaciones. Los reordenamientos pueden provocar cáncer mediante a la formación de un gen híbrido o desregulación del gen. Por otro lado las deleciones y duplicaciones pueden provocar la inactivación de genes supresores de tumores o aumentar el número de copias de un gen (Lobo 2008).

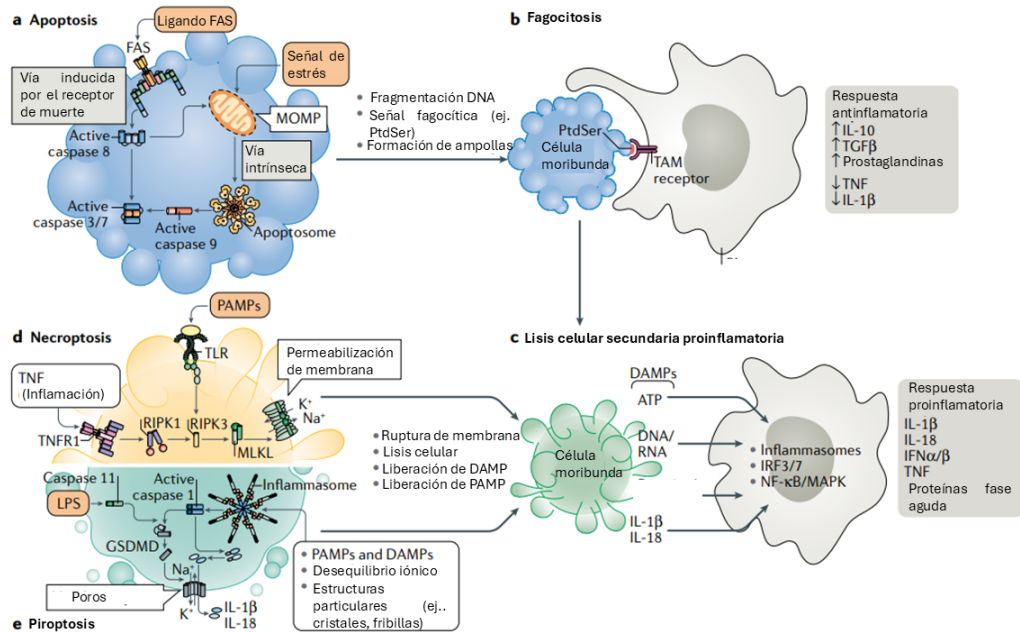
4.6.2. Muerte celular programada

El proceso de muerte celular programada (PCD) o apoptosis se distingue por características morfológicas y mecanismos bioquímicos. Ocurre durante normalmente durante el desarrollo, envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener poblaciones celulares en los tejidos. Además, ocurre como un mecanismo de defensa o cuando las células son dañadas. Algunas células expresan receptores Fas o TNF que pueden provocar apoptosis mediante la unión de ligandos y la reticulación de proteínas. La contracción y picnosis son visibles; durante la contracción celular se observan las células más pequeñas y en la picnosis se da una concentración de la cromatina (Elmore 2007).

Existen distintas rutas de PCD que difieren según su maquinaria y activación. La apoptosis puede iniciar por la vía intrínseca o extrínseca; la ruta del receptor de muerte se activa en la membrana plasmática por ligandos (e.g. FAS) que se une a sus receptores afines y ocasiona una activación de la caspasa 8. La vía intrínseca puede ser inducida por un estímulo de estrés celular, está asociada con la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOP) lo que provoca una liberación del citocromo c; se forman los apoptosomas y se activa la caspasa 9, como se observa en la figura 14.A, esto provoca la exposición de la fosfatidilserina. Los macrófagos al reconocer la fosfatidilserina por su receptor TAM eliminan las células apoptóticas, como se muestra en la figura 14.B (Bedoui, Herold y Strasser 2020).

La necroptosis y piroptosis son las principales formas líticas de PCD, están asociados a lisis celular, esto provoca una liberación de patrones moleculares asociados a daños y PAMPs (si existe una infección), estos son reconocidos por fagocitos y se producen citocinas proinflamatorias. La necroptosis es inducida a través de la estimulación del receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) o del receptor tipo Toll (TLR). Esta activación provoca la activación de la pseudoquinasa del linaje mixto (MLKL) y es traslocada a la membrana celular e induce la ruptura a través de la formación de poros como se muestra en la figura 14.D y E (Bedoui et al., 2020).

Figura 14: Diferentes mecanismos de muerte celular programada



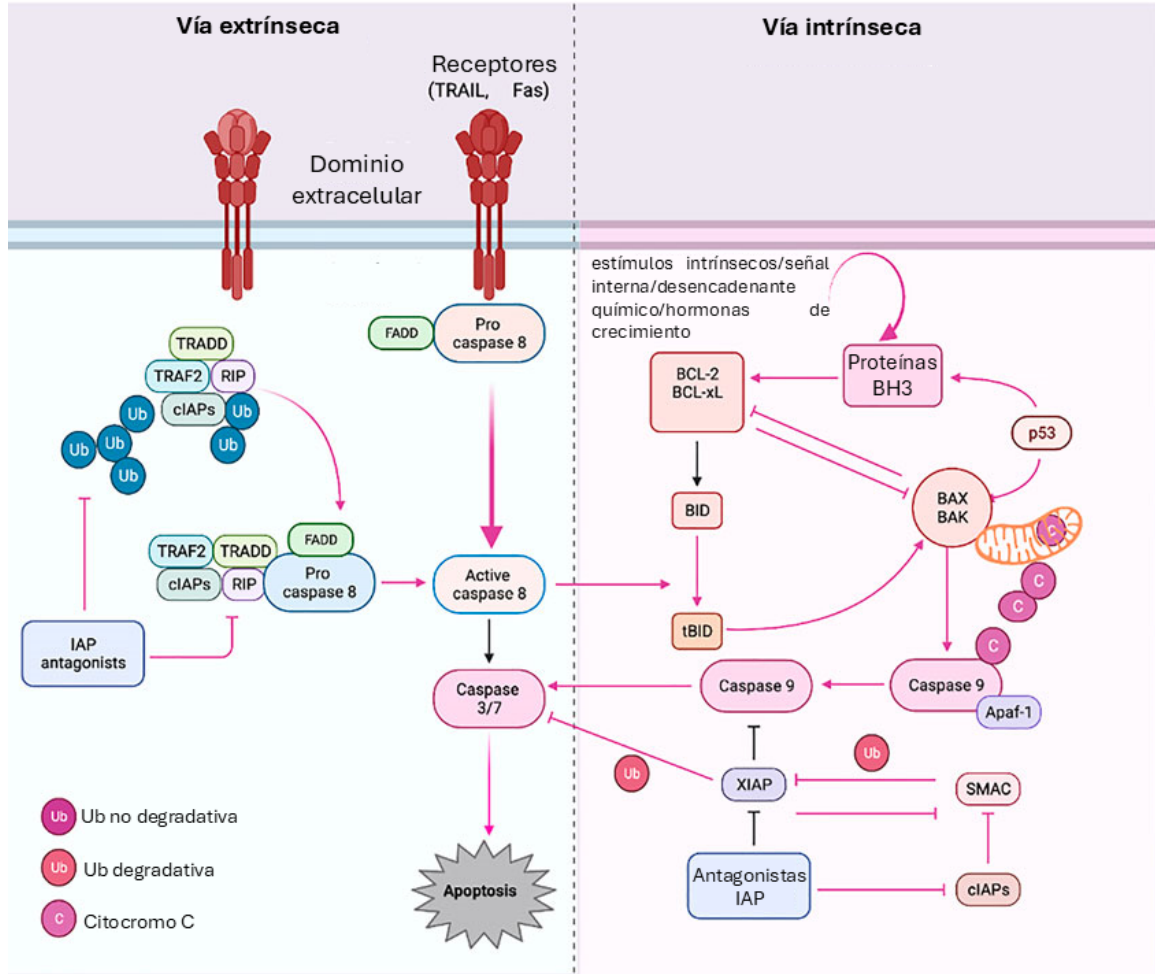
Adaptado de (Bedoui, Herold y Strasser 2020)

4.6.2.1. Vía apoptótica extrínseca

En la vía extrínseca la apoptosis se inicia por las interacciones mediadas por los receptores transmembrana; estos receptores son miembros de la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). Estas proteínas tienen un dominio citoplásmico que juega un papel importante en la transmisión de señal de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelular. En la vía de la perforina/granzima está mediada por las células T, los linfocitos T citotóxicos liberan gránulos que contienen granzimas hacia el interior de las células. La granzima B activa la procaspasa-10 y caspasa-3 y la granzima A activa las vías independientes de caspasas. En la vía intrínseca indica la apoptosis por una variedad de estímulos y se inicia en la mitocondria.

Debido a que estos estímulos provocan cambios en la membrana mitocondrial y apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, causando la liberación de proteínas proapoptóticas. La regulación de esta vía ocurre a través de los miembros de la familia de proteínas *Bcl-2* como se muestra en la figura 15 (Elmore 2007).

Figura 15: Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis



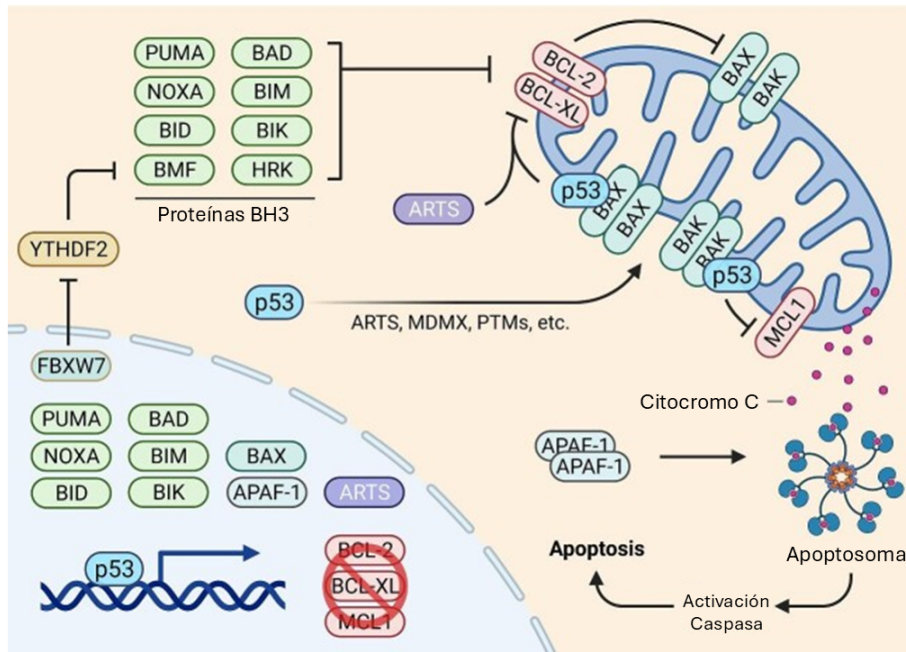
Adaptado de (Chaudhry et al. 2022)

4.6.2.2. Vía apoptótica intrínseca

Esta vía se conoce como la apoptosis mitocondrial y como se mencionó previamente, implica una interacción compleja entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia BCL-2 como se muestra en la figura 16 (Rumani, Letai y Sarosiek 2019). Ante diversas señales de estrés, las proteínas proapoptóticas del dominio BH3 y otras proteínas pueden ser activadas para interactuar con y activar proteínas formadoras de poros como la proteína X asociada a BCL-2 (*BAX*) en la membrana mitocondrial externa, esto provoca la permeabilización de la membrana externa, segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias (SMAC), serina proteasa HTRA2/OMI, liberación de citocromo c; este se asocia con el factor activador APAF1 para formar el apoptosoma y facilitar activación de la caspasa-9, mientras que SMAC y HTRA2/OMI que suprimen la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP) antiapoptótica, como se muestra en la figura 16 (Hao

et al. 2022).

Figura 16: Red de señalización apoptótica mitocondrial dependiente de p53



Adaptado de (Hao et al. 2022)

4.6.3. Regulación de la apoptosis

La activación de la vía proapoptótica o antiapoptótica está sujeta a reguladores genéticos y ambientales que pueden ser negativos o positivos. La activación de un gen proapoptótico provocará la muerte celular mientras que la desactivación bloqueará esas vías. Los reguladores genéticos incluyen a la familia de genes c-Myc, el gen supresor de tumores p52, los DR y la familia de las caspasas (O'Brien y Kirby 2008).

4.6.3.1. Genes proapoptóticos

4.6.3.2. *Puma*

La proteína p53 es una proteína supresora de tumores que inhiben el crecimiento de células anormales para prevenir el cáncer. Se induce por diferentes tipos de estrés incluyendo el daño de ADN, activación de oncogenes e hipoxia (Nakano y Vousden 2001). El modulador de la apoptosis regulado positivamente por p53 (*Puma*) es uno de los inhibidores más potentes entre el subgrupo de miembros de la familia Bcl-2 que tienen homología con el dominio BH3. Actúa como una molécula de señalización que transduce señales de muerte a las mitocondrias, actúa a través de los miembros de la familia Bcl-2 para inducir la disfunción mitocondrial y activación de la caspasa. Activa directamente *Bax* o *Bak* al aliviar la inhibición de estas proteínas por miembros antiapoptóticos de como *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *Bcl-w* y *A1* (Yu y Zhang 2008).

4.6.3.3. *Bax*

BAX es miembro de la familia de proteínas Bcl-2 que se asocian a la apoptosis. Se localiza en la mitocondria y la sobreexpresión de BAX está asociada con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el aumento de especies reactivas de oxígeno. Las proteínas BIM, BID y PUMA pueden activar a BAX. Esta activación ocurre al unirse a BH3 y se inducen cambios en la conformación de BAX (Spitz et al. 2021).

4.6.3.4. Genes anti-apoptóticos

4.6.3.5. *Bcl-2*

Es una proteína antiapoptótica que posee un dominios BH1-4 que preservan la integridad de la membrana externa mitocondrial a través de la inhibición de proteínas proapoptóticas (Opferman y Kothari 2018). El gen *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) es el principal constituyente de la familia de proteínas Bcl-2. Es inducido por las proteínas kinasas y diferentes moléculas de señalización. Se ha relacionada al cáncer, su sobreexpresión esta relacionada al crecimiento celular, proliferación, reparación de ADN y tumorigenesis y se ha encontrado en distintos tipos de cáncer en humanos (Alam et al. 2021). Inhibe la apoptosis al formar un heterodímero con BAX y asegurar la supervivencia celular al regular la concentración de Ca^{2+} . Además, puede inhibir la actividad de caspasa-9,3,6 y 7 lo que inhibe la apoptosis y prolonga el tiempo de supervivencia de las células tumorales (Qian et al. 2022).

4.6.3.6. *XIAP*

El inhibidor de la proteína de la apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP) es una proteína ligasa de ubiquitina E3 de 497 aminoácidos codificada por la región Xq25 del cromosoma X. Juega un rol importante en la PCD a través de la inhibición de la cascada de caspasas. Pertenece a la familia de IAPs que tiene la habilidad de regular la muerte y supervivencia celular. Se expresa de forma ubicua en todos los tejidos humanos adultos y fetales excepto en los leucocitos de sangre periférica. Inhibe la actividad de la caspaa-9,3 y 7.Su sobreexpresión está asociada a varios tipos de cáncer y progresión de la enfermedad. Se ha encontrado que XIAP regula la permeabilización de la membrana mitocondrial (Silke y Meier 2013).

4.6.4. Métodos de diagnóstico

4.6.4.1. Biopsias

Una biopsia es un proceso para remover células o tejidos para la examinación; las biopsias más comunes son : la biopsia por incisión, por escisión y con aguja. En oncología las biopsias son el estándar de oro y se realizan para establecer un diagnóstico sobre la malignidad, identificar la histología del tumor y confirmar presencia de metástasis. Debido al avance en la tecnología el realizar una biopsia guiada por imágenes se ha vuelto una herramienta importante para el diagnóstico y se ha utilizado para ensayos moleculares y de biomarcadores (Ziv, Durack y Solomon 2016).

4.6.4.2. Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son indicadores bioquímicos de la presencia de un tumor. Son moléculas detectables en el plasma o fluidos corporales y están asociadas a una neoplasia maligna. Estos

marcadores son producidos por las células tumorales o en respuesta al tumor. No son la modalidad principal para el diagnóstico de cáncer, sino que se utilizan para el respaldar el diagnóstico. El nivel de expresión del marcador puede reflejar el estadio de la enfermedad y determinar el pronóstico. Además, que permiten darle seguimiento a la respuesta de la terapia o indicar una recaída en un período de seguimiento (Nagpal et al. 2016).

4.6.4.3. Secuenciación exómica

La tecnología de secuenciación de segunda generación ha permitido revelar el mecanismo de la tumorigenesis y encontrar genes importantes para la progresión del cáncer que podrían ser utilizados como objetivos para tratamiento. El exoma es una parte del genoma que está formado por exones que son regiones codificantes (Liu, Wang y Chen 2013). Esta tecnologías permite catalogar mutaciones somáticas que ocurren en un tumor y seleccionar genes que están mutados para la identificación de vías oncogénicas. Puede ser aplicado para el diagnóstico debido a que en algunos tipos de cáncer estos son genéticamente heterogéneos, lo que hace que el diagnóstico molecular sea difícil (Tetreault et al. 2015). En el tabla 2 se muestra una comparación de cada método de diagnóstico previamente descrito.

Cuadro 2: Fortalezas y Limitaciones de Diferentes Métodos de Detección

Método de Detección	Fortalezas	Limitaciones
Métodos basados en imágenes (TC, RM, PET, etc.)	Rápidos; fáciles de usar; visualizan tumores sólidos	Incapaces de detectar enfermedad residual mínima; exponen a los pacientes a radiación ionizante adicional
Biopsia sólida	Refleja ciertos aspectos histológicos; tiempo de operación corto	No representa todo el tumor debido a la heterogeneidad; incomodidad para el paciente; no accesible para ciertos tumores
Biopsia líquida	No invasiva; fácil de obtener	Baja especificidad; no detectable en la mayoría de los pacientes con cáncer avanzado
Marcadores tumorales	No invasiva; alta especificidad y sensibilidad; proporciona una instantánea personalizada de la enfermedad	Baja relación señal-ruido
Exosomas	No invasiva; fácil de aislar o enriquecer	Falta de estudios a gran escala; difícil de definir

Adaptado y traducido de (Aryal y Aryal 2018)

4.6.5. Tratamientos

4.6.5.1. Cirugía

La cirugía para tratar el cáncer ha sido utilizada para remover el tumor durante mucho tiempo. El objetivo principal de esta técnica es extirpar el tumor con un margen circundante del tejido sano, en lugar de cortar el tejido canceroso. A pesar de ser efectivo para algunos pacientes, este tratamiento no modificó la mortalidad por cáncer a largo plazo. Sin embargo, este desafío ha sido superado por

una combinación de técnicas quirúrgicas avanzadas, uso de terapias neoadyuvantes y adyuvantes para reducir la extensión de la cirugía. La morbilidad por la cirugía ha sido reducida al mejorar los procedimientos y combinar con otras terapias. Este tratamiento se mantiene con el primario para la mayoría de los pacientes; los avances tecnológicos han minimizado el efecto en la calidad de vida del paciente. Ejemplo de estas cirugías incluye el uso de la escisión local amplia con radioterapia en el cáncer de mama y la disección de los ganglios linfáticos axilares (Wyld, Audisio y Poston 2015).

4.6.5.2. Quimioterapia

La quimioterapia ha sido pilar de tratamiento del cáncer; esta terapia surgió por el descubrimiento que una sustancia química citotóxica podría ser utilizada como tratamiento. Las quimioterapias se dividen según su mecanismo de acción; primarios y secundarios. Incluyen agentes alquilantes y análogos de platino que inhiben la síntesis de ADN, ARN o sus componentes son inhibidores de topoisomerasa lo que provoca que la división celular se detenga. Además, tiene efectos secundarios en la biogénesis mitocondrial y en la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta terapia se administra de forma sistémica para asegurar que el fármaco llegue al tumor en una concentración suficiente. Los efectos secundarios de esta terapia son comunes y pueden llegar a ser mortales; entre lo más comunes está la náusea, vómitos, fatiga, apetito reducido, cambios en el gusto, caída del cabello, sequedad de boca y estreñimiento. La identificación de nuevos tratamientos para aliviar estos efectos es importante para mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer. Los fármacos están dirigidos a enzimas celulares cruciales o son capaces de interferir procesos celulares críticos (Altun y Sonkaya 2018).

4.6.5.3. Terapia dirigida

Para el desarrollo de una terapia dirigida es importante identificar mutaciones genéticas y proteínas anormales que resultan del crecimiento en ciertos tipos de cáncer. Este fármaco afecta solo a la proteína anormal. Además de identificar el tipo y subtipo de cáncer se determinan los objetivos moleculares; la terapia dirigida puede actuar sobre antígenos de la superficie celular, factores de crecimiento, receptores o vías de transducción de señales que regulan la progresión del ciclo celular, muerte celular, metástasis y angiogénesis (Shuel 2022).

Existen dos tipos de terapias dirigidas: los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de moléculas pequeñas. Los anticuerpos monoclonales están dirigidos a proteínas específicas o receptores en la superficie de la célula cancerosa o en el entorno que rodea al tumor, puede prevenir la proliferación celular al bloquear las moléculas que promueven el crecimiento o la angiogénesis. Por otro lado, los fármacos de moléculas pequeñas tiene bajo peso molecular lo que facilita el paso a través de la superficie celular hasta los objetivos intracelular para retardar la proliferación o causar la muerte de las células tumorales. Tiene menos efectos adversos que la quimioterapia, sin embargo, se han observados toxicidades que han provocado en pacientes problemas de la piel, decoloración de cabello, entre otros efectos secundarios que afectan a la salud del paciente. Un ejemplo es el uso de anticuerpos monoclonales como el rituximab (Shuel 2022).

4.6.5.4. Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tratamiento que estimula la inmunidad humoral y celular; puede dirigirse eficazmente a las células cancerosas y causar efectos adversos mínimos, además, proporciona inmunidad protectora contra las células tumorales. En base al conocimiento sobre la respuesta inmune al cáncer se están desarrollando vacunas contra el cáncer y terapias de puntos de control inmunológico para atacar tumores que producen antígenos específicos para células T CD8+ *naive*, otro tratamiento en desarrollo es el uso de células T modificadas genéticamente para identificar proteínas de superficie en las células tumorales y mejorar la respuesta inmune (Shimu et al. 2023).

Actualmente se han diseñado métodos de inmunoterapia como el bloqueo del punto de control inmunológico de los receptores co-inhibitorios utilizando anti-PD1/PDL1 y anti-CTLA4, vacunas de células dendríticas y terapia con citoquinas. Otra técnica utilizada es la transferencia celular adoptiva (ACT) en donde se utilizan células T modificadas con el receptor de células T (TCR) o células infiltrantes de tumores (TIL) o células T específicas del receptor de antígeno quimérico (CAR-T) que son más precisas y eficaces. La combinación de tratamientos eficaces puede mejorar el rendimiento de la inmunoterapia, dando como resultado respuestas antitumorales duraderas. A pesar de que este es un enfoque innovador, existe la necesidad de nuevos tratamientos porque los enfoques de inmunoterapia se limitan a un subconjunto de tipos de cáncer (Shimu et al. 2023).

4.6.5.5. Linfocitos infiltrantes tumorales (TIL)

Se desarrollaron como manifestaciones del reconocimiento y defensa contra células malignas, se localizan dentro de los tejidos tumorales. Se infiltran en tumores sólidos y reaccionan de forma natural a los antígenos tumorales autólogos. La presencia de TIL circulantes es buen signo de pronóstico. Se ha demostrado que una alta densidad de células T CD8+ y TIL fueron capaces de predecir una mejor supervivencia en varios tipos de cáncer (Stitzenberg y Ridge 2009, 1 de enero).

4.6.5.6. Células T gamma/delta

Las células T gamma/delta representan una pequeña población de leucocitos total en la sangre del cordón umbilical y sangre periférica. Están preparadas para reconocer células infectadas y tumorales, son capaces de responder eliminando directamente a las células. En su aplicación como terapia presentan varias ventajas como su amplio repertorio de receptores que pueden dirigirse a múltiples tipos de tumores, su función citotóxica se activa independiente del HLA y son principales productores tempranos de IFN- γ que desencadena respuesta antitumoral y orquesta las células T alfa/beta y dendríticas (Wang, Lim y Tan 2024).

4.6.5.7. Células T con receptor de antígeno quimérico (CAR)

Los receptores de antígeno quimérico (CAR) son moléculas diseñadas mediante ingeniería genética que permite a los linfocitos R reconocer y atacar células tumorales de manera específica independiente de MHC. Contiene tres dominios principales, el extracelular que contiene un fragmento variable de cadena única (scFv), el transmembrana que asegura estabilidad y el intracelular que activa al linfocito T. Estos han sido modificados al añadir moléculas coestimuladoras para mejorar su persistencia y eficacia. Se ha demostrado una gran eficacia para neoplasias hematológicas sin embargo, en tumores sólidos se han encontrado varias limitaciones como la falta de antígenos específicos, heterogeneidad antígeno, baja persistencia (Chen et al. 2024).

4.6.5.8. Células T modificadas genéticamente con receptores de células T (TCR-T)

La terapia con linfocitos T modificados para expresar receptores de células T permite el reconocimiento de antígenos intracelulares presentados por el complejo MHC-I. Para diseñarlos se debe seleccionar y optimizar receptores específicos con CRISPR-Cas9 para mejorar afinidad y estabilidad. Una vez que los TCR-T, reconocen un antígeno específico se activa la respuesta inmune en donde se liberan citoquina, proliferan linfocitos T y se destruyen las células tumorales. La efectividad de esta terapia depende de la compatibilidad entre el TCR y los alelos de HLA del paciente. Además, para el tratamiento de tumores sólidos se presentan desafíos como la toxicidad, resistencia tumoral, heterogeneidad antigénica (Baulu et al. 2023).

4.7. Investigación traslacional

La investigación traslacional se entiende como toda investigación que inicia en la ciencia básica y se concluye en la aplicación de la práctica de los conocimientos. Su objetivo es promover la investigación interdisciplinaria y acelerar el intercambio entre la ciencia y la clínica para trasladar hallazgos de la investigación básica de laboratorio a entornos donde se involucran a pacientes. A partir de estos hallazgos se busca desarrollar conocimiento crítico para combatir enfermedades, brindar servicios de apoyo, protocolos, ensayos clínicos, productos para el diagnóstico, prevención o tratamiento y desarrollar estudios sobre cómo, dónde y cuándo aplicarlos (Monteiro et al. 2021, 1 de enero).

A partir de una investigación traslacional puede surgir el desarrollo de pruebas preclínicas, que son la piedra angular para el desarrollo de fármacos o terapias. Estas pruebas son estudios preliminares de numerosos compuestos cuyo objetivo es la obtención de un fármaco seguro y eficaz. Durante la etapa preclínica se seleccionan múltiples compuestos en plataformas *in vitro* e *in vivo*. Los cultivos celulares bidimensionales se utilizan en la etapa preclínica para el estudio de la eficacia del fármaco, en donde las células se exponen metódicamente a compuestos terapéuticos y se cuantifican sus respuestas. Después de la etapa preclínica los ensayos clínicos son realizados en tres fases en donde se mide la seguridad del producto, se investiga la eficacia y se analizar el rendimiento general del fármaco (van Rijt, Stefanek y Valente 2023).

En el estudio del cáncer los tratamientos potenciales tienen una tasa baja de aprobación clínica y su desarrollo implica un alto costo. Por lo que, es necesario desarrollar nuevas plataformas preclínicas más efectivas para los compuestos con potencial antitumoral. El uso de modelos tumorales *in vitro* son una herramienta que permite buscar nuevos compuestos y evaluar su eficacia. A partir de los años 80 se utilizó un panel compuesto por 60 líneas celulares humanas diferentes procedentes de tumores conocido como NCI60. Lo que permitió que fármacos de interés pudieran pasar a la siguiente etapa, se creó una base de datos que permitió analizar nuevas combinaciones efectivas de medicamentos y el desarrollo de nuevos ensayos clínicos (Kitaeva et al. 2020).

4.7.1. Líneas celulares como modelo de estudios *in vitro*

Las líneas celulares son un recurso importante para la investigación y son utilizadas como modelos *in vitro* de enfermedades humanas, incluido el cáncer. El uso de estas líneas en la investigación del cáncer ha permitido ampliar el conocimiento en la regulación del crecimiento celular, diferenciación, tumorigenesis y metástasis. Además, de que ha permitido la identificación de compuestos con un potencial antitumoral (Chen et al. 2018).

4.7.1.1. Línea celular de neuroblastoma humano (LAN-1)

El neuroblastoma es un tumor maligno pediátrico que surge de los neuroblastos simpáticos posganglionares derivados de la cresta neural embrionaria. Representa un 9% de todos los cánceres infantiles. La línea celular de neuroblastoma humano se deriva de tejidos primarios y metastásicos, exhibe marcadores neuronales como neurofilamentos, enolasa específica de neuronas y procesos similares a neuritas. La línea celular LAN-1 exhibe una morfología distintiva y está asociada a su origen neuroplástico, presentan un forma poligonal, adherente al sustrato (Thiele 1998).

Presenta alteraciones cromosómicas como la pérdida o reordenamiento del brazo corto del cromosoma 1 (1p) lo que implica una pérdida de genes supresores tumorales y la amplificación del gen *MYCN* en 2p23-24 que se asocia con tumores agresivos y pronósticos poco favorables. Se observan reordenamientos en los cromosomas 11,14 y 17 (Thiele 1998).

4.7.1.2. Línea celular de cáncer de mama humano (UFH-001)

La línea celular de cáncer de mama UFH-001 se deriva de la línea epitelial mamaria MCF10A, representa un modelo novedoso para el estudio de cáncer de mama triple negativo que se caracteriza por la expresión constitutiva de la anhidrasa carbónica IX (CAIX). Se destaca por tener un fenotipo agresivo, capacidad de crecimiento tumoral y formación de esferoides. Presentan una forma similar a un empedrado y tienden a formar colonias compactas tanto en densidades bajas como altas. Conservan un perfil STR similar a MCF10A y presentan mutaciones somáticas en el gen *vWA* (Chen et al. 2018).

4.7.2. Cultivo celular

El cultivo celular es el conjunto de técnicas de laboratorio que permiten el crecimiento de células eucariotas o procariotas en condiciones fisiológicas. Por lo general se utilizan líneas celulares que se alinean con los equipos disponibles y se puede clasificar en tres tipos; las primarias como los fibroblastos obtenidos de biopsias de piel, estas células son finitas y su proliferación cesa después de una cantidad limitada de divisiones celulares, las células transformadas de forma natural o mediante manipulación genética y las líneas celulares autorrenovables como las células madre embrionarias, que tienen la capacidad de diferenciarse en una diversidad de otros tipos de células (Segeritz y Vallier 2017).

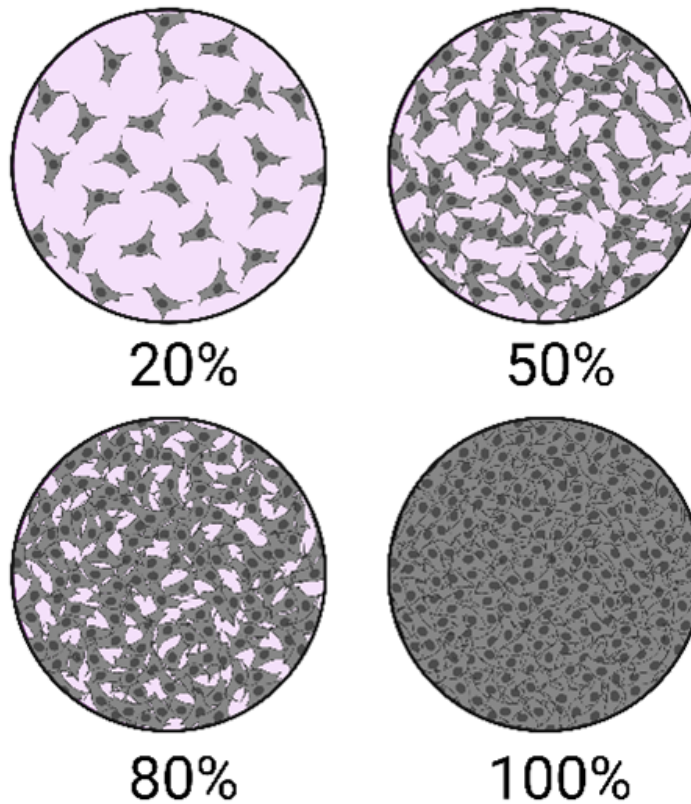
Un requisito importante es la selección de condiciones de crecimiento adecuadas. Es importante crear un entorno que permita la propagación celular y que el medio contenga nutrientes, hormonas y propiedades fisicoquímicas adecuadas para el crecimiento celular. Las líneas celulares adherentes se mantienen en placas y los cambios regulares garantizan una propagación celular saludable (Segeritz y Vallier 2017).

El cultivo celular es de las técnicas más importantes debido a que proporciona una plataforma para investigar células sanas y aquellas que presentan una patología. Además, el uso de células cancerosas inmortalizadas ha proporcionado una visión de la biología del cáncer y se han probado fármacos o terapias para observar sus efectos (Segeritz y Vallier 2017).

4.7.2.1. Confluencia celular

El crecimiento celular ocurre en cuatro fases, la fase lag en donde las células se adaptan al medio de cultivo y no se han dividido, la fase logarítmica en donde las células se están dividiendo de manera activa, esta fase se considera la mejor para la experimentación; la fase estacionaria en donde el crecimiento es lento y luego la fase de muerte (Oyeleye et al., 2016). La confluencia celular es el porcentaje del frasco de cultivo que parece estar cubierto por la capa de células, como se muestra en la figura 17 (Bestbier 2024). Por lo general, se recomienda realizar un subcultivo cuando se observa el 80 % de confluencia celular (Segeritz y Vallier 2017).

Figura 17: Esquematación de diferentes porcentajes de confluencia celular



Obtenido de (Bestbier 2024).

4.7.2.2. Viabilidad celular

Durante el cultivo o su manipulación las células pueden morir, la viabilidad celular se define como el número de células sanas en un cultivo (Adan, Kiraz y Baran 2016). Generalmente, se determina la viabilidad de las células a través del recuento de células utilizando azul tripán en una relación 1:1, este colorante permea solo las células no viables. Para realizar el conteo se utiliza un hemocitómetro y un microscopio invertido. El porcentaje de células se determina dividiendo el número de células no teñidas por el número total de células y multiplicando por 100. Un cultivo celular sano se caracteriza por tener una viabilidad celular del 80-95 % (Segeritz y Vallier 2017).

4.7.2.3. Citotoxicidad

La citotoxicidad es un término utilizado para describir el efecto tóxico en cualquier célula. En el desarrollo de fármacos el primer criterio evaluado debido a que proporciona información importante para establecer parámetros relacionados a la dosis. Las moléculas cargadas provocan permeabilización de la membrana celular y son propensas a causar citotoxicidad a una dosis o concentración específica (Gould y Templin 2023). Esto se puede medir a través de analizar los efectos de los diferentes componentes en la viabilidad de las células en crecimiento; esto se realiza generalmente determinando el número de células restantes después de un período definido de incubación (Riss, Moravec y Niles 2011).

La detección de células muertas se logra midiendo el movimiento de moléculas dentro o fuera de las células a través de membranas que se han vuelto permeables. Los marcadores que existen en el citoplasma sirve como indicadores. El marcador puede existir de forma natural o introducirse artificialmente como la carga de cromo radiactivo ³¹ o marcador fluorescente de células viables. Otra clase de moléculas se denominan colorantes vitales que pueden entrar a la célula a través de las membranas dañadas (Riss et al. 2004).

Para determinar esto se puede utilizar el ensayo de tetrazolio MTT que se fue diseñado para analizar grandes cantidades de muestras. Este compuesto es reducido por las células viables en un precipitado de formazán e color intenso que solubiliza en una solución de color uniforme y el producto coloreado es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Riss, Moravec y Niles 2011).

4.7.2.4. Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una tecnología que se utiliza para realizar un análisis multiparamétrico rápido de células individuales en solución. Los citómetros de flujo utilizan láseres como fuentes de luz para producir señales de luz que son dispersadas y leídas por detectores de fotodiodos o tubos fotomultiplicadores. Estas señales son convertidas por una computadora y escritas en un formato estandarizado. Las poblaciones de células pueden ser analizados en función de sus características de fluorescencia o dispersión de luz (McKinnon 2018).

Se utilizan diferentes reactivos fluorescentes, entre ellos, anticuerpos conjugados con fluorescencia, colorantes de unión al ADN, colorantes de viabilidad, colorantes indicadores de iones y proteínas de expresión fluorescentes. Se puede aplicar esta técnica para inmunofenotipificación utilizando anticuerpos conjugados con fluorocromos, para evaluar respuestas específicas a antígenos, análisis de citoquinas intracelulares, análisis de apoptosis y proliferación, entre otras aplicaciones inmunológicas de gran aplicación y utilidad (McKinnon 2018).

El alcance de este trabajo de graduación consiste en evaluar la actividad cancerígena de tres extractos de hongos en la línea celular de hámster chino (CHO) y las líneas tumorales de neuroblastoma humano (LAN-1) y cáncer de mama (UFH-001). Debido a que las terapias tradicionales su eficiencia ha disminuido es necesario encontrar terapias alternativas que no sean específicas y no afecten la calidad de vida del paciente. Como consideraciones para este trabajo de graduación se tiene que las pruebas son realizadas in vitro y que necesitan de más investigaciones para ser aplicadas como terapia para el cáncer. Sin embargo, este estudio sirve de base para futuras investigaciones y ensayos in vivo. Y proporciona información preliminar de la actividad biológica de los extractos de hongos. Por limitaciones se menciona que los resultados no reflejan las condiciones complejas del cuerpo humano por lo que no se puede afirmar una eficacia clínica y no se cuenta con los insumos necesario para realizar pruebas de dosis seguras y efectivas, así como la toxicidad a largo plazo.

6.1. Sitio de estudio

El presente trabajo de graduación de llevó a cabo en la Universidad del Valle de Guatemala ubicada en la Ciudad de Guatemala, 18 Av. 11-95 zona 15, Vista Hermosa III. Dentro de los laboratorios ubicados en el edificio C de microbiología equipado con los insumos necesarios para la preparación del extracto, el laboratorio B-hive en el CIT-115 un laboratorio de biología molecular y I1-314 de biología celular equipado con los insumos necesarios para cultivo y desarrollo de la investigación. Las líneas celulares LAN-1, CHO y UFH-001 fueron brindadas por el departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular.

6.2. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Se trata de una investigación experimental con un enfoque cuantitativo y de tipo exploratorio. Debido a que durante la realización de este trabajo de investigación se manipularan variables independientes (especie de hongo y concentración del extracto) para observar su efecto en las variables dependientes (viabilidad celular, citotoxicidad y expresión génica). Además, las condiciones experimentales están estrictamente controladas para minimizar el efecto externas en los resultados. Los métodos empleados son reproducibles lo que permitirá validar los resultados. Al tener un enfoque cuantitativo, se obtuvieron datos numéricos y se realizó el correspondiente análisis estadístico y su interpretación. Finalmente, al ser de tipo exploratorio se pretendía generar conocimiento preliminar sobre un área poco explorada y dejar las bases para futuras investigaciones

6.3. Tipo y tamaño de muestra

En esta investigación se utilizaron cuatro especies de hongos endémicos de Guatemala: *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes menziensii*, siendo la última especie añadida al estudio durante la fase de experimental; fueron brindados por la Licda. Laura Palmieri. Las especies *S. commune* y *P. sanguineus* fueron recolectados en Izabal y Retalhuleu, respectivamente. Para evaluar el efecto citotóxico de estos extractos, se utilizaron tres líneas celulares diferentes: células de ovario de hámster chino (CHO), neuroblastoma humano (LAN-1) y células de cáncer de mama humano (UFH-001), la línea celular CHO fue utilizada como grupo control. Dichas líneas celulares fueron brindadas por el Departamento de Bioquímica y Microbiología y Biotecnología Molecular y el Departamento de Biología de la Universidad de Guatemala. Para los ensayos de viabilidad por azul de tripano y qPCR se realizó una réplica y para el ensayo de viabilidad por MTT se realizó en triplicado.

6.4. Variables

Las variables que están involucradas en este trabajo de investigación se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3: Operacionalización de las variables evaluadas en la investigación

Definición	Indicador	Dimensiones	Instrumento de Medición	Definición Operacional
Viabilidad celular: Capacidad de las células de sobrevivir y proliferar al ser expuestas a los extractos de los hongos.	Porcentaje de células viables	Número de células viables y Número de células totales	Tinción con azul de tripano, visualización a través de microscopio óptico	Determinación de la viabilidad celular tras ser expuestas a distintos tratamientos de los extractos de hongos.
Citotoxicidad: Capacidad de los extractos de los hongos a inducir muerte celular.	Porcentaje de células muertas	Densidad óptica y número de células	Tinción a través del ensayo MTT, visualización a través de microscopio óptico	Determinación de la citotoxicidad tras ser expuestas a distintos tratamientos de los extractos de los hongos.
Expresión génica: Nivel de expresión génica relacionada a la muerte celular programada en células control, tratadas y no tratadas.	Cantidad relativa de ADNc de genes específicos (PUMA y BAX)	Expresión génica de genes PUMA y BAX (genes proapoptóticos)	Termociclador en tiempo real	Cantidad de ADNc en células tratadas y control mediante qPCR.

6.5. Hipótesis

6.5.1. Hipótesis principal

Existe un potencial anti-tumoral en las especies endémicas de *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensisii* y *Schizophyllum commune* debido a que tienen un efecto de citotoxicidad y disminuyen la capacidad de crecimiento en las líneas celulares de neuroblastoma humano (LAN-1) y cáncer de mama humano (UFH-001). Finalmente, la exposición a cada uno de los extractos tiene un efecto en la expresión génica de genes relacionados a la muerte celular.

6.5.2. Hipótesis nula

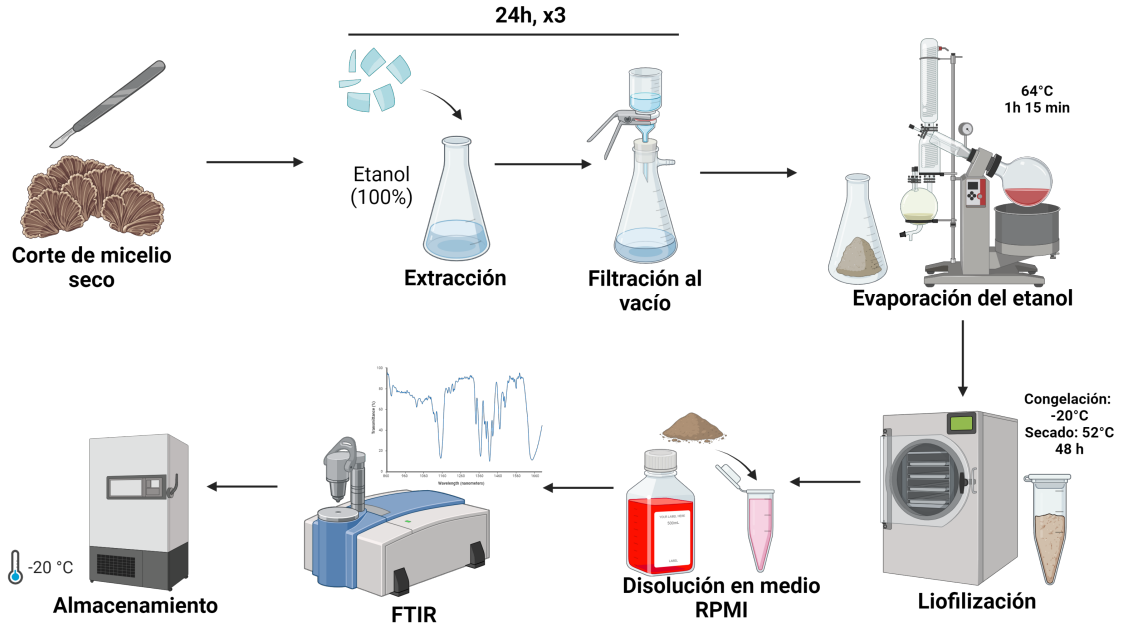
Existe un potencial anti-tumoral en las especies endémicas de hongos *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensisii* y *Schizophyllum commune* debido a que no tienen un efecto de citotoxicidad y ni disminuyen la capacidad de crecimiento en las líneas celulares de neuroblastoma humano (LAN-1) y cáncer de mama humano (UFH-001). Finalmente, la exposición a cada uno de los extractos no tiene un efecto en la expresión génica de genes relacionados a la muerte celular.

6.5.3. Hipótesis alternativa

Las especies endémicas de *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensisii* y *Schizophyllum commune* tienen un efecto en la proliferación celular al mantener la capacidad de crecimiento de las líneas celulares de neuroblastoma humano (LAN-1) y cáncer de mama humano (UFH-001).

6.6. Metodología

Figura 18: Preparación de extractos e identificación de grupos funcionales por FTIR



Elaborado en: BioRender

6.6.1. Obtención de muestras y preparación de extractos

Las muestras y especies utilizadas en este estudio fueron sugerencia de la Licda. Laura Palmieri. Basado en el potencial antitumoral reportado por otros autores, se seleccionaron las especies *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes menziensis*, esta última fue añadida durante la etapa experimental debido al interés de exploración de su posible actividad antitumoral porque no ha sido estudiada antes. Todas las especies de este estudio fueron caracterizadas morfológicamente por la Licda. Palmieri. Las muestras de hongos se secaron en un deshidratador. *T. versicolor* y *T. menziensis* son especies cultivadas. Las especies *S. commune* y *P. sanguineus* fueron recolectados en Izabal y Retalhuleu, respectivamente.

Luego del proceso de secado se pesó y limpió cada muestra de cada especie de hongo seco utilizando un bisturí para remover madera y tierra restante. Se cortaron en piezas pequeñas menores a 0.5cm, se maceró con mortero y pistilo. Se extrajo utilizando etanol; por cada 1 kg de muestra se añadió 1 L de etanol absoluto. Seguidamente, se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación; este paso se realizó tres veces (Wu et al. 2014). Luego, se filtró al vacío y se removió el solvente por destilación bajo presión reducida utilizando un rotavapor. La solución restante se liofilizó durante 48 horas (a -18°C para congelación y a 52°C para el secado) para eliminar el etanol restante. Se preparó una solución concentrada según los miligramos obtenidos de cada extracto disolviendo el producto en medio RPMI 1640 completo (Sigma Aldrich, Reino Unido) como se muestra en la figura 18 (Pięť et al. 2021).

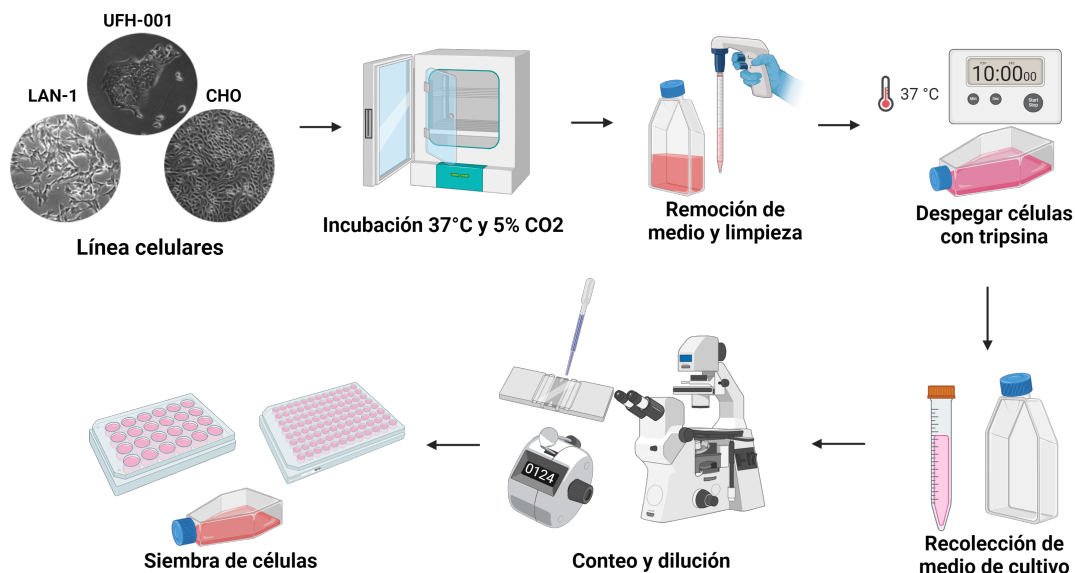
6.6.2. Identificación de grupos funcionales presentes en los extractos

El análisis de grupos funcionales se realizó empleando la técnica de espectroscopía infrarrojo. Para esto, se colocó 20 μL de cada extracto en el lecto del espectrómetro FTIR marca PerkinElmer modelo Frontier con un rango de $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ y una precisión de ± 0.00001 . Se utilizó el medio RPMI (10% de FBS y 1% penicilina y estreptomocina) sin extracto como blanco. Después de la lectura se obtuvo cuatro espectros que indica el número la longitud de onda de absorción como se observa en la figura 18. Por último, se relacionó con la región del espectro infrarrojo teórica indicada en los apéndices 2A y 2B de Wade y Simek 2017.

6.7. Cultivo celular

6.7.1. Descongelación de líneas celulares y pasajes

Figura 19: Flujo de trabajo y condiciones de cultivo celular



Elaborado en: BioRender

Se utilizaron las líneas celulares de: células de ovario de hámster chino (CHO), neuroblastoma humano (LAN-1) y células de cáncer de mama humano (UFH-001), siendo la línea celular CHO utilizada como una línea no tumoral, como se muestra en la figura 19. Las líneas celulares estaban criopreservadas a -80°C . Para su descongelación se colocó el criotubo en un baño de agua a 37°C hasta que se observara hielo por menos de un minuto. Seguidamente, en una campana de flujo laminar, se transfirieron las células descongeladas gota por gota a un tubo de 15 ml con 10 mL medio precalentado a 37°C . Se centrifugó a 1000rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con las células en medio de cultivo nuevo y se transfirieron a un frasco de cultivo T25. Cada línea celular utilizada creció adherente al frasco (Chen et al. 2018; Fatatis et al. 1992; Invitrogen s.f.).

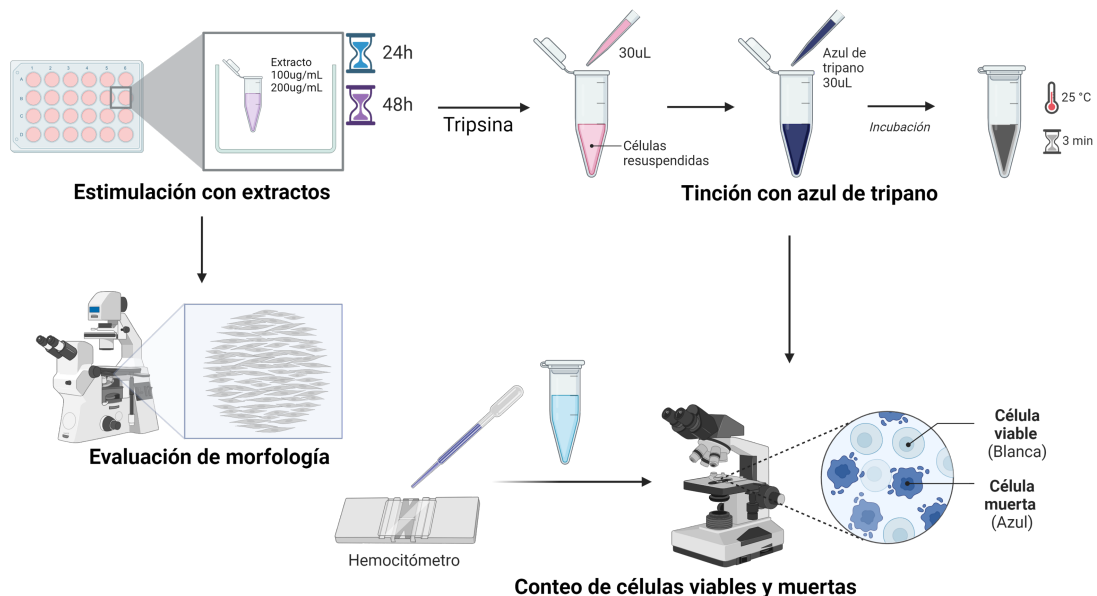
Las líneas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Reino Unido) completo suplementado con 10% (v/v) de FBS (Sigma, USA) y antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, Sigma Aldrich, Reino Unido). Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ (Pię et al. 2021). Luego de aproximadamente 3 días, se esperaba que las células alcanzaran entre un 80-90% de confluencia celular, por lo que se realizó un subcultivo. Para esto, se desechó el medio de cultivo y se añadieron 0.5 mL por cada 10 cm² de tripsina precalentada (Sigma Aldrich, US) y se movió suavemente el frasco. Se incubó a 37°C durante 10 minutos. Cuando el 90% de las células se desprendieron, se añadió 2X (2 veces el volumen añadido de tripsina) de medio precalentado, se dispersó pipeteando sobre la superficie de la capa celular varias veces. Se transfirieron las células a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en medio y se contaron las células. Finalmente, se resembraron las células en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Este procedimiento se repitió cuando alcanzaron nuevamente una confluencia celular del 80-90% (Invitrogen s.f.); previo a iniciar los cultivos celulares con exposición a extractos de hongos.

Para los ensayos de viabilidad por azul de tripano y la evaluación de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR), se sembraron 0.3x10⁶ células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se expusieron a cada extracto en un volumen final de 2mL. Después de 24 y 48 horas, las células fueron almacenadas con 30µL de ARNlater (*Invitrogen*, USA) y almacenadas a -80°C. Para el ensayo de MTT se utilizó una placa de 96 pocillos y se colocaron 5x10³ células por pocillo, utilizando un volumen final de 100µL. Todos los ensayos se se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

6.7.2. Viabilidad celular y citotoxicidad

6.7.2.1. Azul de tripano

Figura 20: Observación de morfología y ensayo de viabilidad con azul de tripano



Elaborado en: BioRender

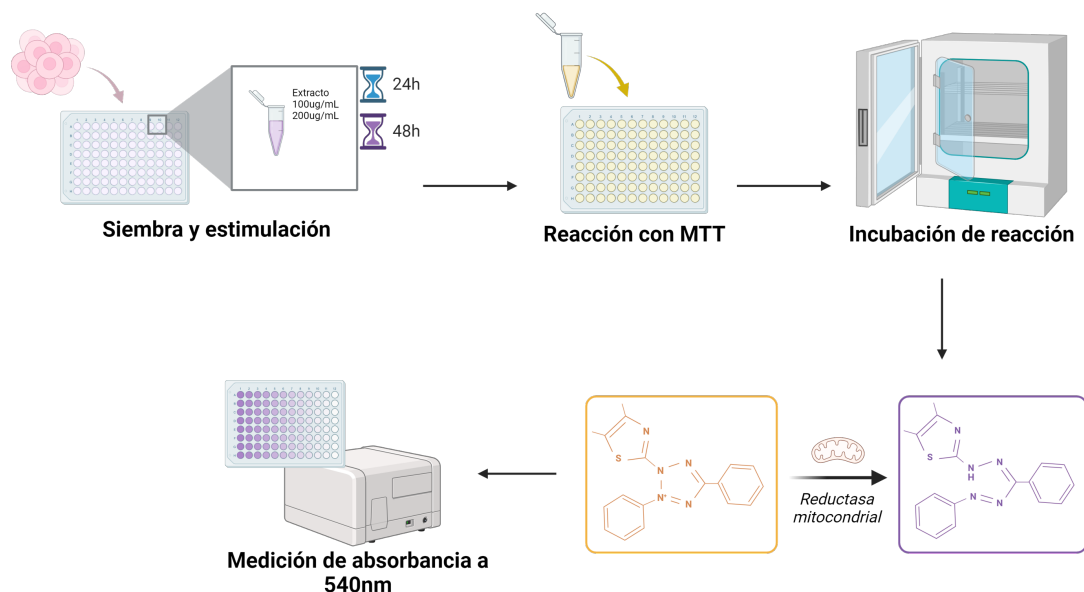
El número de células viables presentes se determinó mediante una tinción de exclusión con azul de tripano, basada en que las células viables con membranas intactas impiden una tinción con azul de tripano. Se determinó la densidad celular utilizando un hematocitómetro. En placas de 24 pocillos, se colocaron 0.3×10^6 células en medio con cada extracto de hongo en una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ y $200 \mu\text{g/mL}$, y sin extracto como control. Se incubó por 24 y 48 horas a 37°C (en placas distintas). Posterior a los tiempos de incubación, se observó la morfología y se despegaron las células con tripsina como se mencionó previamente. Se utilizó una solución de azul de tripano al 0.4 % que se mezcló en partes iguales con $10 \mu\text{L}$ de cada muestra y se dejó incubar por 3 minutos. Se agregaron $10 \mu\text{L}$ de la mezcla al hemocitómetro, y con un microscopio invertido con contraste de fase se contaron las células viables (blancas) y no viables (azules). Para determinar el número total de células por cada mL de la alícuota, se sumaron las células viables y no viables, multiplicándose luego por 2 (factor de dilución del azul de tripano), y se utilizó la ecuación 6.1 para determinar el porcentaje de células viables (Strober 2015).

$$\text{Células viables (\%)} = \frac{\text{Total de células viables por cada mL de la alícuota}}{\text{Total de células por cada mL de la alícuota}} \times 100 \quad (6.1)$$

Ecuación 6.1. Porcentaje de células viables

6.7.2.2. MTT

Figura 21: Ensayo de MTT



Elaborado en: BioRender

Para determinar la citotoxicidad de cada extracto, se llevó a cabo el ensayo MTT, basado en la habilidad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial para reducir la sal amarilla de tetrazolio (MTT) a cristales de formazán de color púrpura como se muestra en la figura 21. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Se colocaron en una placa de 96 pocillos 5×10^3 células/mL en un volumen final de $100 \mu\text{L}$. Se utilizó medio con cada extracto de hongo a $100 \mu\text{g/mL}$ y $200 \mu\text{g/mL}$, células sin tratamiento como control positivo y células con Tritón X-100 al 1 % como control negativo, dejándolas incubar por 24 y 48 horas a 37°C . Cada ensayo se realizó

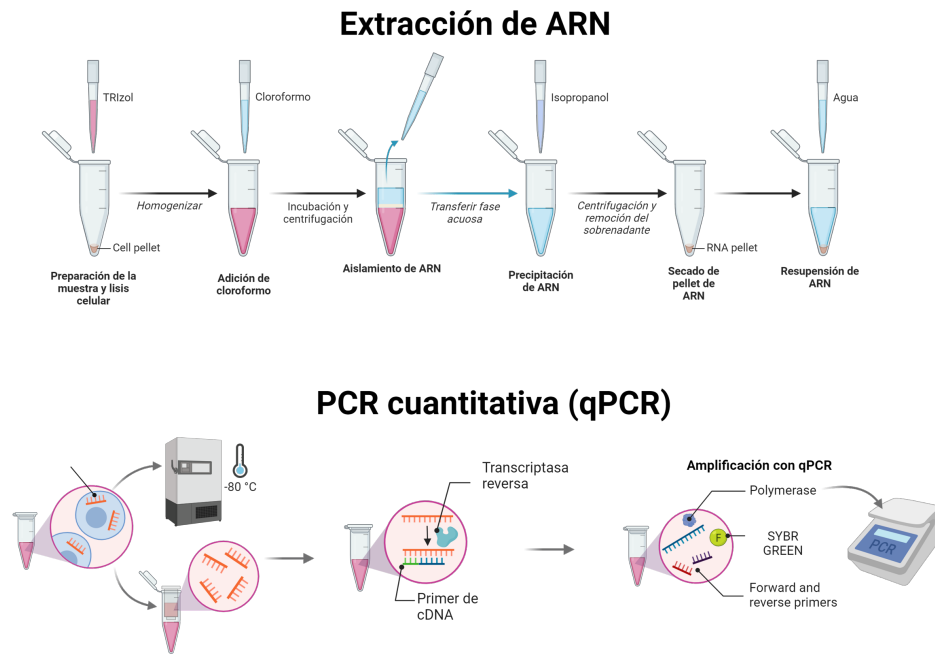
en triplicado (Apaporn Menakongka et al., 2019). Después de la incubación con cada extracto, se añadieron 10µL de MTT (5 mg/mL) a 100 µL de la muestra en una placa de 96 pocillos. Después de 3 horas, se retiraron 90µL del medio y se agregaron 100 µL de DMSO (Merck, Alemania) y se dejó incubar durante 15 minutos con agitación h. Se utilizó un lector de placas para medir la absorbancia a 540 nm (Matuszewska et al. 2019). Para determinar el porcentaje de proliferación celular, se utilizó la ecuación 6.2

$$\text{Proliferación (\%)} = \frac{[\text{Células}_{\text{extracto}} \text{OD}_{570} - \text{Blanco}]}{[\text{Media de Células}_{\text{control}} \text{OD}_{570} - \text{Blanco}]} \times 100 \quad (6.2)$$

Ecuación 6.2. Porcentaje de proliferación celular. Obtenido de :(van Meerloo, Kaspers y Cloos 2011)

6.7.3. Expresión génica de genes proapoptóticos

Figura 22: Extracción de ARN, retrotranscripción y qPCR



Elaborado en: BioRender

6.7.3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando TRIzol™ Reagent (Ambion ®, USA), como se muestra en la figura 22. Se transfirieron las células a un tubo de 1.5 mL y se añadieron 500µL de Trizol, se dejó incubando 5 min. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo. Se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos. Se centrifugó a 12000rpm durante 15 minutos a 4°C, y se recolectó la fase acuosa. Se añadieron 500 µL de isopropanol, se mezcló en vortex y se dejó reposar entre 5-10 minutos. Se centrifugó a 12000rpm durante 8 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó sobre el pellet 500µL de etanol al 75 %, mezclándose suavemente por inversión. Por último, se centrifugó a 7500rpm durante 5 minutos a 4°C, se extrajo el etanol, se dejó secar al aire durante 2 horas, y se resuspendió el pellet en 30 µL de agua libre de ARNasa. Se cuantificó la concentración de ARN utilizando el espectrofotómetro NanoDROD UV-VIS 2000C Thermo Fisher Scientific.

6.7.3.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa (qPCR)

La síntesis de ADNc se realizó mediante el uso del kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System realizando reacción de 20µL. La reacción se preparó en tubos de 0.2mL y se agregaron los reactivos como se muestra en la tabla 4.

Cuadro 4: Preparación de la reacción de retrotranscripción

Reactivo	Volumen (µL)
GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP	10
GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR	0.4
Agua libre de ADNAsas	8.6
ARN	1

Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus y se siguió el siguiente programa: 70°C durante 5 min, anillamiento 25°C por 5 min, extensión 42°C por 1:30h e inactivación 70°C por 15 min. Se cuantificó la concentración de ADNc utilizando el espectrofotómetro NanoDROD UV-VIS 2000C Thermo Fisher Scientific, como se muestra en 12- 14, el ADN obtenido fue diluido a una concentración de 250ng.

Para determinar los niveles de expresión génica se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el kit LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ como se muestra en la figura 22 .Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus en tiempo real y las condiciones del programa fueron: activación a 50°C por 2 minutos, desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos y alineamiento a 61°C durante 60 segundos. Por último, se llevó a cabo la extensión final a 72°C por 7 minutos (Sadia et al. 2020). Para la preparación de la mezcla de reacción siguió la tabla 5.

Cuadro 5: Volúmenes de reactivos para la reacción de qPCR con SYBR® Green.

Reactivo	Volumen (µL)
LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™	5
Agua libre de ADNAsas	3
Cebador F	0.5
Cebadores R	0.5
ADNc	1

Para la cuantificación de la expresión génica de los genes seleccionados se utilizaron los cebadores diseñados por OriGene Technologies, Inc., correspondientes al gen de interés: *Puma*, *Bax* y *GAPDH* (gen control); que se muestran en la tabla 15. La expresión se obtuvo a través de la normalización de los valores Ct de cada muestra con el valor Ct del gen control GAPDH (Sadia et al. 2020). El cálculo de la expresión génica de cada gen de interés se basó en el método de Livak utilizando la ecuación 6.3. Se obtuvieron las curvas de amplificación para cada gen evaluado y un control negativo, estas se muestran en 47-50.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (6.3)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}} \quad (6.4)$$

Ecuación 6.3 y 6.4. Cuantificación relativa de la expresión génica del gen objetivo en una muestra

6.8. Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism 10 para la creación de las gráficas y análisis de datos y el programa Excel para el cálculo de estadísticas descriptivas (media y desviación estándar) y se realizó una prueba t, que determina diferencia entre medias.

7.1. Preparación del extracto, rendimiento e identificación de grupos funcionales

Con el fin de determinar la composición bioquímica de carbohidratos, proteínas y fenoles de los extractos derivados de las especies de hongos *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune* y *Trametes menziensii*, se utilizó muestras de micelio seco y se prepararon extractos etanólicos. Con el fin de determinar los grupos funcionales presentes en los extractos se llevó a cabo un análisis de espectroscopía infrarroja como se muestra en los anexos 51-54.

7.1.1. Rendimiento de etanólica

Para iniciar con la extracción etanólica se pesaron los micelios secos de 4 especies diferentes (Tabla 6) los pesos iniciales fueron de: 2.92g (*P. sanguineus*), 14.88g (*T. versicolor*), 10.14g (*T. menziensii*) y 3.29g (*S. commune*). Luego se procedió con la liofilización para eliminar el etanol.

Cuadro 6: Rendimiento de la preparación del extracto a partir de hongos secos.

Especie	Masa micelio seco (g) $\pm 0.0001g$	Masa extracto obtenido (g) $\pm 0.0001g$	Rendimiento (%)
<i>P. sanguineus</i>	2.9200	0.0134	0.459
<i>T. versicolor</i>	14.8800	0.1296	4.438
<i>T. menziensii</i>	10.1368	0.1165	3.990
<i>S. commune</i>	3.2903	0.0125	0.428

Se logró obtener cada extracto a partir del uso de un rotavapor y liofilizador; estos equipos permitieron eliminar el etanol absoluto empleado para la extracción. Los pesos para cada especie variaron desde 2.92 -14.88 gramos (Tabla 6). Los rendimientos para cada especie de hongo variaron desde 0.459 % a 4.438 %. Los mayores rendimientos fueron para los extractos de *T. menziensii* y *T.*

versicolor siendo de 3.990 % y 4.438 % respectivamente.

7.1.2. Identificación de grupos funcionales presentes en extractos

Para determinar los grupos funcionales presentes se analizaron los espectros de IR obtenidos en el espectrómetro FTIR (Tabla 7) marca PerkinElmer modelo Frontier y se identificaron con los apéndices 2A y 2B de Wade y Simek 2017.

Cuadro 7: Análisis de espectro IR del extracto del hongo *Pycnoporus sanguineus*

Número de onda de pico de absorción (cm ⁻¹) ($\pm 0.01\text{cm}^{-1}$)	Región del espectro infrarrojo (cm ⁻¹)	Intensidad	Grupo
2920.12	2962-2853	Media	Tensión C-H, Alcano
1969.16	~ 1960	Media	Aleno (C ₃ H ₄)
1753.37	1750-1740	Media	Cetonas, 5 miembros
1575.96	~ 1580	Media	Aromático
1050	1070-1030	Suave	Sulfóxido R-S=O

El análisis del espectro infrarrojo (IR) del extracto del hongo *Pycnoporus sanguineus* muestra la presencia de varios grupos funcionales (Ver Anexo 51), estos fueron identificados a partir de bandas de absorción detectadas en diferentes regiones del espectro (Tabla 7). Se muestra una combinación de grupos funcionales que incluyen alcanos, estructuras insaturadas (alenos), cetonas cíclicas, compuestos aromáticos y sulfóxidos. La diversidad química sugiere que el extracto de *P. sanguineus* contiene una mezcla de compuestos orgánicos como ácidos grasos, glicerol y terpenos lo que podría estar relacionado a sus propiedades y potencial antitumoral.

Cuadro 8: Análisis de espectro IR del extracto del hongo *Trametes versicolor*

Número de onda de pico de absorción (cm ⁻¹) ($\pm 0.01\text{cm}^{-1}$)	Región del espectro infrarrojo (cm ⁻¹)	Intensidad	Grupo
2924.43	2962-2853	Suave	Tensión C-H, Alcano
1414.91	1420-1410	Suave	Alqueno monosustituido
1045.57	~1050	Suave	Alcohol primario
994.03	995-985	Suave	Alqueno monosustituido

El análisis del espectro infrarrojo (IR) del extracto del hongo *Trametes versicolor* muestra la presencia de varios grupos funcionales (Ver Anexo 52), estos fueron identificados a partir de bandas de absorción detectadas en diferentes regiones del espectro (Tabla 8). Se muestra que contiene compuestos con estructuras alifáticas saturadas, alcoholes primarios y alquenos monosustituidos. La presencia de estos grupos sugiere que el extracto de *T. versicolor* contiene una mezcla de compuestos orgánicos como ácidos grasos y terpenos lo que podría estar relacionado a sus propiedades y potencial antitumoral.

Cuadro 9: Análisis de espectro IR del extracto del hongo *Trametes menziensii*

Número de onda de pico de absorción (cm^{-1}) ($\pm 0.01\text{cm}^{-1}$)	Región del espectro infrarrojo (cm^{-1})	Intensidad	Grupo
2925.23	2962-2853	Media	Tensión C-H, Alcano
2854.02	2962-2853	Suave	Tensión C-H, Alcano
1740.90	1750-1740	Suave	Cetona, anillo de 5 miembros
1530.88	1550-1510	Suave	Amida secundaria
1050.3	~ 1050	Suave	Alcohol primario
994.24	995-985	Suave	Alqueno monosustituido

El análisis del espectro infrarrojo (IR) del extracto del hongo *Trametes menziensii* muestra la presencia de varios grupos funcionales (Ver Anexo 53), estos fueron identificados a partir de bandas de absorción detectadas en diferentes regiones del espectro (Tabla 9). Se identificaron compuestos alifáticos, cetonas, amidas, alcoholes y alquenos monosustituidos. La presencia de estos grupos sugiere que el extracto de *T. menziensii* contiene una mezcla de compuestos orgánicos como lípidos, proteínas, compuestos fenólicos y terpenoides, lo que podría estar relacionado a sus propiedades y potencial antitumoral.

Cuadro 10: Análisis de espectro IR del extracto del hongo *Schizophyllum commune*

Número de onda de pico de absorción (cm^{-1}) ($\pm 0.01\text{cm}^{-1}$)	Región del espectro infrarrojo (cm^{-1})	Intensidad	Grupo
2918.43	2962-2853	Suave	Tensión C-H, Alcano
1748.81	1760-1730	Suave	Amida cíclica
1412.24	1420-1410	Suave	Alqueno monosustituido
1051.32	~ 1050	Suave	Alcohol primario

El análisis del espectro infrarrojo (IR) del extracto del hongo *Schizophyllum commune* muestra la presencia de varios grupos funcionales (Ver Anexo 54), estos fueron identificados a partir de bandas de absorción detectadas en diferentes regiones del espectro (Tabla 10). Se identificaron compuestos alifáticos, cetonas, amidas, alcoholes y alquenos monosustituidos. La presencia de estos grupos sugiere que el extracto de *S. commune* contiene una mezcla de compuestos orgánicos como proteínas, lípidos y alcoholes primarios, lo que podría estar relacionado a sus propiedades y potencial antitumoral.

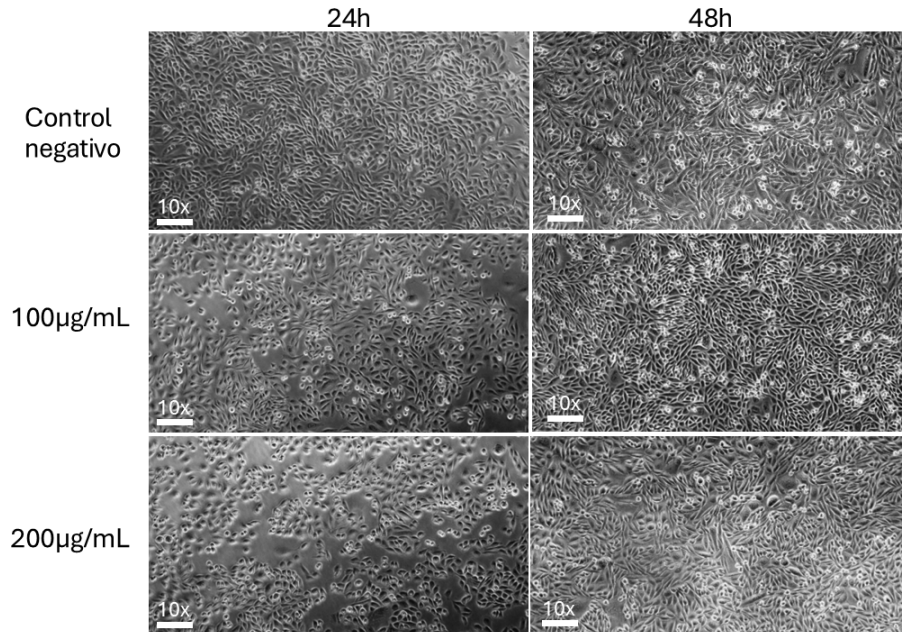
7.2. Evaluación de la morfología y viabilidad celular mediante el uso de azul de tripano

7.2.1. Evaluación de morfología celular en las líneas celulares CHO, LAN-1, UFH-001

Con el fin de evaluar cambios en la morfología de las líneas celulares CHO (adherente, de forma ovalada), LAN-1 (neuroblástica, forma redondeada y alargada), UFH-001 (células fibroblástica, morfología fusiforme) después de la exposición de diferentes concentraciones de extractos de hongos *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes menziensis* se utilizó un microscopio de contraste y aumento 10X. Estos resultados se muestran en las figuras 23-34.

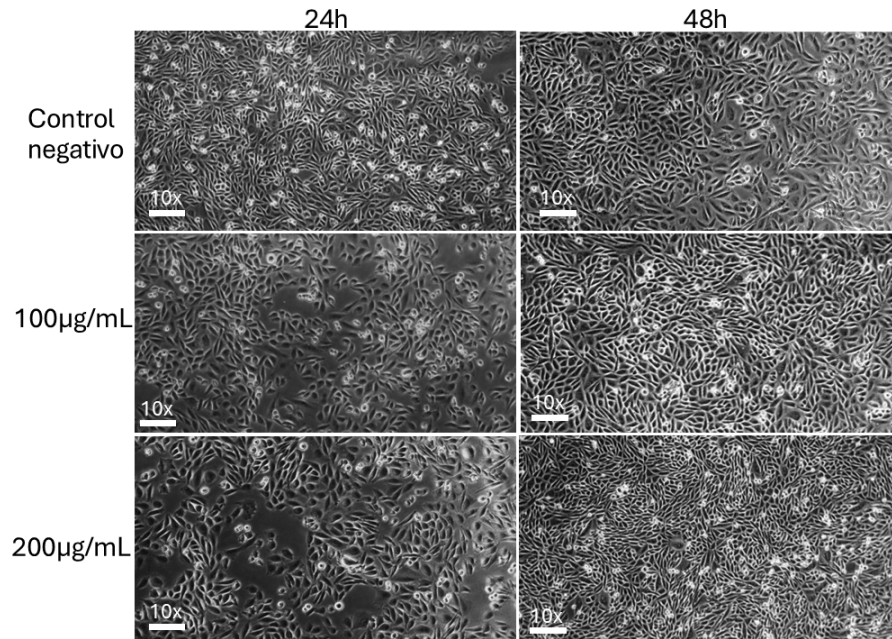
7.2.1.1. Evaluación de la morfología de la línea celular CHO

Figura 23: Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo *P. sanguineus*



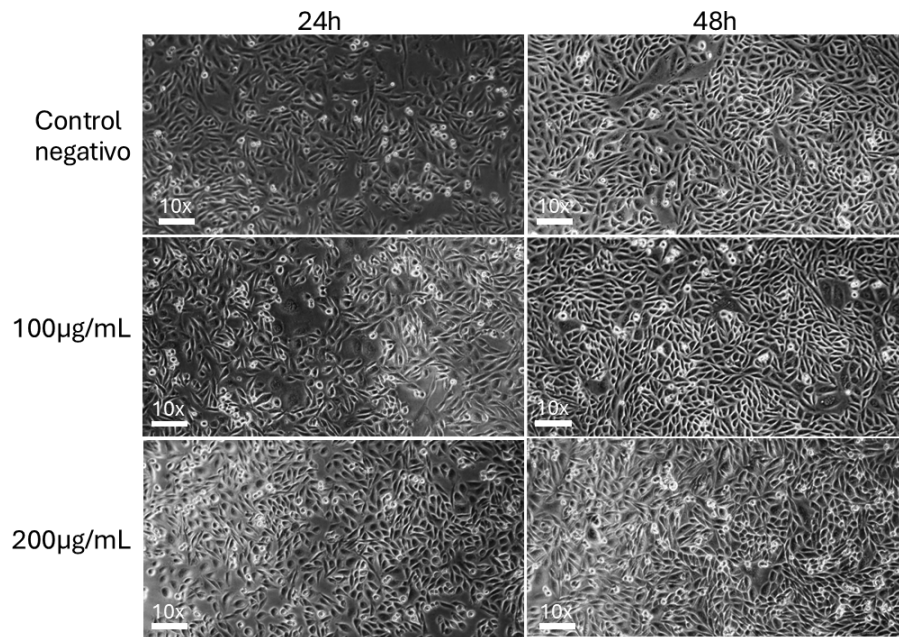
La exposición al extracto de *P. sanguineus* no generó cambios en la morfología celular, manteniendo su forma aplanada ovalada, contorno definido y adherente como el control sin exposición, manteniendo el 80% de confluencia para la concentración de 100 µg/mL a las 24h. Por otro lado, para la concentración de 200µg/mL se observó un 77% de confluencia y células no adheridas, indicando un posible estrés celular. Para ambas concentraciones después de 48h de exposición, la confluencia se mantuvo entre un 90-100%, igual que el control y no se observaron cambios en la morfología.

Figura 24: Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo *T. versicolor*



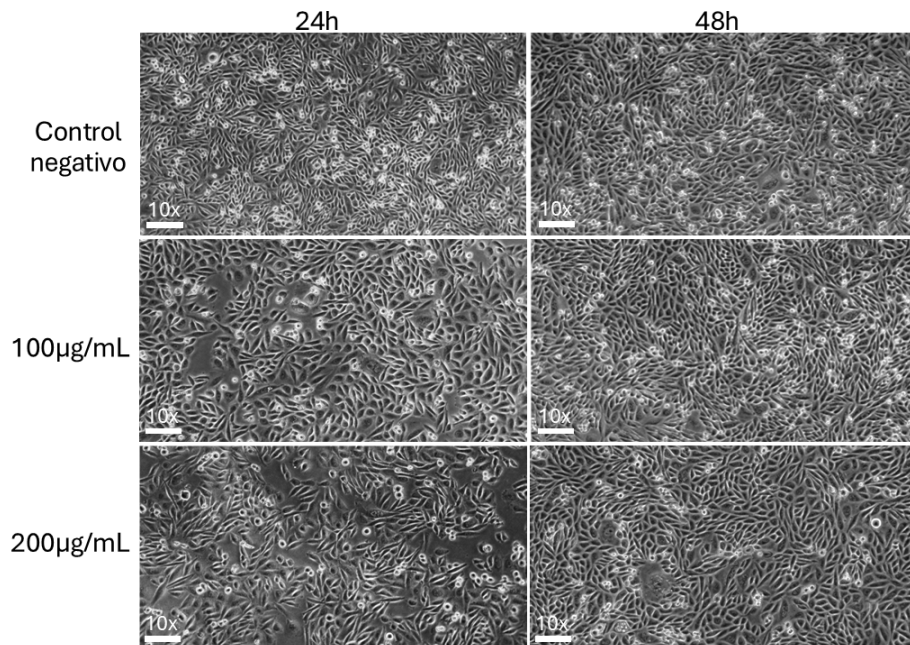
La exposición al extracto de *T. versicolor* no generó cambios en la morfología celular, manteniendo su forma aplanada ovalada, contorno definido y adherente como el control sin exposición. Sin embargo, la confluencia se redujo a 80% para ambas concentraciones de exposición 100µg/mL y 200µg/mL a las 24h. Por otro lado, a las 48h la confluencia se mantuvo entre 90% y 100% al igual que en el control sin exposición. Estas observaciones sugieren que el tratamiento con *T. versicolor* no afecta la viabilidad celular y no inhibe el crecimiento óptimo.

Figura 25: Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo *T. menziensii*



La exposición al extracto de *T. menziensii* no generó cambios en la morfología celular, manteniendo su forma aplanada ovalada, contorno definido y adherente como el control sin exposición. A las 24h de exposición en ambas concentraciones 100 µg/mL y 200 µg/mL, se mantuvo la confluencia entre 80%-90%. Además, a las 48h de exposición al igual que el control la confluencia se mantuvo entre el 90%-100% en ambas concentraciones. Estas observaciones sugieren que el tratamiento con *T. menziensii* no afecta la viabilidad celular y no inhibe el crecimiento óptimo.

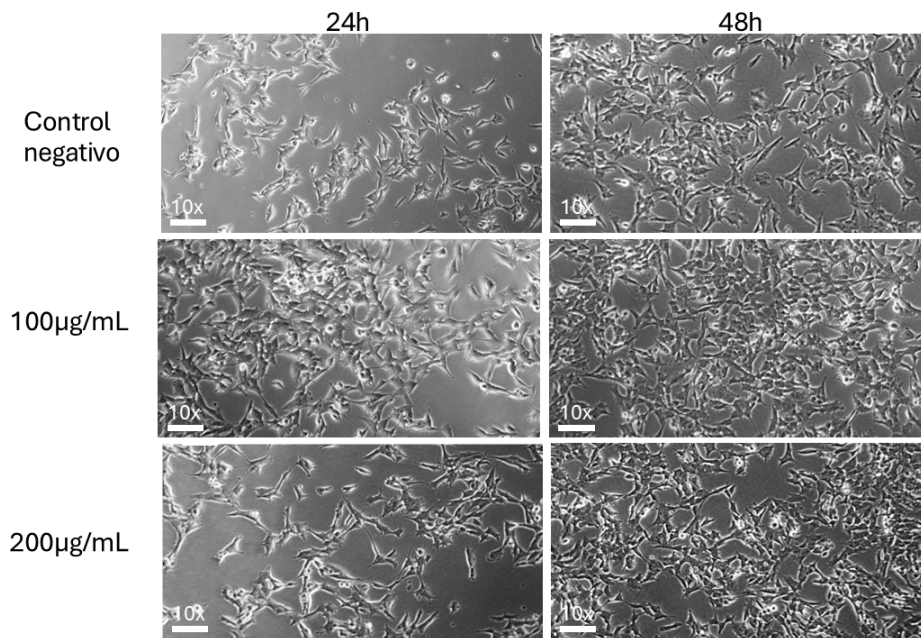
Figura 26: Evaluación morfológica de la línea celular CHO después de la estimulación con el extracto del hongo *S. commune*



La exposición al extracto de *S. commune* no generó cambios en la morfología celular, manteniendo su forma aplanada ovalada, contorno definido y adherente como el control sin exposición. Después de 24h de exposición la confluencia se mantuvo entre 80%-90% en ambas concentraciones. A las 48h de exposición, no se observó ningún cambio en la confluencia celular entre el control y ambas concentraciones evaluadas. Estas observaciones sugieren que el tratamiento con *S. commune* no afecta la viabilidad celular y no inhibe el crecimiento óptimo.

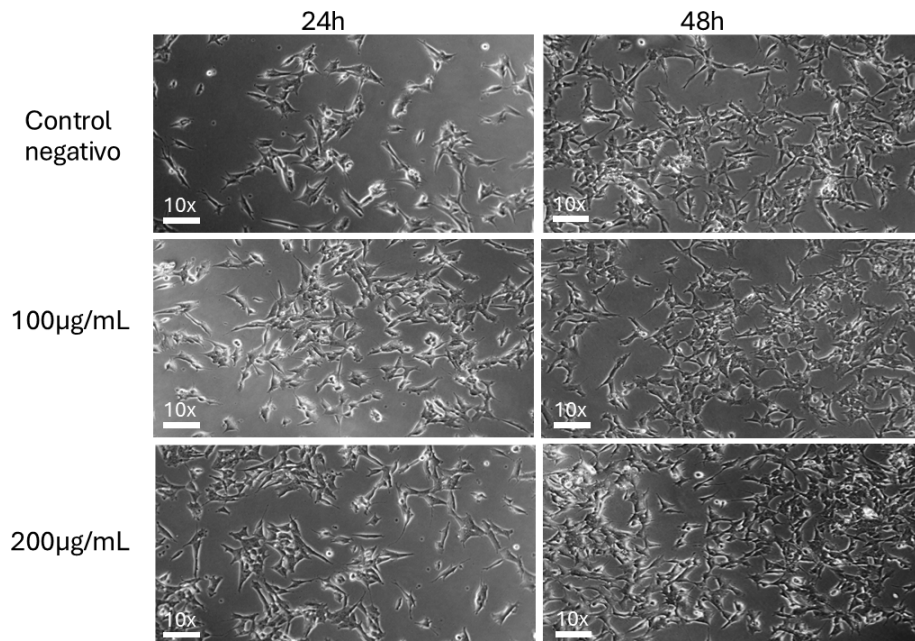
7.2.1.2. Evaluación de la morfología de la línea celular LAN-1

Figura 27: Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo *P. sanguineus*



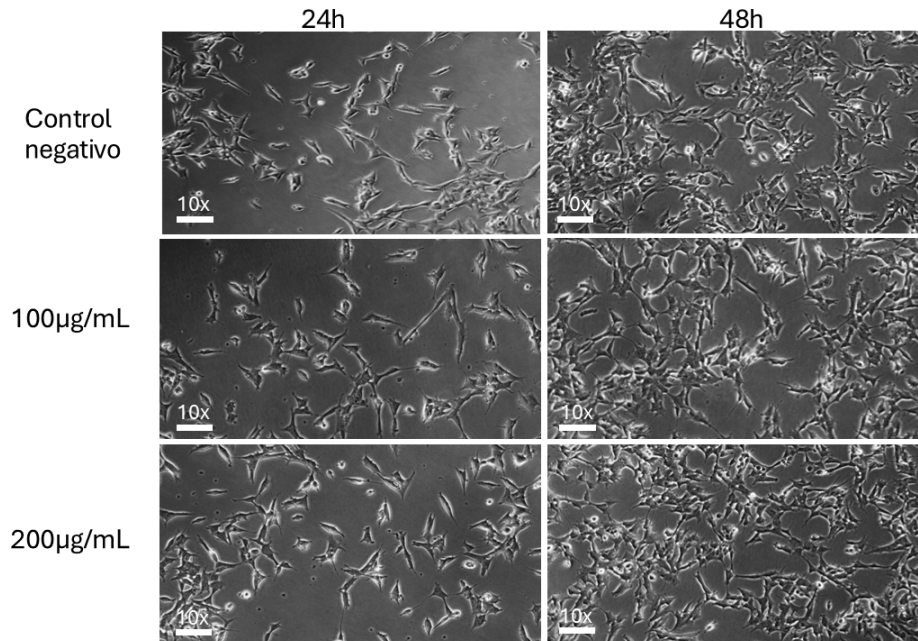
La exposición al extracto de *P. sanguineus* a las 24h se observó para la concentración de 100 µg/mL una aglomeración de células y células no adheridas, se observó una mayor confluencia (80%) que el control sin exposición (62%). En la concentración de 200 µg/mL no se observaron cambios en la morfología y confluencia. Después de 48h de exposición la confluencia observada se mantuvo en 80% en comparación con el control sin exposición. Estas observaciones sugieren en la exposición de *P. sanguineus* a una concentración de 100 µg/mL a las 24h provocó un estrés celular y podría tener un efecto citotóxico.

Figura 28: Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo *T. versicolor*



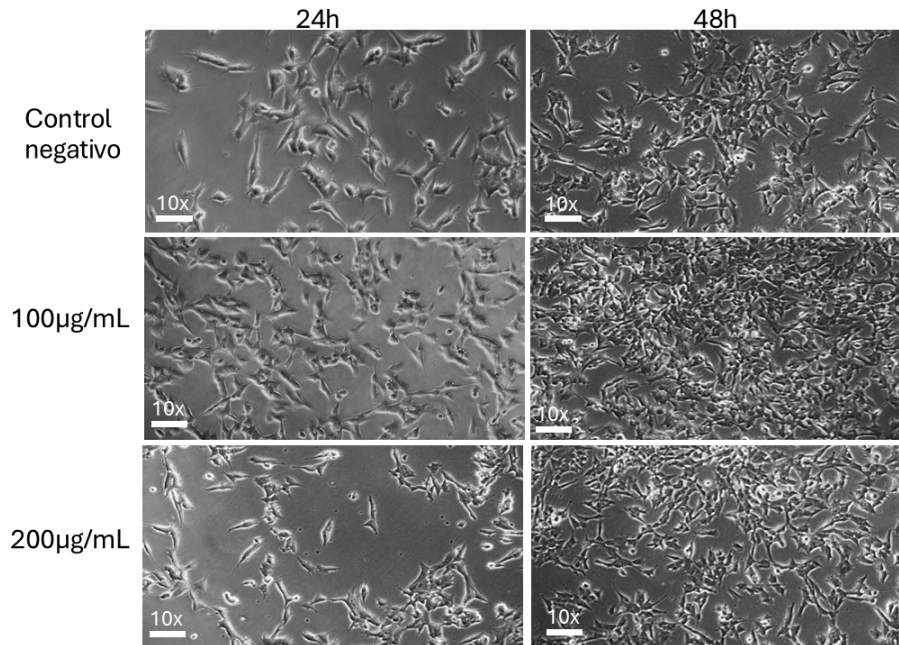
La exposición al extracto de *T. versicolor* a las 24h no se observó un cambio en la morfología y la confluencia celular se mantuvo similar al control, estando entre 60-65%. Después de 48h de exposición la confluencia observada se mantuvo en 80% en comparación con el control sin exposición. Sin embargo, a una concentración de 200 µg/mL se observó una aglomeración distintas de células y células no adheridas. Estas observaciones sugieren en la exposición de *T. versicolor* después de 48h a una concentración de 200 µg/mL parece provocar estrés celular.

Figura 29: Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo *T. menziensii*



La exposición al extracto de *T. menziensii* no provocó un cambio en la morfología y en la confluencia celular manteniéndose entre 80%-90% en comparación al control sin exposición en ambas concentraciones después de 24h de exposición. Después de 48h se observó el mismo efecto, manteniendo la confluencia al 80% en comparación al control sin exposición.

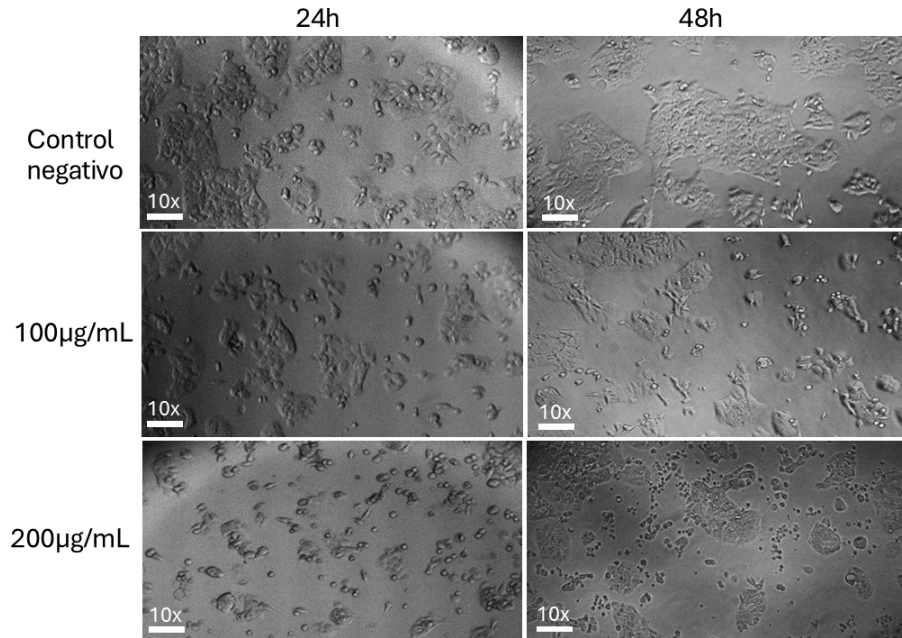
Figura 30: Evaluación morfológica de la línea celular LAN-1 después de la estimulación con el extracto del hongo *S. commune*



La exposición a *S. commune* no provocó un cambio en la confluencia celular observada debido a que se mantuvo entre 50-60 % a las 24h y 75%-90 % a las 48h. Sin embargo a las 48h con la exposición de 100µg/mL se observó una aglomeración celular con una morfología alargada y células no adheridas. Esto sugiere que la exposición de *S. commune* provoca estrés celular después de 48h a una concentración de 100 µg/mL.

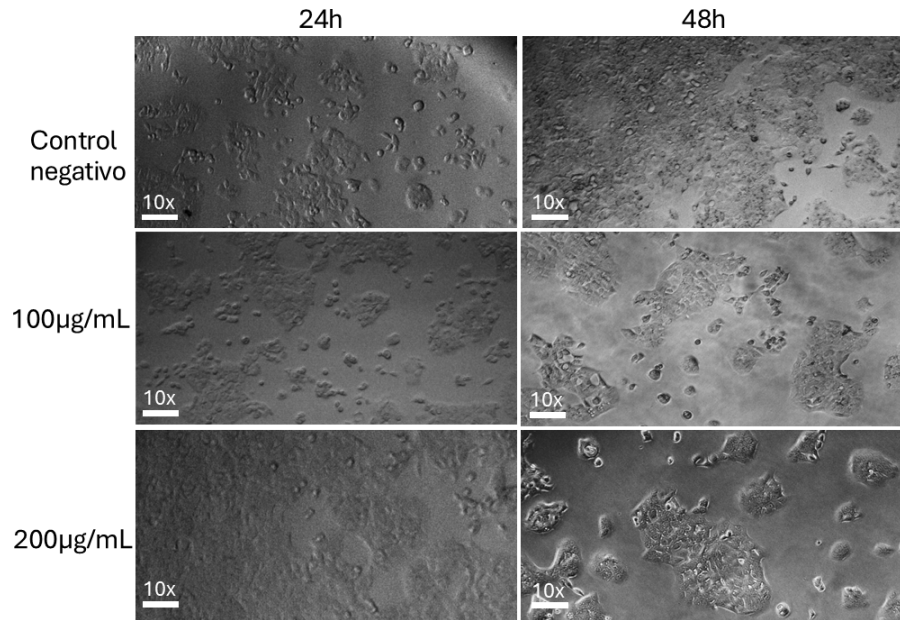
7.2.1.3. Evaluación de la morfología de la línea celular UFH-001

Figura 31: Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo *P. sanguineus*



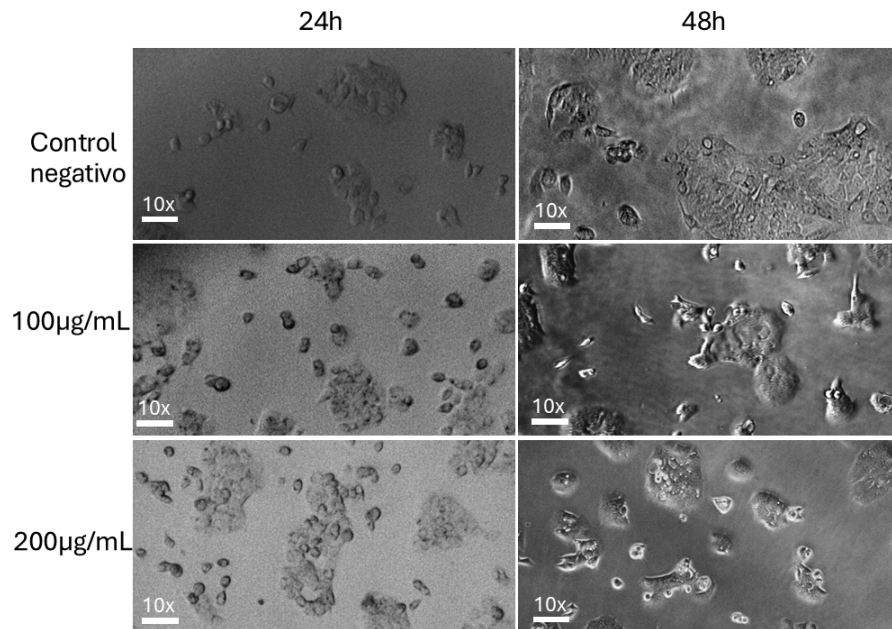
La exposición a *P. sanguineus* no provocó un cambio en la confluencia celular a las 24h de horas de exposición se mantuvo en aproximadamente 50 %, sin embargo, sí un cambio de morfología debido a que se observaron células no adheridas en ambas concentraciones de exposición. A las 48h de exposición se observó el mismo efecto, la confluencia se mantuvo en 45 %-57 % y se observó un mayor número de células no adheridas. Estas observaciones indican que la exposición de a *P. sanguineus* afecta la morfología celular debido a provoca estrés celular.

Figura 32: : Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo *T. versicolor*



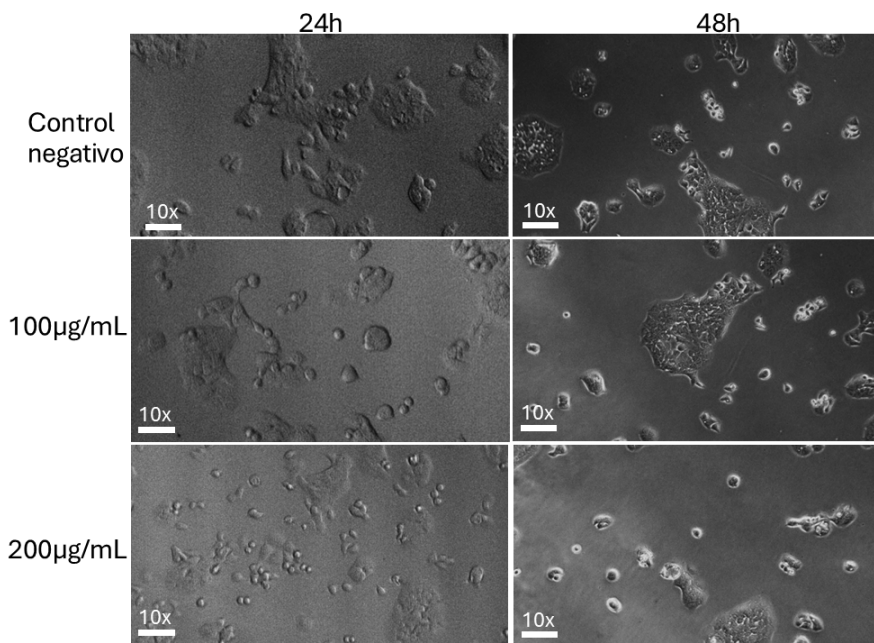
La exposición a *T. versicolor* no provocó un cambio en la confluencia celular debido a que se mantuvo a 45 % en comparación con el control a las 24h horas, sin embargo, se observó un aumento de células no adheridas a una concentración de 100µg/mL. Después 48h de exposición se observó una disminución en la confluencia celular siendo del 40 % en comparación con el control (60 %) en ambos tratamientos, se observó una cantidad mayor de células no adheridas a una concentración de 100µg/mL. Estas observaciones indican que la exposición de *T. versicolor* provoca un estrés celular en ambos puntos de tiempo y reduce la confluencia solo después de 48h.

Figura 33: Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo *T. mensienzii*



La exposición a *T. mensienzii* no provocó un cambio en la confluencia celular en comparación al control (45%), sin embargo para ambas concentraciones se observó un mayor número de células no adheridas a las 24h. Después de la exposición a 48h, se observó una disminución de la confluencia celular en ambas concentraciones siendo de 50% en comparación al control (60%) y se observó un mayor número de células no adheridas. Estas observaciones sugieren que la exposición a *T. mensienzii* provoca un estrés celular y podría tener un potencial citotóxico.

Figura 34: Evaluación morfológica de la línea celular UFH-001 después de la estimulación con el extracto del hongo *S. commune*



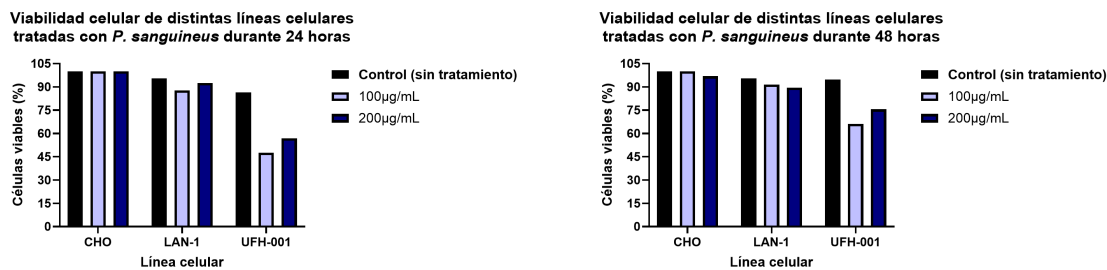
La exposición a *S. commune* presentó un potencial citotóxico y aumento en el estrés celular. Después de 24h, se observó una disminución en la confluencia celular en comparación al control (50 %) siendo de 36 % y 40 % para ambas concentraciones, respectivamente. Además, se observó un aumento en la cantidad de células no adheridas. Por otro lado, a las 48h de exposición se observó una disminución en la confluencia celular en comparación al control (50 %) siendo de 40 % y 30 % para ambas concentraciones, respectivamente.

7.2.2. Evaluación de viabilidad celular utilizando azul de tripano

Con el fin de evaluar el efecto anti-tumorigenico de diferentes extractos de hongos endémicos de Guatemala (*Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes menziensisii*) se utilizaron 3 líneas celulares diferentes: CHO, UFH-001 y LAN-1. Estas líneas celulares se expusieron a las concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL durante tiempo 24 horas y 48 horas, con el fin de cuantificar la viabilidad celular mediante a un microscopio invertido. Se realizó un conteo de células vivas y muertas utilizando azul de tripano para obtener el porcentaje de células vivas.

Después de la exposición con extractos de hongos durante 24 horas y 48 horas, se realizó un conteo utilizando azul de tripano como colorante de contraste para distinguir células vivas y muertas. El porcentaje de viabilidad presentado en las figuras de las sección 7.2.2 resultan de comparar el número de células viables y células muertas, como se observa en las figuras 35-38. En el Anexo 11 se muestra un cuadro resumen con la viabilidad de cada tratamiento y línea celular.

Figura 35: Efecto del extracto del hongo *P. sanguineus* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas



La viabilidad de la línea celular CHO y LAN-1 no se vio afectada luego de la exposición con el extracto del hongo *P. sanguineus*. En donde, se observó un porcentaje de células vivas entre 90-100 % para las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Sin embargo, para UFH-001 se observa un porcentaje de células vivas entre 47.6 % y 56.8 % para 100 y 200 µg/mL respectivamente a las 24 horas. Para las 48 horas se observa un porcentaje de células vivas entre 66.2 % y 75.5 % para 100 y 200 µg/mL, respectivamente. A partir de estas observaciones se puede inferir que *P. sanguineus* mostró un potencial para reducir la viabilidad celular en la línea UFH-001 en ambas concentraciones y concentraciones.

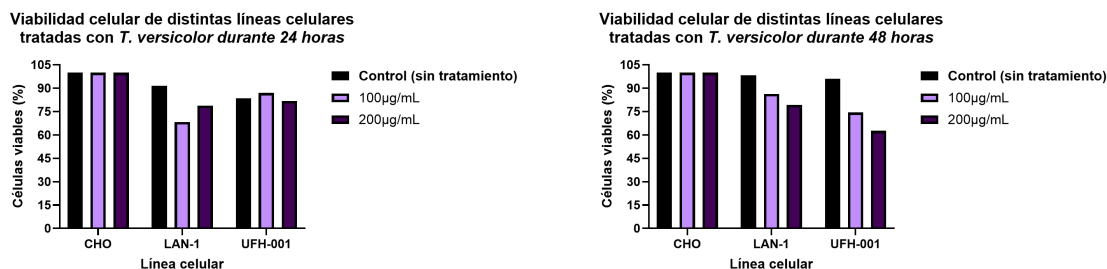
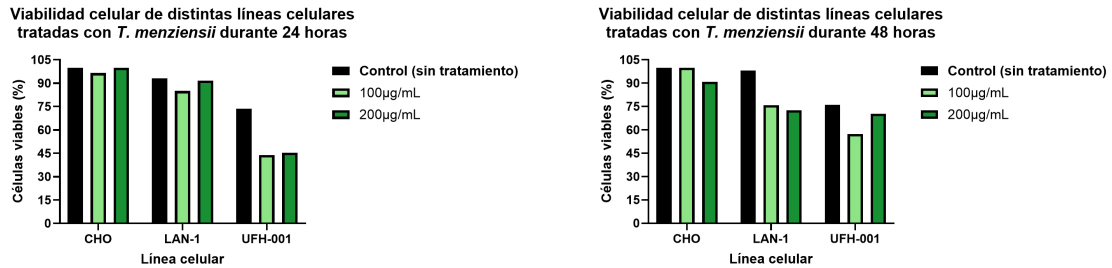


Figura 36: Efecto del extracto del hongo *T. versicolor* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas

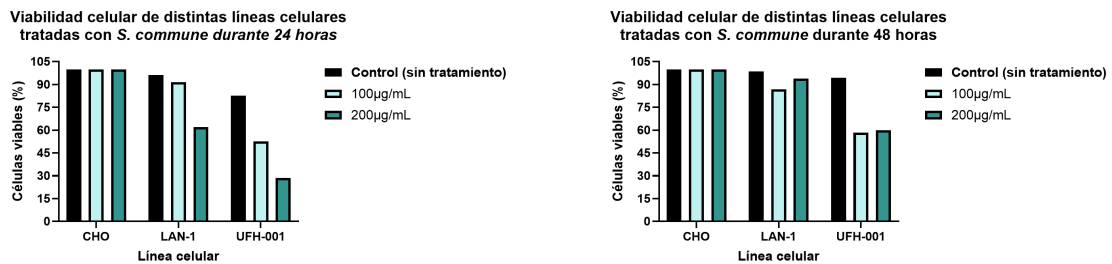
En donde, se observó un porcentaje de células vivas del 100 % para las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Por otro lado, para LAN-1 se observó un porcentaje de células vivas entre 68.3 % 78.8 % para 100 y 200 µg/mL respectivamente, esto indica que la exposición afectó la viabilidad celular en ambas dosis a las 24 horas . Sin embargo, a las 48 horas se observó un porcentaje de células vivas entre 86.3 % y 79.4 % para 100 y 200 µg/mL respectivamente. Se observó para UFH-001 un porcentaje de células vivas entre 86.9 % y 81.8 % para 100 y 200 µg/mL respectivamente a las 24 horas. Para las 48 horas se observa un porcentaje de células vivas entre 74.4 % y 62.7 % para 100 y 200 µg/mL, respectivamente, esto indica que la exposición afectó la viabilidad celular en ambas concentraciones

Figura 37: Efecto del extracto del hongo *T. menziensii* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas



La viabilidad de la línea celular CHO no se vio afectada luego de la exposición con el extracto del hongo *T. menziensii*. En donde, se observó un porcentaje de células vivas entre el 95%-100% para las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Por otro lado, para LAN-1 se observó un porcentaje de células vivas entre 85% y 91.7% para 100 y 200 µg/mL respectivamente a las 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas se observó un porcentaje de células vivas entre 75.9% y 72.6% para 100 y 200 µg/mL respectivamente, la exposición afectó la viabilidad celular. Se observó para UFH-001 un porcentaje de células vivas entre 44.0% y 45.45% para 100 y 200 µg/mL respectivamente a las 24 horas. Para las 48 horas se observa un porcentaje de células vivas entre 57.3% y 70.2% para 100 y 200 µg/mL, respectivamente. Esto indica que la exposición afectó la viabilidad celular en ambas concentraciones y tiempos de exposición.

Figura 38: Efecto del extracto del hongo *S. commune* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas

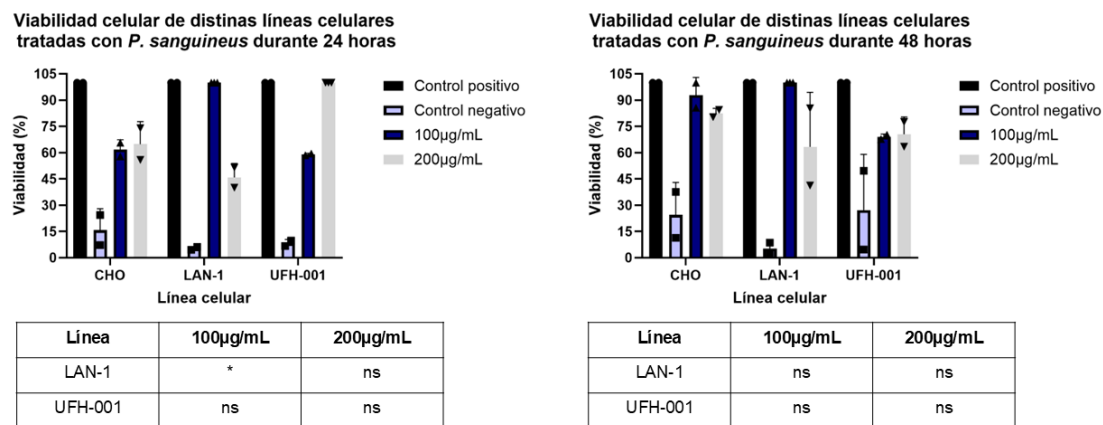


La viabilidad de la línea celular CHO no se vio afectada luego de la exposición con el extracto del hongo *S. commune*. En donde, se observó un porcentaje de células vivas del 100% para las diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Por otro lado, para LAN-1 se observó un porcentaje de células vivas entre 91.4% y 61.9% para 100 y 200 µg/mL respectivamente a las 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas se observó un porcentaje de células vivas entre 86.7% y 93.75% para 100 y 200 µg/mL respectivamente, la exposición afectó la viabilidad celular únicamente a una concentración de 200 µg/mL a las 24 horas. Se observó para UFH-001 un porcentaje de células vivas entre 52.5% y 28.5% para 100 y 200 µg/mL respectivamente a las 24 horas. Para las 48 horas se observa un porcentaje de células vivas entre 58.3% y 60% para 100 y 200 µg/mL, respectivamente. Esto indica que la exposición afectó la viabilidad celular de UFH-001 en ambas concentraciones y tiempos de exposición.

7.2.3. Determinación de viabilidad celular a través del ensayo MTT

Con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico de los extractos de hongo se utilizó una prueba funcional MTT. Con fines de describir los resultados de la MTT, Se dividió en tres grupos según la viabilidad observada : óptima ($\geq 80\%$), media (50-79 %) y baja (49 %). Como se observa en las figuras 39-42. En el Anexo 11 se muestra un cuadro resumen con la viabilidad de cada tratamiento y línea celular. Además, se evaluó la significancia en comparación a línea no tumoral utilizada, la línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

Figura 39: Efecto del extracto del hongo *P. sanguineus* a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas

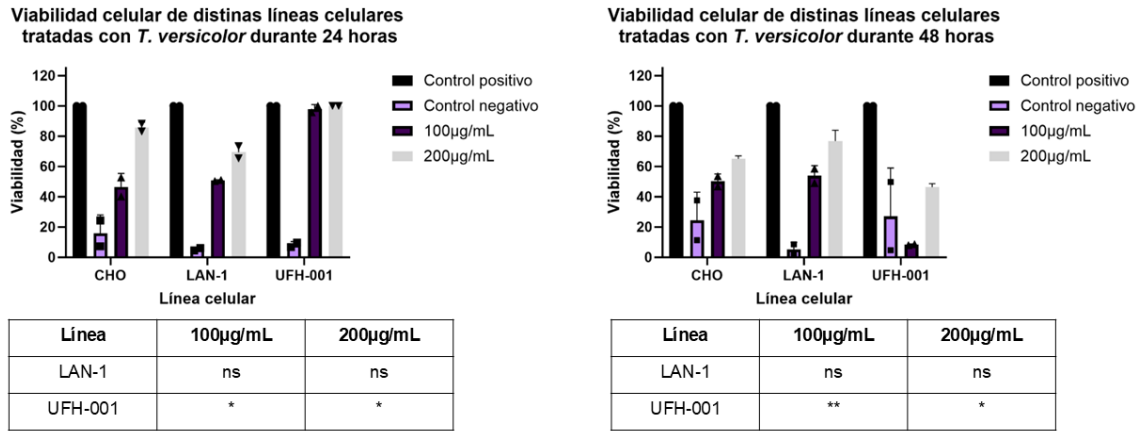


No significativo (ns), Significativo (*, $p < 0.05$), Muy significativo (**, $p < 0.01$)

A las 24 horas de exposición (39 figura izquierda) se observó una viabilidad media para las células CHO en ambas concentraciones. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad media únicamente para la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad, sin embargo, no es significativamente diferente a lo observado para CHO. En la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad media para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto, observándose una tendencia en la reducción de la viabilidad celular con respecto a lo observado para CHO.

A las 48 horas de exposición (7.17 39) se observó una viabilidad óptima para las células CHO en ambos tratamientos. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad media para el tratamiento con la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que para la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad media para la exposición con ambas concentraciones, sin embargo, no es significativamente diferente a lo observado para CHO. De estos resultados se puede inferir que el extracto de *P. sanguineus* demostró tener un posible efecto en la viabilidad celular en LAN-1 a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las en ambos tiempos y en UFH-001 a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24h y ambas concentraciones a las 48h.

Figura 40: Efecto del extracto del hongo *T. versicolor* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas

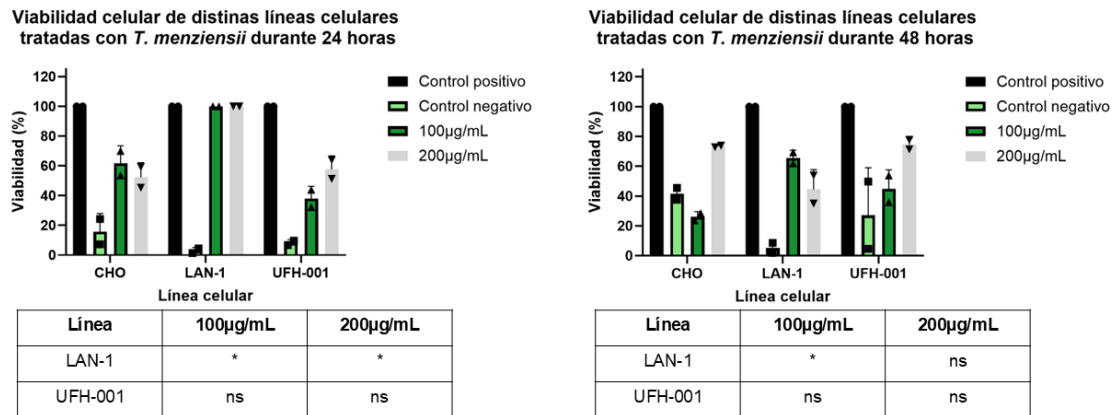


No significativo (ns), Significativo (*, $p < 0.05$), Muy significativo (**, $p < 0.01$)

A las 24 horas de exposición (40, figura izquierda) se observó una viabilidad baja en la concentración 100 µg/mL y media para el tratamiento con 200 µg/mL para las células CHO. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad baja en el tratamiento con 100 µg/mL y media con 200 µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad con respecto, sin embargo, no es significativamente diferente a lo observado para CHO. En la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad óptima para ambas concentraciones.

A las 48 horas de (40, figura derecha) se observó una viabilidad media para las células CHO en ambos concentraciones. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad media con 100 µg/mL y óptima para el tratamiento con 200 µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad, sin embargo, no es significativamente diferente a lo observado para CHO. Mientras que para la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad baja para ambas concentraciones. De estos resultados se puede inferir que el extracto de *T. versicolor* demostró tener una tendencia reducir la viabilidad celular en LAN-1 en ambas concentraciones a las 24 horas y en UFH-001 a las 48 horas en ambas concentraciones.

Figura 41: Efecto del extracto del hongo *T. menziensis* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas

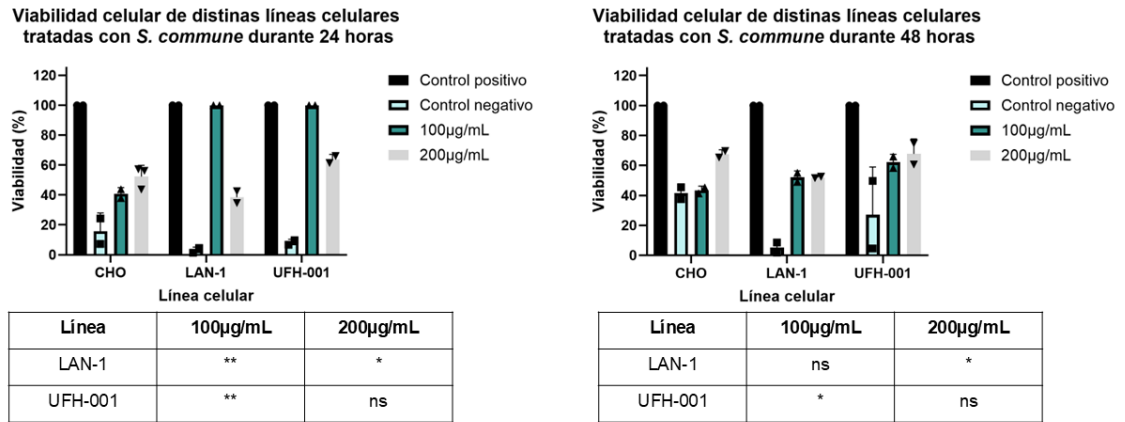


No significativo (ns), Significativo (*, $p < 0.05$), Muy significativo (**, $p < 0.01$)

A las 24 horas de exposición (41, figura izquierda) se observó una viabilidad media para las células CHO. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad óptima para ambos tratamientos. Por otro lado, en la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad baja con el tratamiento con 100 µg/mL y media con 200 µg/mL indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad con respecto, sin embargo, no es significativamente diferente a lo observado para CHO.

A las 48 horas de tratamiento (41, figura derecha) se observó una viabilidad baja con la concentración de 100 µg/mL y media para las células CHO con 200 µg/mL. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad media en el tratamiento con 100 µg/mL y baja para el tratamiento con 200 µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad, sin embargo, para la concentración 200 µg/mL el efecto observado no es significativamente diferente a lo observado para CHO. Mientras que para la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad baja con 100 µg/mL y media con 200 µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad. De estos resultados se puede inferir que el extracto de *T. menziensis* demostró tener una tendencia a reducir la viabilidad celular en LAN-1 en ambas concentraciones luego de 48 horas de exposición y en UFH-001 en ambos tiempo de exposición y concentraciones.

Figura 42: Efecto del extracto del hongo *S. commune* a 100 µg/mL y 200 µg/mL en la proliferación celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 por 24 y 48 horas



No significativo (ns), Significativo (*, $p < 0.05$), Muy significativo (**, $p < 0.01$)

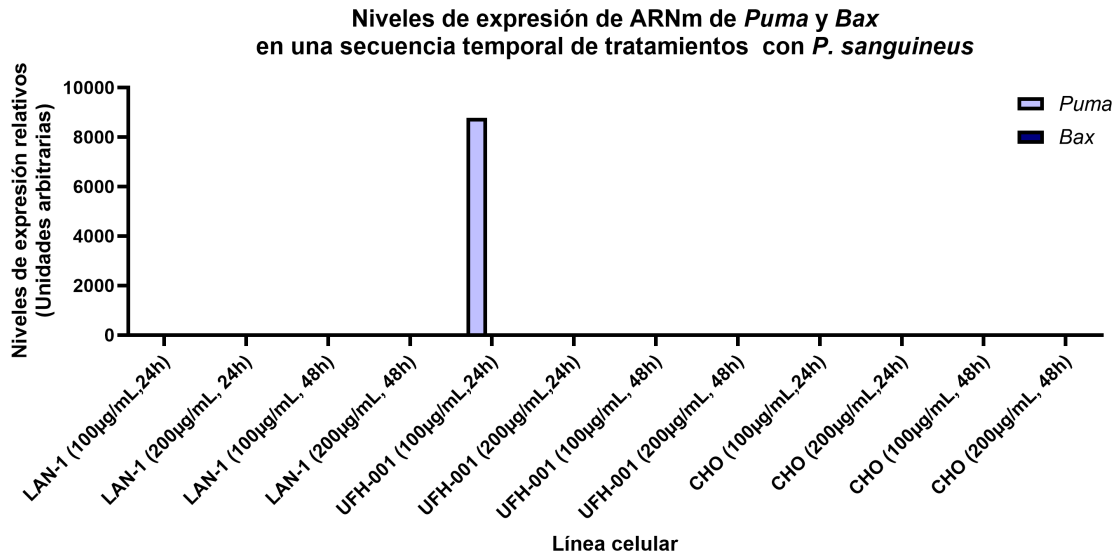
A las 24 horas de exposición (42, figura izquierda) se observó una viabilidad baja con el tratamiento de 100 µg/mL y media para en tratamiento de 200 µg/mL en las células CHO. Para la línea celular LAN-1 se observó una viabilidad óptima para 100 µg/mL y baja con 200 µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad. En la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad óptima con el tratamiento con 100 µg/mL y baja para el tratamiento con 200µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad, sin embargo, el efecto observado no es significativamente diferente a lo observado para CHO.

A las 48 horas de exposición se observó una viabilidad baja con el tratamiento de 100 µg/mL y media para en tratamiento de 200 µg/mL en las células CHO. Para la línea celular LAN-1 se observó se observó una viabilidad media en el tratamiento con 100µg/mL y baja para el tratamiento con 200µg/mL, indicando que existe una tendencia en la reducción de la viabilidad, es significativamente diferente únicamente para la segunda concentración a lo observado para CHO. Mientras que para la línea celular UFH-001 se observó una viabilidad media para ambas concentraciones, indicando una tendencia en la reducción de viabilidad, se determinó que existe una diferencia significativa entre la exposición con 100µg/mL y lo observado para CHO. De estos resultados se puede inferir que el extracto de *S. commune* demostró tener un posible efecto en la viabilidad en la línea celular LAN-1 a una concentración de 200 µg/mL a las 24 horas y para ambas concentraciones a las 48 horas. Mientras que en la línea celular UFH-001 se observó un efecto después de 24 horas de exposición con 200 µg/mL y en ambas concentraciones a las 48 horas.

7.3. Evaluación de la expresión de los genes *Puma* y *Bax*

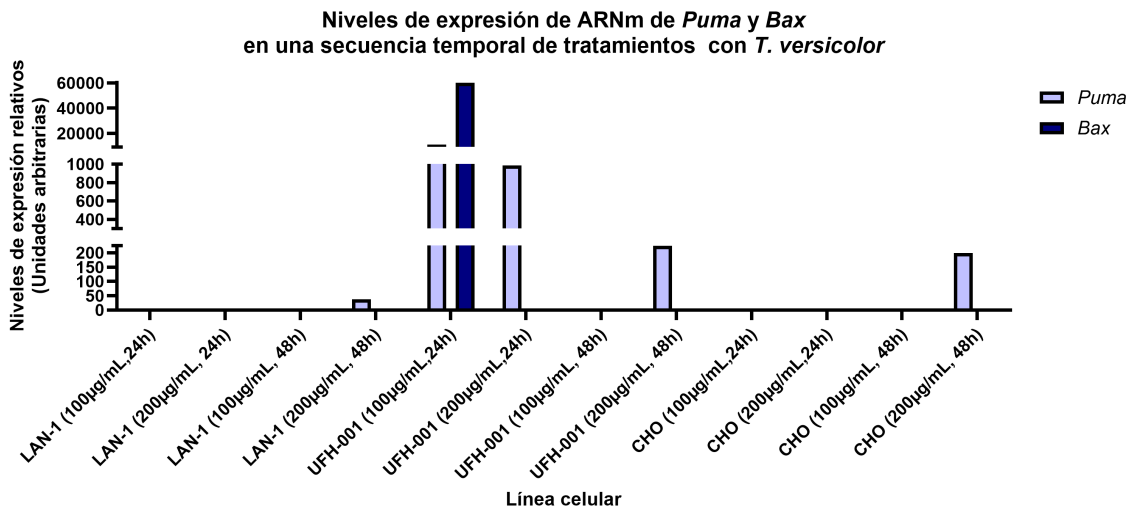
Después de 24 y 48 horas de exposición con extractos de hongos las células fueron removidas y se procedió a realizar una extracción de ARN. Se cuantificó la concentración de ADNc (Anexos 12-14) y se realizó la PCR cuantitativa (qPCR) para evaluar la expresión génica de *Puma* y *Bax*. Se compararon ambos puntos de tiempo y diferentes concentraciones (100 µg/mL y 200 µg/mL). En la sección 7.3 se muestran los niveles de expresión relativos al gen control utilizado que fue el codificante para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), como se observa en las figuras 43-46. Estos niveles se muestran en los Anexos 16 y 17.

Figura 43: Niveles de expresión génica de *Puma* y *Bax* en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de *P. sanguineus* en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)



La expresión génica de *Puma* y *Bax* se evaluó luego de las exposiciones con el hongo *P. sanguineus*. La línea celular UFH-001 expresó *Puma* en las primeras 24 horas con 100 µg/mL, se observó un aumento de 8782.7 unidades arbitrarias. En las líneas celulares LAN-1 y CHO no se observó expresión de *Puma*, además, no se observó expresión de *Bax* para ninguna línea celular evaluada.

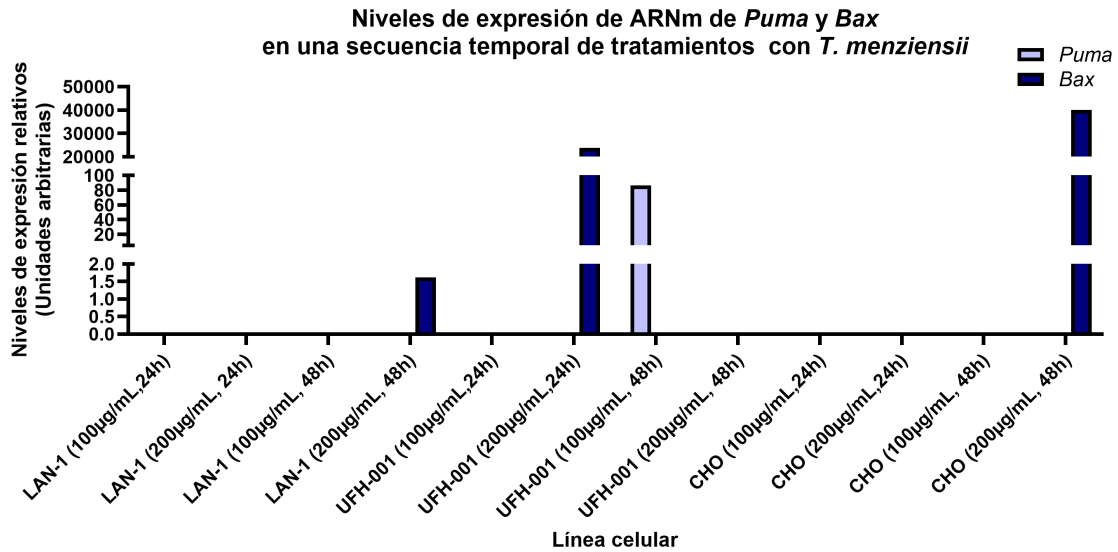
Figura 44: Niveles de expresión génica de *Puma* y *Bax* en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de *T. versicolor* en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)



La expresión génica de *Puma* y *Bax* se evaluó luego de las exposiciones con el hongo *T. versicolor*. La línea celular UFH-001 expresó *Puma* en rangos similares en las primeras 24 horas para ambas concentraciones. Se observó un aumento de 10937.8 y 986.8 unidades arbitrarias en 100 y 200 µg/mL,

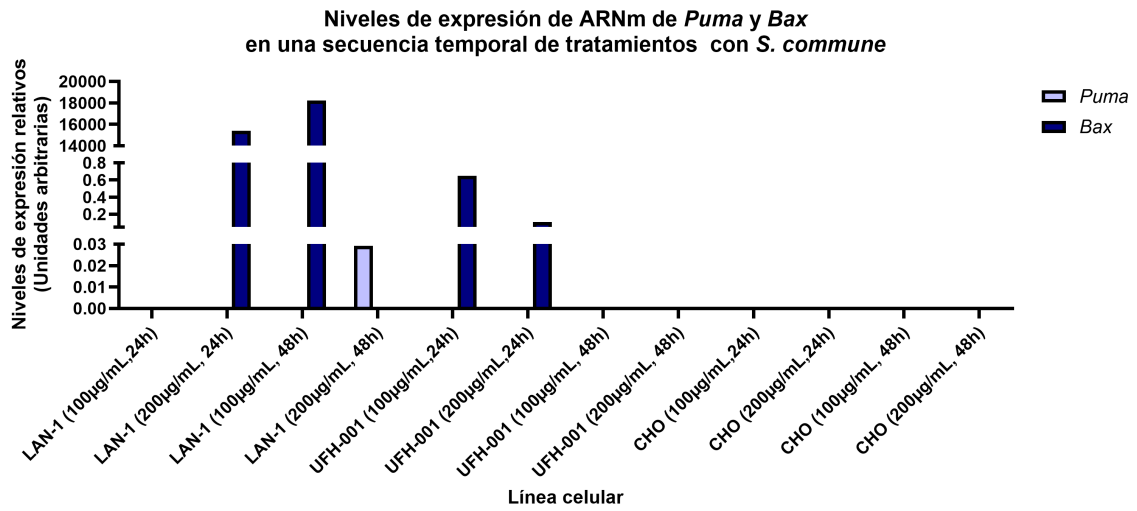
respectivamente. A las 48 horas se observó un aumento de 224.5 unidades arbitrarias para 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, se observó una expresión de 60294 unidades arbitrarias para el gen *Bax* con la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas de exposición. En las líneas celulares LAN-1 y CHO se observó expresión de bajos niveles de expresión de PUMA <200 unidades arbitrarias a las 48 horas de exposición a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 45: Niveles de expresión génica de *Puma* y *Bax* en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de *T. menziensii* en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)



La expresión génica de *Puma* y *Bax* se evaluó luego de las exposiciones con el hongo *T. menziensii*. La línea celular UFH-001 expresó *Puma* a las 48 horas, se observó un aumento de 86.2 unidades arbitrarias para 200 µg/mL. Por otro lado, se observó una expresión de 23750.9 unidades arbitrarias para el gen *Bax* con la concentración de 200 µg/mL a las 24 horas de exposición. En las líneas celulares LAN-1 se observó expresión de bajos niveles de expresión de *Bax* <200 unidades arbitrarias a las 48 horas de exposición a una concentración de 200 µg/mL. Y en la línea celular CHO se observó un aumento de 40029.9 unidades arbitrarias de *Bax* a las 48 horas de exposición a una concentración de 200 µg/mL.

Figura 46: Niveles de expresión génica de *Puma* y *Bax* en líneas celulares tratadas con dos concentraciones distintas de *S.commune* en dos puntos de tiempo (24 y 48 horas)



La expresión génica de *Puma* y *Bax* se evaluó luego de las exposiciones con el hongo *S. commune*. La línea celular LAN-1 expresó *Bax* en donde se observó un aumento a las 24 horas de exposición de 15377.5 de unidades arbitrarias con 200 µg/mL y a las 48 horas fue de 18200 unidades arbitrarias de expresión con 100 µg/mL. Por otro lado, en la línea celular UFH-001 se expresó *Bax* en rangos similares en las primeras 24 horas para ambas concentraciones. Se observó un aumento de 0.64 y 0.10 unidades arbitrarias en 100 y 200 µg/mL, respectivamente. Mientras que la expresión de *Puma* se observó en unidades arbitrarias < 200 en la línea celular LAN-1 a las 48 horas de exposición con 200 µg/mL.

Discusión de resultados

El cáncer es un grupo enfermedades complejas cuya progresión depende de una serie de cambios a nivel celular que provocan que los tumores puedan expandirse y evolucionar (Solé y Aguadé-Gorgorió 2021). La incidencia y mortalidad está aumentando y se clasifica como una de las mayores causas de muerte en todo el mundo (Papież y Krzyściak 2021). Las terapias convencionales empleadas como la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia están asociadas con efectos secundarios que comprometen la calidad de vida del paciente. La aplicación de medicina alternativa complementaria y la búsqueda de adyuvantes que permitan disminuir los efectos secundarios de las terapias convencionales y potenciarlas, se ha vuelto una necesidad de gran importancia (Plácido, Roque y Morgado 2022). Es de suma importancia encontrar métodos alternativos en países de ingresos bajos y medios en donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y tratamiento son limitados o inexistentes (Figueiredo y Régis 2017).

Los hongos son organismos multidiversos que habitan distintos hábitats en el planeta, se han descrito alrededor de 130 actividades beneficiosas para la salud (Chugh et al. 2022); en China los extractos de *Trametes versicolor* han sido aprobados por la SAFTD como suplementos para aumentar la función inmunológica y presentar actividad anticancerígena (Venturella et al. 2021). Los extractos de algunos hongos han demostrado tener efectos prometedores en terapias contra el cáncer esto debido a que son fuente de compuestos biológicamente activos como los β -glucanos, polifenoles, ligninas, entre otros. Dichas actividades antiproliferativas, antitumorales, antioxidantes y actividades inductoras han sido estudiadas *in vitro* mostrando resultados prometedores (Figueiredo y Régis 2017). Se ha reportado anteriormente el potencial antitumorigénico en distintas líneas celulares de las especies de hongos *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor* y *Schizophyllum commune* (Aparn Menakongka et al. 2019; Jędrzejewski et al. 2020; Pięt et al. 2021).

El propósito de este estudio fue determinar el potencial citotóxico de extractos derivados de especies de hongos endémicas de Guatemala, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensis* y *Schizophyllum commune* mediante ensayos de viabilidad celular y expresión génica relacionada a la ruta de muerte celular programada.

8.1. Rendimiento de extracción y grupos funcionales presentes

8.1.1. Método de extracción

Los hongos son valorados debido a la presencia de altas concentraciones de sustancias bioactivas como los aminoácidos, proteínas, vitaminas, minerales, fibra dietética y polisacáridos. La selección del método de extracción de estos componentes es esencial para obtener extractos con un alto rendimiento y al menor costo (Hamza et al. 2024). El método de extracción empleado fue con un disolvente orgánico, etanol absoluto. Se seleccionó etanol debido a que tiene una polaridad similar a los analitos deseados y se ha demostrado en estudios previos que los extractos etanólicos presentaron una mayor actividad anticancerígena significativa a diferencia de los extractos preparados con otros solventes empleados como agua y etanol al 50 % (Wu et al. 2014). Generalmente el rendimiento de este tipo de extracción es aproximadamente del 31.7 % (Hamza et al. 2024), sin embargo, para este estudio el rendimiento de la extracción varió en un rango entre 0.428 % y 4.438 % , indicando una extracción poco efectiva. Esto se puede deber a que las muestras tenían micelio reducido, que fue variable entre las especies de hongos y que probablemente no se maceró completamente la muestra (ver tabla 6).

Para mejorar el rendimiento de extracción utilizando una técnica de disolventes orgánicos se recomienda la maceración completa de la muestra y seleccionar adecuadamente el solvente. El metanol es eficiente para la extracción de sustancias fenólicas mientras que el etanol se utiliza para la extracción de polisacáridos, se debe considerar que a mayor concentración de disolvente existe una mayor solubilidad e interacción con los compuestos que se desean extraer. Sin embargo, se debe considerar importante tomar en cuenta que en este método de extracción requiere un largo tiempo de tratamiento y filtraciones, uso intensivo de disolvente y un posible deterioro térmico. Otro método alternativo que podría ser aplicado es la extracción mediada por ultrasonidos, que comprende la extracción mediante al uso de ondas ultrasónicas; que al romper las paredes celulares se permite que el solvente penetre y se extraigan los compuestos seleccionados. Generalmente este tipo de extracción requiere menos tiempo, tiene bajo costo y es fácil de utilizar, el rendimiento de este tipo de extracción suele ser alrededor del 43.20 % (Hamza et al. 2024).

8.1.2. Grupos funcionales presentes

La espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR) es una tecnología rápida no invasiva que permite determinar los componentes químicos en una muestra, es un método preciso y confiable para la detección de grupos funcionales y otro tipo de análisis de metabolitos (Dzurendova et al. 2020). Una de sus ventajas es la capacidad y su capacidad para obtener espectros de una amplia gama de compuestos diferentes y que su región se extiende desde la región visible hasta las microondas (Santos et al. 2010). Se realizó un análisis de FTIR para cada uno de los extractos preparados, se identificaron los grupos funcionales presentes (ver tablas 7 -10) basados en los espectros obtenidos (Ver anexos 51 - 54).

El espectro IR del extracto de *P. sanguineus* (Ver tabla 7) muestra la presencia de grupos funcionales representativos de alcanos (tensión C-H), alenos (C=C=C), cetonas cíclicas de cinco miembros, compuestos aromáticos y sulfóxidos. Para el extracto de *T. versicolor* (Ver tabla 8) se identificaron compuestos alifáticos sustituidos (tensión C-H), alcoholes primarios y alquenos monosustituidos. Se identificó la presencia de alcanos, cetonas cíclicas de 5 miembros, amidas secundarias, alcoholes primarios y alquenos monosustituidos en el extracto de *T. menziensis* (Ver tabla 9). Por último, en el extracto de *S. commune* (Ver tabla 10) se identificaron grupos funcionales similares, incluyendo alcanos, amidas cíclicas, alquenos monosustituidos y alcoholes primarios. Este análisis de FTIR revela la diversidad de grupos funcionales que componen los extractos, esto sugiere la presencia de metabolitos secundarios con potencial biológico. Ya que estos grupos funcionales son frecuentes en componentes bioactivos como los β -glucanos como el letinan, grifolan, los proteoglicanos, lectinas, ligninas, purinas y polifenoles que podrían conferirle su posible actividad antitumorigénica a estos extractos (Figueiredo y Régis 2017).

Sin embargo, no fue posible la identificación de estos metabolitos debido a la poca cantidad de extracto disponible, como lo indica su bajo rendimiento y la disponibilidad de técnicas sensibles a bajas concentraciones de metabolitos. Por lo que se recomienda para la identificación de los metabolitos la aplicación de la Espectrometría de masas por cromatografía de gases (GC-MS); ya que es un método que ha sido utilizado para detectar diferentes hidrocarburos, aceites volátiles, ácidos, ésteres, alcaloides, ácidos grasos y compuestos amino y nitro en extractos naturales, además ha demostrado eficiencia para la detección de metabolitos secundarios (El-Naggar, Shehata y Morsi 2023). Además, se recomienda para mejorar la exactitud de los resultados se realice una identificación molecular de cada hongo mediante a una extracción genómica de ADN y la amplificación de la región de espaciadores transcritos internos (ITS) esto permitirá relacionar los metabolitos a una especie determinada y confirmar la identidad de los hongos empleados (Kumari et al. 2022).

8.2. Morfología y viabilidad celular con azul de tripano y MTT

Se evaluó el efecto en la morfología y viabilidad celular de las líneas celulares CHO, LAN-1 y UFH-001 del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos diferentes del extractos. Esto se realizó mediante a la visualización de la morfología con un microscopio invertido (10X), conteo de células viables con azul de tripano y el ensayo MTT.

8.2.1. *Pycnoporus sanguineus*

El hongo *Pycnoporus sanguineus* es una gran fuente de componentes bioactivos que exhiben propiedades anticancerígenas, las moléculas responsables de estas propiedades son polisacáridos y grupos fenólicos. Se ha demostrado que el extracto de *P. sanguineus* a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduce la viabilidad en las líneas cancerígenas HT-29 y SW946 (Pięć et al. 2021). En otro estudio se demostró que el extracto de etanol de *P. sanguineus* fue altamente citotóxico contra la líneas celulares HeLa, HT-29, MCF-7 y PC-3, los compuestos identificados con estas actividades biológicas fueron alcaloides de fenozaxona y peróxido de ergosterol (Boukes et al. 2017). En este estudio se observó que la exposición del extracto provocó un cambio de morfología a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas en las células CHO (Figura 23), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas en LAN-1 (Figura 27) y en todos los tiempos y concentraciones evaluadas en UFH-001 (Figura 31). Provocó una disminución de la viabilidad celular en CHO a las 24 horas en ambas concentraciones (Figura 39) , en LAN-1 en ambos tiempos a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 39) y en UFH-001 (Figuras 35 y 39) en ambos tiempos y concentraciones. El efecto en las líneas celulares sugiere un potencial citotóxico de este hongo, además, se relacionan con lo reportado anteriormente con otras líneas celulares tumorales, en donde se vio afectada la morfología y viabilidad celular. Debido a que provocó un efecto en la línea no tumoral CHO, se recomienda se realice un ensayo de

DL₅₀ que permita determinar la dosis segura.

A pesar de que los resultados de este estudio son similares a lo reportado anteriormente, sin embargo, se requiere de más representatividad y réplicas que permitan determinar si el extracto preparado en este estudio presenta un potencial anticancerígeno. Se recomienda que se aumenten las réplicas y que el extracto sea evaluado en diferentes líneas celulares.

8.2.2. *Trametes versicolor*

Se ha reportado en estudios previos que el tratamiento con el extracto de *T. versicolor* tiene un efecto citotóxico sobre células epiteliales HUVEC y células de cáncer mama MCF-7, en donde se observó la viabilidad disminuyó significativamente (Jędrzejewski et al. 2020). Además, se ha reportado el efecto citotóxico de los componentes polisacáridos del extracto en células de melanoma (Pawlikowska et al. 2020). Esto se relaciona con lo encontrado para las tres líneas celulares en donde también se observó una disminución de la viabilidad la línea no tumoral (CHO) en el ensayo de viabilidad MTT (Figura 40). Para LAN-1 se observó que provocó un estrés celular al cambiar la morfología a una concentración de 100 µg/mL después de 24 horas de exposición (Figura 28) y disminuyó la viabilidad celular en ambas concentraciones a las 24 horas de exposición (Figuras 36 y 40). Y en la línea UFH-001 se observó un cambio de morfología que indicaban un respuesta inicial a estrés en los tiempos y concentraciones evaluadas (Figura 32), además, se observó que disminuyó la viabilidad en ambas concentraciones evaluadas después de 48 horas de exposición (Figuras 36 y 40) Estos resultados se relacionan con lo reportado anteriormente, debido a que dosis desde 50-300µg/mL se observó una disminución de la viabilidad en células HUVEC, como se observa en ambas concentraciones en las células CHO, ambas siendo líneas no tumorales. En una concentración 200µg/mL en las células tumorales demostró reducir de igual forma la viabilidad celular como se obtuvo en este estudio.

Se recomienda que se utilicen más líneas celulares tanto tumorales como no tumorales para verificar su efecto citotóxico en ambas, debido a que, si reduce la viabilidad de células no tumorales, debe ser determinada la dosis segura para su administración. Además, se recomienda el aislamiento de sus metabolitos secundarios para analizar el potencial citotóxico de cada uno. Por último, se recomienda aumentar la significancia estadística de estos ensayos. A partir de estos resultados se infiere que *T. versicolor* podría tener un efecto citotóxico en las líneas celulares y tumorales.

8.2.3. *Trametes menziensis*

El estudio de *Trametes menziensis* como una posible especie con potencial citotóxico no ha sido explorada. Por lo que esta investigación permite ampliar el conocimiento y explora el potencial anticancerígeno de esta especie. En el género *Trametes* se han identificado especies como *T. versicolor*, *T. gibbosa*, *T. hirsuta*, *T. lactinea* y *T. robiniophila* que han sido reportadas por tener un potencial antitumoral debido a la presencia de polisacáridos y ligninas de tetralina (Muñoz, Mejía y Puertas 2020). No existe literatura en donde se reporte el efecto de *T. menziensis* en líneas tumorales, por lo que esta es un área explorada por primera vez en este estudio, pero si ha reportado este potencial en las especies mencionadas anteriormente. En este estudio se observó que la exposición de este hongo redujo la viabilidad celular en las células CHO en ambos tiempos y concentraciones evaluadas (Figura 41). Mientras que para LAN-1 redujo la viabilidad en ambas concentraciones solamente después de 48 horas de exposición (Figuras 37 y 41). En UFH-001 se observó un cambio en la morfología (Figura 33) al observar un mayor número de células no adheridas, indicando una respuesta inicial al estrés celular. A partir de los ensayos de viabilidad se observó que disminuyó la viabilidad celular en ambas concentración a los dos tiempos de exposición (Figuras 37 y 41). Estos resultados exploraron el potencial de otra especie del género *Trametes*, sin embargo, al observar un efecto en la línea no tumoral (CHO), se recomienda se realice un ensayo para determinar una dosis que

no afecte esta línea y se realicen estos ensayos en mayor número para aumentar la representatividad y significancia de los resultados.

8.2.4. *Schizophyllum commune*

Se ha reportado que el polisacárido conocido como *schizophyllan* ha demostrado tener efectos antitumorales (Mišković et al. 2021). En estudios previos se encontró los compuestos bioactivos presentaron un potencial inhibitorio en la proliferación celular en las líneas celulares HeLa, MCF-7m T47S y WiDR (Ekowati et al. 2020). En otro estudio se encontró que el extracto inhibió células de colangiocarcinoma KKMU-M313 al disminuir la viabilidad en un 50 % (Apaporn Menakongka et al. 2019). Los hallazgos de este estudio son similares a lo reportado por previos autores, debido a que se observó un aumento en la respuesta inicial a estrés celular en las células LAN-1 después de 48 horas de exposición a una concentración de 100 µg/mL (Figura 30) y a partir de los ensayos de morfología se encontró que redujo la viabilidad a las 24 horas de exposición a una concentración de 200 µg/mL (Figuras 38 Y 42) y en ambas concentraciones a 48 horas (Figura 42). Para la línea UPH-001 se observó que la exposición provocó un cambio en la morfología celular (Figura 34) y una reducción de la viabilidad después de 24 horas de tratamiento a una concentración de 100 µg/mL (Figura 38) y 200 µg/mL (Figuras 38 Y 42) y a las 48 horas en ambas concentraciones (Figura 42). Sin embargo, se observó una disminución en la viabilidad celular de las células CHO. Por lo que se sugiere aumentar las réplicas para determinar si este efecto es significativo y utilizar más líneas no tumorales.

8.2.5. Métodos empleados para determinar la viabilidad celular

En este estudio se utilizaron dos métodos para medir la viabilidad celular; en el ensayo de azul de tripano donde el colorante penetra en la membrana comprometida de las células y el ensayo de MTT que se basa en una reacción colorimétrica por la reductasa mitocondrial. Ambos ensayos deben de estar correlacionados si se realizan para un mismo experimento debido a que las células viables deben de mostrar una actividad metabólica (Azzoz et al. 2024). Sin embargo, en este estudio se observó una diferencia entre la viabilidad reportada entre estos ensayos, siendo la principal diferencia en la línea no tumoral (CHO). Esta diferencia se puede deber a limitaciones del método empleado y a la diferencia en pasaje en el cual se realizaron las pruebas, siendo un pasaje mayor utilizado para el ensayo de MTT.

El ensayo con azul de tripano es sencillo y de bajo costo; presenta algunas limitaciones como la inexactitud, consume mucho tiempo, posible efecto citotóxico y los falsos positivos. Además, las células que crecen en adherencia cuando se mueren se despegan de la superficie, por lo que cuando se realiza el proceso con tripsina, se podrían descartar células muertas que ya no son adherentes. Se ha demostrado que en el ensayo de MTT es más exacto para la cuantificación de viabilidad permite disminuir el error sistemático y el error por células que ya no se encuentran adheridas (Azzoz et al. 2024). Otro factor que afectó los resultados fue el pasaje de la célula debido a que se ha comprado en estudios previos que la viabilidad disminuye conforme el pasaje y los resultados varían si se evalúa un tratamiento y reduce la tasa de crecimiento (Handl et al. 2020; Kwist, Bridges y Burg 2016). Por lo que se recomienda utilizar un contador automático de células que es más eficiente y exacto; además, de realizar ambas pruebas de viabilidad con el mismo pasaje de células para garantizar uniformidad en los resultados.

8.3. Expresión génica de *Puma* y *Bax*

La expresión génica de *Puma* y *Bax* se determinó en este estudio debido a que son genes proapoptóticos importantes en la vía intrínseca de la muerte celular programada (Chaudhry et al. 2022). *Puma* es un miembro de la familia BCL-2 que induce la apoptosis en algunos tipos de células, cuya transcripción empieza en el núcleo por distintas señales y desencadena la apoptosis al antagonizar funciones de BCL-2 a través del complejo BAX/BAK, siendo un modulador importante al evaluar las respuestas terapéuticas. Su expresión promueve la permeabilidad de la membrana mitocondrial y libera factores pro-apoptóticos a través de diferentes mecanismos: la unión con la molécula Bcl2-Bcl-xL en la membrana mitocondrial para inhibir su efecto y permitir que se forme el dímero Bax/Bcl-2 con Bak, se une directamente al dímero induciendo un cambio conformacional que lleva a la translocación del dímero desde el citoplasma a la membrana externa de la mitocondria y a través de la unión con Bcl-xL en el complejo p53/Bcl-xL, liberando p53 para activar a *Bax* (Tu et al. 2018). Se encontró expresión de *Puma* en unidades arbitrarias <250 después de las exposiciones a *T. versicolor* (100 µg/mL y 200µg/mL) y *P. sanguineus* (100µg/mL) durante 24 horas en UFH-001 (Figuras 43 y 44) esto implica que se activó la muerte celular programada a través de p53. *Pumase* puede activar por la detección de estrés celular provocado por agentes genotóxicos, radiación u sustancias que con potencial antitumoral. Se ha encontrado que la expresión elevada en combinación con agentes anticancerígenos induce una toxicidad profunda a las células cancerosas, como en el cáncer de mama, que se relaciona con lo observado en este estudio (Yu y Zhang 2008). No se reportó la expresión de *Puma* en otras líneas celulares tumorales debido a que se ha descubierto que el p53 se encuentra mutado o perdido en más del 50 % de todos los casos de cáncer humano (Wu et al. 2023).

Por otro lado, el gen *Bax* es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 y en distintos estudios se han asociados con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (Pastorino et al. 1998). Esta familia de proteínas media un paso crítico en el proceso de apoptosis al regular la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOM), las proteínas *Bax* y *Bax* son proteínas ejecutoras, después de su activación se oligomerizan y permeabiliza la membrana permitiendo la liberación de componentes del espacio intermembranal a través de la formación de poros de la mitocondria, esto activa las caspasas efectoras finales. Su activación se da a través de los activadores como *Puma* y *Bim*. En este estudio se observó la expresión de *Bax* en unidades arbitrarias <250 después de la exposición a *T. versicolor* por 24 horas en la línea UFH-001 a una concentración de 100 µg/mL (Figura 44) y *T. menziensii* a 200 µg/mL (Figura 45), en la línea LAN-1 se observó la expresión después de 24 horas de exposición de *S. commune* (Figura 46) después de 24 horas a 200 µg/mL y 100 µg/mL después de 48 horas y en la línea CHO se observó a 48 horas de exposición a una concentración de 100 µg/mL con *T. menziensii* (Figura 45). No se ha reportado como afecta la expresión de ambos genes el tratamiento con extractos de hongos, sin embargo, el tratamiento con el hongo Chaga (*Inonotus obliquus*) aumentó la expresión de la quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) que está relacionada a la supresión de tumores en la línea celular HSC-4 (Yeo et al. 2024), lo que indica un potencial en los componentes bioactivos de activar rutas relacionadas a la PCD.

Se ha encontrado que con el extracto de la planta de *Piper nigrum* se induce la expresión de p53 y *Bax*, lo que ocasiona una liberación de citocromo c y activar las caspasas en células de cáncer colorrectal humano HT-29 (Wu et al. 2023). Con base a estas observaciones se sugiere que en el caso de *T. versicolor* a una concentración de 100µg/mL por 24 horas en UFH-001 indujo la muerte celular a través de la transcripción de *Puma* por estrés celular ocasionado, y luego este a través de su mecanismo de acción activó a *Bax* para generar poros en la membrana y promover la liberación de citocromo c y la activación de caspasas ocasionando la apoptosis como se observa en el anexo 55. Sin embargo, en donde solo se observó expresión de *Puma* y no *Bax* se sugiere que la permeabilización de la membrana se da a través de *Bak*, como se muestra en el anexo 57. Por otro lado, para los extractos en donde no se observó expresión de *Puma* pero si de *Bax* se sugiere que esta ruta se activó mediante la unión con otra proteína de tipo BH3, por ejemplo, *Bim* que desencadena el

mismo efecto al generar poros en la membrana mitocondrial al activar *Bax*, la activación de esta proteína puede ser por acción directa de p53 o por el factor de transcripción FOXO, como se observa en el anexo 56. Por lo que se sugiere determinar si se expresa *Bim* y otras proteínas BH3; ya que podrían indicar porque *Bax* se activa y no *Puma*. Por otro lado, *Bim* también se puede expresar para mantener la homeostasis, por lo que es posible que *Bax* se haya activado a través de este mecanismo en las células CHO para mantener el equilibrio o respuesta al estrés generado por el extracto de *T. menziensis*.

Los hallazgos de estudio permitieron explorar el potencial antitumoral y citotóxico de los extractos de hongo *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes menziensis* y *Schizophyllum commune*. Debido que se logró evaluar la viabilidad celular después del tratamiento con los extractos y cuantificar la expresión génica de los genes pro-aptóicos.

Conclusiones

- Se obtuvo un bajo rendimiento entre 0.4 % y 4.4 % con el método de extracción empleado debido a la cantidad limitada de muestra inicial y maceración incompleta de la muestra, resaltando la importancia de optimizar condiciones de extracción.
- El análisis de FTIR permitió detectar diversos grupos funcionales como alcanos, aromáticos, cetonas, sulfóxidos, alquenos, alcoholes primarios y amidas presentes en los extractos, lo que podría indicar la presencia de compuestos bioactivos al mostrar una diversidad de grupos presentes como polifenoles, ácidos grasos, terpenos y alcoholes. Estos compuestos presentes en los extractos han sido reportados por su actividad antitumoral.
- Los extractos evaluados de *P. sanguineus*, *T. versicolor*, *T. menziensii* demostraron tener un efecto antitumoral en las células de cáncer de mama (UFH-001) en ambas dosis y tiempos de exposición, al reducir la viabilidad celular. Además, indujeron la expresión de *Puma* (*P. sanguineus* y *T. versicolor*) y *Bax* (únicamente con *T. versicolor*, 100 µg/mL, 48 horas), lo que indica que los compuestos bioactivos presentes activaron esta ruta y que la activación de *Bax*, se dio a través de *Puma*.
- La exposición a los extractos de *P. sanguineus*, *T. versicolor*, *T. menziensii* y *S. commune* redujeron la viabilidad celular en LAN-1 a una concentración de 200µg/mL por 24 horas y 48 horas (únicamente con *T. menziensii*). Solo *S. commune* provocó una expresión de *Bax* a esa concentración y a 100 µg/mL por 48 horas.
- El análisis de la expresión génica demostró que los extractos de *T. menziensii* (200 µg/mL, 24 horas), *T. versicolor* (100 µg/mL, 24 horas) en UFH-001 inducen la expresión únicamente de *Bax*. Indicando que la activación de la ruta muerte celular programada se da por otro tipo de proteína BH3 distinta a *Puma*, por ejemplo *Bim*.
- Se reportó la expresión de *Bax* en células CHO (100 µg/mL, 48 horas), esto se infiere que se dio por el estrés causado por la exposición a *T. menziensii* y se relaciona con lo observado ya que disminuyó la viabilidad celular.

CAPÍTULO 10

Recomendaciones

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación para optimizar los resultados para futuras investigaciones:

- Optimizar el método de extracción mediante a la maceración completa de las muestras, selección adecuada de solventes.
- Considerar el uso de técnicas alternativas para la extracción como la mediada por ultrasonidos para mejorar el rendimiento.
- Identificar metabolitos secundarios empleando la Espectrometría de Masas por Cromatografía de Gases (GC-MS).
- Realizar una caracterización molecular mediante la amplificación de la región ITS para confirmar la identidad de las especies fúngicas utilizadas.
- Aumentar el número de réplicas y evaluar diferentes líneas celulares para mejorar la significancia y representatividad de los resultados.
- Considerar utilizar el mismo pasaje para todos los ensayos con los distintos tratamientos.
- Optimizar las condiciones de qPCR debido a que se observaron valores umbrales superiores a 35.

- Adan, A., Kiraz, Y., y Baran, Y. (2016) Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays [Ensayos de proliferación celular y citotoxicidad]. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17, 1213-1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Alam, M., Ali, S., Mohammad, T., Hasan, G. M., Yadav, D. K., y Hassan, M. I. (2021) B Cell Lymphoma 2: A Potential Therapeutic Target for Cancer Therapy [Linfoma de células B tipo 2: un posible objetivo terapéutico para el tratamiento del cáncer]. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 10442. <https://doi.org/10.3390/ijms221910442>
- Altun, İ., y Sonkaya, A. (2018) The Most Common Side Effects Experienced by Patients Were Receiving First Cycle of Chemotherapy [Los efectos secundarios más comunes que experimentaron los pacientes que recibieron el primer ciclo de quimioterapia]. *Iranian Journal of Public Health* 47, 1218-1219. Consultado el 14 de octubre de 2024, desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6123577/>
- Apaporn Menakongka, Siriluk Ruaengsrityakij, Siritorn Sripayak y Tuangporn Suthiphongchai. (2019) Anti-proliferation and Anti-migration of Schizophyllum commune extracts on Human Cholangiocarcinoma Cell Line [Antiproliferación y antimigración de extractos de Schizophyllum commune en la línea celular de colangiocarcinoma humano] [Publisher: Text and Journal Publication]. *Vajira Medical Journal* 63. <https://doi.org/10.14456/VMJ.2019.38>
- Aryal, S. C., y Aryal, G. (2018) Early detection of cancer in nepal: Role of liquid biopsy [detección temprana del cáncer en nepal: El papel de la biopsia líquida] [Number: 2]. *Journal of Pathology of Nepal* 8, 1399-1407. <https://doi.org/10.3126/jpn.v8i2.20893>
- Avery, A., Alden, J., Kramish, C., Caballero, C., Wright-Void, C., y Bruner, E. T. (2022, 1 de enero) Chapter One - The pathologic diagnosis of carcinoma in various tissues [Capítulo uno - El diagnóstico patológico del carcinoma en diversos tejidos]. En P. M. Angel y M. C. Ostrowski (Eds.), *Advances in Cancer Research* (pp. 1-14, Vol. 154). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2022.03.001>
- Azzoz, M. F., Zaghoul, M. A., Sayed, M. M., Soliman, H. M., Mounir, N. M., Abdel Shakour, N. K., El-Dabae, W. H., y Aly, S. E. (2024) Efficiency of MTT and Trypan Blue Assays for Detection of Viability and Recovery of Different Frozen Cell Lines [Eficiencia de los ensayos de MTT y azul tripán para la detección de viabilidad y recuperación de diferentes líneas celulares congeladas] [Publisher: National Information and Documentation Center (NIDOC), Academy of Scientific Research and Technology (ASRT)]. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences* 55, 1649-1657. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2024.260687.1764>
- Barakeh, D. H., Aljelaify, R., Bashawri, Y., Almutairi, A., Alqubaishi, F., Alnamnakani, M., Almuarak, L., Naeem, A. A., Almushawah, F., Alrashed, M., y Abedalthagafi, M. (2021)

- Landscape of somatic mutations in breast cancer: New opportunities for targeted therapies in Saudi Arabian patients [panorama de las mutaciones somáticas en el cáncer de mama: Nuevas oportunidades para terapias dirigidas en pacientes de Arabia Saudita] [Publisher: Impact Journals]. *Oncotarget* 12, 686-697. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27909>
- Baulu, E., Gardet, C., Chuvin, N., y Depil, S. (2023) TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives [Terapia con células T diseñadas con TCR en tumores sólidos: estado del arte y perspectivas]. *Science Advances* 9, eadf3700. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf3700>
- Bedoui, S., Herold, M. J., y Strasser, A. (2020) Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [conectividad emergente de las vías de muerte celular programada y sus implicaciones fisiológicas] [Publisher: Nature Publishing Group]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 678-695. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0270-8>
- Bestbier, J. (2024) *Cell culture basics: Equipment, fundamentals and protocols* [fundamentos del cultivo celular: Equipos, fundamentos y protocolos] [Cell science from technology networks]. Consultado el 14 de octubre de 2024, desde <http://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-culture-basics-equipment-fundamentals-and-protocols-348413>
- Bisby, F. A., y Roskov, Y. R. (2010) The catalogue of life: Towards an integrative taxonomic backbone for biodiversity [el catálogo de la vida: Hacia una columna vertebral taxonómica integradora de la biodiversidad].
- Boukes, G. J., Koekemoer, T. C., van de Venter, M., y Govender, S. (2017) Cytotoxicity of thirteen South African macrofungal species against five cancer cell lines [Citotoxicidad de trece especies de macrohongos sudafricanos contra cinco líneas de células cancerosas]. *South African Journal of Botany* 113, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.010>
- Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L., y Schiffman, J. D. (2012) The Epidemiology of Sarcoma [La epidemiología del sarcoma]. *Clinical Sarcoma Research* 2, 14. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-2-14>
- Chaudhry, G.-e.-S., Md Akim, A., Sung, Y. Y., y Sifzizul, T. M. T. (2022) Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics [Cáncer y apoptosis: La actividad apoptótica de productos naturales vegetales y marinos y su potencial como terapias dirigidas contra el cáncer] [Publisher: Frontiers]. *Frontiers in Pharmacology* 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842376>
- Chen, T., Wang, M., Chen, Y., y Liu, Y. (2024) Current challenges and therapeutic advances of CAR-T cell therapy for solid tumors [Desafíos actuales y avances terapéuticos de la terapia con células CAR-T para tumores sólidos]. *Cancer Cell International* 24, 133. <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03315-3>
- Chen, Z., Ai, L., Mboge, M. Y., McKenna, R., Frost, C. J., Heldermon, C. D., y Frost, S. C. (2018) UFH-001 cells: A novel triple negative, CAIX-positive, human breast cancer model system [Células UFH-001: Un nuevo sistema modelo de cáncer de mama humano triple negativo y CAIX-positivo - PMC]. *Cancer Biology Therapy* 19, 598-608. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1449612>
- Chennamadhavuni, A., Lyengar, V., Mukkamalla, S. K. R., y Shimanovsky, A. (2024) Leukemia [Leucemia]. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. Consultado el 25 de noviembre de 2024, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>
- Chugh, R. M., Mittal, P., MP, N., Arora, T., Bhattacharya, T., Chopra, H., Cavalu, S., y Gautam, R. K. (2022) Fungal Mushrooms: A Natural Compound With Therapeutic Applications. *Frontiers in Pharmacology* 13, 925387. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.925387>
- Chung, C., Boterberg, T., Lucas, J., Panoff, J., Valteau-Couanet, D., Hero, B., Bagatell, R., y Hill-Kayser, C. E. (2021) Neuroblastoma. *Pediatric blood cancer* 68, e28473. <https://doi.org/10.1002/pbc.28473>
- de la Salud, O. P. (2022, 23 de septiembre) *Perfil de país - Guatemala* [Salud en las Américas]. Consultado el 22 de julio de 2024, desde <https://hia.paho.org/es/paises-2022/perfil-guatemala>

- Delbridge, A. R., Valente, L. J., y Strasser, A. (2012) The Role of the Apoptotic Machinery in Tumor Suppression [El papel de la maquinaria apoptótica en la supresión tumoral]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a008789. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008789>
- Dzurendova, S., Zimmermann, B., Kohler, A., Tafintseva, V., Slany, O., Certik, M., y Shapaval, V. (2020) Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced co-production of high-value metabolites in oleaginous Mucoromycota fungi [El cribado basado en microcultivo y espectroscopia FTIR reveló una coproducción inducida por nutrientes de metabolitos de alto valor en hongos oleaginosos Mucoromycota.] *PLoS ONE* 15, e0234870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234870>
- Ekowati, N., Mumpuni, A., Ratnaningtyas, N. I., y Maharning, A. R. (2020) Compounds detection and inhibition activity of chloroform and ethyl acetate extracts of schizophyllum commune on some cancer cell types [detección de compuestos y actividad inhibidora de extractos de cloroformo y acetato de etilo de schizophyllum commune sobre algunos tipos de células cancerosas.] [Number: 12]. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 21. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211251>
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death [Apoptosis: una revisión de la muerte celular programada]. *Toxicologic pathology* 35, 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- El-Naggar, H. M., Shehata, A. M., y Morsi, M.-A. A. (2023) Micropropagation and GC-MS analysis of bioactive compounds in bulbs and callus of white squill [micropropagación y análisis GC-MS de compuestos bioactivos en bulbos y callos de escila blanca]. *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 59, 154-166. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10333-9>
- Fatatis, A., Bassi, A., Monsurrò, M. R., Sorrentino, G., Mita, G. D., Di Renzo, G. F., y Annunziato, L. (1992) Lan-1: A human neuroblastoma cell line with m1 and m3 muscarinic receptor subtypes coupled to intracellular ca2+ elevation and lacking ca2+ channels activated by membrane depolarization [lan-1: Una línea celular de neuroblastoma humano con subtipos de receptores muscarínicos m1 y m3 acoplados a la elevación intracelular de ca2+ y sin canales de ca2+ activados por despolarización de la membrana] [eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08868.x>]. *Journal of Neurochemistry* 59, 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08868.x>
- Figueiredo, L., y Régis, W. C. B. (2017) Medicinal mushrooms in adjuvant cancer therapies: An approach to anticancer effects and presumed mechanisms of action [hongos medicinales en terapias adyuvantes contra el cáncer: Una aproximación a los efectos anticancerígenos y presuntos mecanismos de acción]. *Nutrire* 42, 28. <https://doi.org/10.1186/s41110-017-0050-1>
- Gariboldi, M. B., Marras, E., Ferrario, N., Vivona, V., Prini, P., Vignati, F., y Perletti, G. (2023) Anti-Cancer Potential of Edible/Medicinal Mushrooms in Breast Cancer [Potencial anticancerígeno de los hongos comestibles/medicinales en el cáncer de mama]. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 10120. <https://doi.org/10.3390/ijms241210120>
- GCO. (2022) *Guatemala*. <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/320-guatemala-fact-sheet.pdf>
- Gould, S., y Templin, M. V. (2023) Off target toxicities and links with physicochemical properties of medicinal products, including antibiotics, oligonucleotides, lipid nanoparticles (with cationic and/or anionic charges). Data review suggests an emerging pattern [Toxicidades fuera del objetivo y vínculos con las propiedades fisicoquímicas de medicamentos, incluyendo antibióticos, oligonucleótidos y nanopartículas lipídicas (con cargas catiónicas y/o aniónicas). La revisión de datos sugiere un patrón emergente.] *Toxicology Letters* 384, 14-29. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.07.011>
- Habtemariam, S. (2020) Trametes versicolor (Synn. Coriolus versicolor) Polysaccharides in Cancer Therapy: Targets and Efficacy Polisacáridos de Trametes versicolor (sin. Coriolus versicolor) en la terapia contra el cáncer: objetivos y eficacia. *Biomedicines* 8, 135. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050135>
- Hamza, A., Mylarapu, A., Krishna, K. V., y Kumar, D. S. (2024) An insight into the nutritional and medicinal value of edible mushrooms: A natural treasury for human health [Una mirada

- al valor nutricional y medicinal de los hongos comestibles: un tesoro natural para la salud humana]. *Journal of Biotechnology* 381, 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.12.014>
- Handl, J., Čapek, J., Majtenorová, P., BÁČOVÁ, J., y ROUSAR, T. (2020) The Effect of Repeated Passaging on the Susceptibility of Human Proximal Tubular HK-2 Cells to Toxic Compounds [El efecto del pasaje repetido sobre la susceptibilidad de las células tubulares proximales humanas HK-2 a compuestos tóxicos]. *Physiological Research* 69, 731-738. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934491>
- Hao, Q., Chen, J., Lu, H., y Zhou, X. (2022) The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis [Las ARTS de la apoptosis mitocondrial dependiente de p53]. *Journal of Molecular Cell Biology* 14, mjac074. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac074>
- He, Z., Lin, J., He, Y., y Liu, S. (2022) Polysaccharide-peptide from trametes versicolor: The potential medicine for colorectal cancer treatment [péptido polisacárido de trametes versicolor: Un posible tratamiento para el cáncer colorrectal] [Number: 11 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Biomedicines* 10, 2841. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112841>
- IGSS. (2022, 4 de febrero) *El IGSS hace un llamado a la población para prevenir el cáncer* [Seguridad Social Ahora] [Section: Actualidad]. Consultado el 22 de julio de 2024, desde <https://www.igsgt.org/noticias/2022/02/04/el-igss-hace-un-llamado-a-la-poblacion-para-prevenir-el-cancer/>
- Institute, N. C. (2023) *Cancer Classification | SEER Training [Capacitación en clasificación del cáncer | SEER]*. Consultado el 24 de noviembre de 2024, desde <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Invitrogen. (s.f.) Cell Culture Basis [Bases del cultivo celular]. <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>
- Jędrzejewski, T., Sobocińska, J., Pawlikowska, M., Działuk, A., y Wrotek, S. (2020) Extract from the Coriolus versicolor Fungus as an Anti-Inflammatory Agent with Cytotoxic Properties against Endothelial Cells and Breast Cancer Cells [Extracto del hongo Coriolus versicolor como agente antiinflamatorio con propiedades citotóxicas contra células endoteliales y células de cáncer de mama]. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 9063. <https://doi.org/10.3390/ijms21239063>
- Jiang, M., Bennani, N. N., y Feldman, A. L. (2017) Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms [Actualización de la clasificación de linfomas: linfomas de células T, linfomas de Hodgkin y neoplasias de células histiocíticas/dendríticas]. *Expert review of hematology* 10, 239-249. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1281122>
- Katsura, C., Ogunmwoyi, I., Kankam, H. K., y Saha, S. (2022) Breast cancer: presentation, investigation and management [Cáncer de mama: presentación, investigación y manejo] [Publisher: Mark Allen Group]. *British Journal of Hospital Medicine* 83, 1-7. <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>
- Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., y Solovyeva, V. V. (2020) Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening [Sistemas de prueba in vitro basados en cultivos celulares para la detección de fármacos contra el cáncer] [Publisher: Frontiers]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00322>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Kalagasidou, S., Pagkalos, A., Alatzidou, D., Kantari, P., y Fasoulakis, Z. (2021) Basic principles of molecular biology of cancer cell-molecular cancer indicators [principios básicos de la biología molecular de las células cancerosas: Indicadores moleculares del cáncer]. <https://www.jbuon.com/archive/26-5-1723.pdf>
- Kumari, S., Kumari, S., Attri, C., Sharma, R., Kulshreshtha, S., Benali, T., Bouyahya, A., Güreş, E. S., y Sharifi-Rad, J. (2022) GC-MS Analysis, Antioxidant and Antifungal Studies of Different Extracts of Chaetomium globosum Isolated from Urginea indica [Análisis GC-MS, estudios antioxidantes y antifúngicos de diferentes extractos de Chaetomium globosum aislados de Urginea indica]. *BioMed Research International* 2022, 1388850. <https://doi.org/10.1155/2022/1388850>

- Kwist, K., Bridges, W. C., y Burg, K. J. L. (2016) The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells [El efecto del número de pases celulares en las características osteogénicas y adipogénicas de las células D1]. *Cytotechnology* 68, 1661-1667. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9883-8>
- Liu, X., Wang, J., y Chen, L. (2013) Whole-exome sequencing reveals recurrent somatic mutation networks in cancer [La secuenciación del exoma completo revela redes de mutaciones somáticas recurrentes en el cáncer]. *Cancer Letters*. Next Generation Sequencing Applications in Cancer Research 340, 270-276. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.002>
- Lobo, I. (2008) *Chromosome abnormalities and cancer cytogenetics [anomalías cromosómicas y citogenética del cáncer [Cg_cat: Chromosome Abnormalities and Cancer Cytogenetics Cg_level: DIF Cg_topic: Chromosome Abnormalities and Cancer Cytogenetics]*. Consultado el 25 de noviembre de 2024, desde <http://www.nature.com/scitable/topicpage/chromosome-abnormalities-and-cancer-cytogenetics-879>
- Mahajan, M. (2022) *Schizophyllum commune*. *Emerging Infectious Diseases* 28, 725. <https://doi.org/10.3201/eid2803.211051>
- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., y Jiang, W. G. (2013) Cancer invasion and metastasis: Molecular and cellular perspective [invasión y metástasis del cáncer: Perspectiva molecular y celular]. En *Madame curie bioscience database [internet]*. Landes Bioscience. Consultado el 14 de octubre de 2024, desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>
- Matuszewska, A., Stefaniuk, D., Jaszek, M., Pięt, M., Zając, A., Matuszewski, Ł., Cios, I., Graż, M., Paduch, R., y Bancerz, R. (2019) Antitumor potential of new low molecular weight antioxidative preparations from the white rot fungus *cerrena unicolor* against human colon cancer cells [potencial antitumoral de nuevas preparaciones antioxidantes de bajo peso molecular del hongo de podredumbre blanca *cerrena unicolor* contra células de cáncer de colon humano] [Publisher: Nature Publishing Group]. *Scientific Reports* 9, 1975. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37947-z>
- McKinnon, K. M. (2018) Flow Cytometry: An Overview [Citometría de flujo: una descripción general]. *Current protocols in immunology* 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Mišković, J., Karaman, M., Rašeta, M., Krsmanović, N., Berežni, S., Jakovljević, D., Piattoni, F., Zambonelli, A., Gargano, M. L., y Venturella, G. (2021) Comparison of Two *Schizophyllum commune* Strains in Production of Acetylcholinesterase Inhibitors and Antioxidants from Submerged Cultivation [Comparación de dos cepas de *Schizophyllum commune* en la producción de inhibidores de la acetilcolinesterasa y antioxidantes a partir de cultivo sumergido]. *Journal of Fungi* 7, 115. <https://doi.org/10.3390/jof7020115>
- Monteiro, A. C. B., França, R. P., Arthur, R., y Iano, Y. (2021, 1 de enero) Chapter 2 - The fundamentals and potential of translational medicine in healthcare [Capítulo 2 - Los fundamentos y el potencial de la medicina traslacional en la atención sanitaria]. En K. Raza y N. Dey (Eds.), *Translational Bioinformatics in Healthcare and Medicine* (pp. 13-27, Vol. 13). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89824-9.00002-1>
- Morales, D. (2024) *Una Acción más a favor de la salud de los Guatemaltecos* [Congreso de la República]. Consultado el 22 de julio de 2024, desde https://www.congreso.gob.gt/noticias_congreso/10917/2024/4
- Muñoz, T., Mejía, J., y Puertas, M. (2020) *Trametes* genus, a source of chemical compounds with anticancer activity in human osteosarcoma: A systematic review [Género *Trametes*, fuente de compuestos químicos con actividad anticancerígena en el osteosarcoma humano: una revisión sistemática]. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.1010014>
- Nagpal, M., Singh, S., Singh, P., Chauhan, P., y Zaidi, M. A. (2016) Tumor markers: A diagnostic tool [Marcadores tumorales: una herramienta diagnóstica]. *National Journal of Maxillofacial Surgery* 7, 17-20. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.196135>
- Naim, M. J. (2024) A review on mushrooms as a versatile therapeutic agent with emphasis on its bioactive constituents for anticancer and antioxidant potential [una revisión sobre los hongos como agente terapéutico versátil con énfasis en sus componentes bioactivos para el potencial

- anticancerígeno y antioxidante.] [Number: 3 Publisher: Open Exploration]. *Exploration of Medicine* 5, 312-330. <https://doi.org/10.37349/emed.2024.00222>
- Nakano, K., y Vousden, K. H. (2001) PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53 [PUMA, un nuevo gen proapoptótico, es inducido por p53] [Publisher: Elsevier]. *Molecular Cell* 7, 683-694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00214-3)
- Naranjo-Ortiz, M. A., y Gabaldón, T. (2019) Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the fungi [evolución de los hongos: Diversidad, taxonomía y filogenia de los hongos] [eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/brv.12550>]. *Biological Reviews* 94, 2101-2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- O'Brien, M. A., y Kirby, R. (2008) Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease [Apoptosis: una revisión de las vías proapoptóticas y antiapoptóticas y la desregulación en la enfermedad]. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 18, 572-585. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x>
- Ola, A. (2023, 14 de diciembre) “El cáncer va a aumentar, esa epidemia no nos lo vamos a quitar”: La edad es un factor de riesgo para la enfermedad [Prensa Libre]. <https://www.prensalibre.com/guatemala/comunitario/el-cancer-va-a-aumentar-esa-epidemia-no-nos-lo-vamos-a-quitara-la-edad-es-un-factor-de-riesgo-para-la-enfermedad/>
- Opferman, J. T., y Kothari, A. (2018) Anti-apoptotic BCL-2 family members in development [Miembros de la familia antiapoptótica BCL-2 en desarrollo]. *Cell Death and Differentiation* 25, 37-45. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.170>
- Panda, S. K., Sahoo, G., Swain, S. S., y Luyten, W. (2022) Anticancer Activities of Mushrooms: A Neglected Source for Drug Discovery [Actividades anticancerígenas de los hongos: una fuente olvidada para el descubrimiento de fármacos]. *Pharmaceuticals* 15, 176. <https://doi.org/10.3390/ph15020176>
- Papież, M. A., y Krzyściak, W. (2021) Biological Therapies in the Treatment of Cancer—Update and New Directions [Terapias biológicas en el tratamiento del cáncer: actualización y nuevas direcciones]. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 11694. <https://doi.org/10.3390/ijms222111694>
- Pastorino, J. G., Chen, S.-T., Tafani, M., Snyder, J. W., y Farber, J. L. (1998) La sobreexpresión de Bax produce muerte celular tras la inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial *. *Journal of Biological Chemistry* 273, 7770-7775. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7770>
- Pawlikowska, M., Piotrowski, J., Jędrzejewski, T., Kozak, W., Slominski, A. T., y Brożyna, A. A. (2020) Coriolus versicolor-derived protein-bound polysaccharides trigger the caspase-independent cell death pathway in amelanotic but not melanotic melanoma cells [Los polisacáridos unidos a proteínas derivados de Coriolus versicolor desencadenan la vía de muerte celular independiente de la caspasa en células de melanoma amelanóticas pero no en células de melanoma melanóticas.] *Phytotherapy research: PTR* 34, 173-183. <https://doi.org/10.1002/ptr.6513>
- Pięt, M., Zając, A., Paduch, R., Jaszek, M., Frant, M., Stefaniuk, D., Matuszewska, A., y Grzywnowicz, K. (2021) Chemopreventive activity of bioactive fungal fractions isolated from milk-supplemented cultures of *Cerrena unicolor* and *Pycnoporus sanguineus* on colon cancer cells [Actividad quimiopreventiva de fracciones fúngicas bioactivas aisladas de cultivos suplementados con leche de *Cerrena unicolor* y *Pycnoporus sanguineus* sobre células de cáncer de colon]. *3 Biotech* 11, 5. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02591-w>
- Plácido, A. I., Roque, F., y Morgado, M. (2022) The promising role of mushrooms as a therapeutic adjuvant of conventional cancer therapies [el prometedor papel de los hongos como adyuvante terapéutico de las terapias convencionales contra el cáncer] [Number: 1 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Biologics* 2, 58-68. <https://doi.org/10.3390/biologics2010005>
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., y Wang, J. (2022) The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy [El papel de las proteínas de la familia BCL-2 en la regulación de la apoptosis y la terapia del cáncer] [Publisher: Frontiers]. *Frontiers in Oncology* 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>

- Recillas-Targa, F. (2022) Cancer Epigenetics: An Overview [Epigenética del cáncer: una visión general]. *Archives of Medical Research*. Cancer in the 21st century: a multidisciplinary perspective 53, 732-740. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.11.003>
- Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., y Vidugiriene, J. (2004) Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells [Ensayos de citotoxicidad: métodos in vitro para medir células muertas]. En S. Markossian, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, K. Brimacombe, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, M. Lal-Nag, Z. Li, J. R. Manro, J. McGee, O. McManus, M. Pearson, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia y X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly Company; the National Center for Advancing Translational Sciences. Consultado el 25 de noviembre de 2024, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., y Niles, A. L. (2011) Cytotoxicity testing: Measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death [pruebas de citotoxicidad: Medición de células viables, células muertas y detección del mecanismo de muerte celular]. En M. J. Stoddart (Ed.), *Mammalian cell viability: Methods and protocols* (pp. 103-114). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_12
- Roca-Lema, D., Martínez-Iglesias, O., Fernández de Ana Portela, C., Rodríguez-Blanco, A., Valladares-Ayerbes, M., Díaz-Díaz, A., Casas-Pais, A., Prego, C., y Figueroa, A. (2019) In Vitro Anti-proliferative and Anti-invasive Effect of Polysaccharide-rich Extracts from *Trametes Versicolor* and *Grifola Frondosa* in Colon Cancer Cells [Efecto antiproliferativo y antiinvasivo in vitro de extractos ricos en polisacáridos de *Trametes versicolor* y *Grifola frondosa* en células de cáncer de colon]. *International Journal of Medical Sciences* 16, 231-240. <https://doi.org/10.7150/ijms.28811>
- Rúa-Giraldo, Á. L. (2023) Taxonomía de los hongos: un rompecabezas al que le faltan muchas piezas. *Biomédica* 43, 288-311. <https://doi.org/10.7705/biomedica.7052>
- Rumani, S., Letai, A., y Sarosiek, K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins [regulación de la apoptosis en la salud y la enfermedad: El equilibrio entre las proteínas de la familia BCL-2] [Publisher: Nat Rev Mol Cell Biol]. *Nature reviews. Molecular cell biology* 20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Sadia, H., Bhinder, M. A., Irshad, A., Zahid, B., Ahmed, R., Ashiq, S., Malik, K., Riaz, M., Nadeem, T., Ashiq, K., y Akbar, A. (2020) Determination of expression profile of p53 gene in different grades of breast cancer tissues by real time PCR [Determinación del perfil de expresión del gen p53 en diferentes grados de cáncer de mama mediante PCR en tiempo real]. *African Health Sciences* 20, 1273-1282. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i3.32>
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., y Lima, N. (2010) Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts [La transformada de Fourier infrarroja como técnica potente para la identificación y caracterización de hongos filamentosos y levaduras]. *Research in Microbiology*. Tribute to Jacques Monod (1910-1976) 161, 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.007>
- Segeritz, C.-P., y Vallier, L. (2017) Cell Culture [Cultivo celular]. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 151-172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Shen, S., Vagner, S., y Robert, C. (2020) Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors [Células cancerígenas persistentes: los sobrevivientes mortales] [Publisher: Elsevier]. *Cell* 183, 860-874. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.027>
- Shimu, A. S., Wei, H.-x., Li, Q., Zheng, X., y Li, B. (2023) The new progress in cancer immunotherapy [El nuevo avance en la inmunoterapia contra el cáncer]. *Clinical and Experimental Medicine* 23, 553-567. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00887-0>
- Shuel, S. L. (2022) Targeted cancer therapies [Terapias dirigidas contra el cáncer]. *Canadian Family Physician* 68, 515-518. <https://doi.org/10.46747/cfp.6807515>
- Silke, J., y Meier, P. (2013) Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins—modulators of cell death and inflammation [proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP): Moduladoras de la muerte celular

- y la inflamación] [Company: Cold Spring Harbor Laboratory Press Distributor: Cold Spring Harbor Laboratory Press Institution: Cold Spring Harbor Laboratory Press Label: Cold Spring Harbor Laboratory Press Publisher: Cold Spring Harbor Lab]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a008730. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008730>
- Smânia, A., Monache, F. D., Smânia, E. F. A., Gil, M. L., Benchetrit, L. C., y Cruz, F. S. (1995) Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. [Actividad antibacteriana de una sustancia producida por el hongo *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.] *Journal of Ethnopharmacology* 45, 177-181. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01212-I](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01212-I)
- Solé, R., y Aguadé-Gorgorió, G. (2021) The ecology of cancer differentiation therapy [La ecología de la terapia de diferenciación del cáncer]. *Journal of Theoretical Biology* 511, 110552. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2020.110552>
- Spitz, A. Z., Zacharioudakis, E., Reyna, D. E., Garner, T. P., y Gavathiotis, E. (2021) Eltrombopag directly inhibits BAX and prevents cell death [eltrombopag inhibe directamente BAX y previene la muerte celular] [Publisher: Nature Publishing Group]. *Nature Communications* 12, 1134. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21224-1>
- Standish, L. J., Wenner, C. A., Sweet, E. S., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., Novack, J., y Torkelson, C. (2008) Trametes versicolor Mushroom Immune Therapy in Breast Cancer [Terapia inmunitaria con el hongo Trametes versicolor en el cáncer de mama]. *Journal of the Society for Integrative Oncology* 6, 122-128. Consultado el 13 de octubre de 2024, desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2845472/>
- Stitzenberg, K., y Ridge, J. A. (2009, 1 de enero) Chapter 64 - What Is Cancer? [Capítulo 64 - ¿Qué es el cáncer?] En A. H. Harken y E. E. Moore (Eds.), *Abernathy's Surgical Secrets (Sixth Edition)* (pp. 323-327). Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05711-0.00064-1>
- Strober, W. (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability [Prueba de exclusión de azul tripán para la viabilidad celular]. *Current protocols in immunology* 111, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Téllez-Téllez, M. (2016) Mycosphere essay 11: Fungi of pycnoporus: Morphological and molecular identification, worldwide distribution and biotechnological potential [ensayo sobre la micosfera 11: Hongos de pycnoporus: Identificación morfológica y molecular, distribución mundial y potencial biotecnológico]. *Mycosphere* 7, 1500-1525. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/si/3b/3>
- Tetreault, M., Bareke, E., Nadaf, J., Alirezaie, N., y Majewski, J. (2015) Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities [La secuenciación del exoma completo revela redes de mutaciones somáticas recurrentes en el cáncer] [Publisher: Taylor Francis _eprint: <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1039516>]. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 15, 749-760. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1039516>
- Thiele, C. (1998) Neuroblastoma Cell Lines [Lineas celulares de neuroblastoma]. 1, 21-53. https://ccr.cancer.gov/sites/default/files/neuroblastoma_cell_lines_-_molecular_features.pdf
- Tu, S., Zhang, X.-L., Wan, H.-F., Xia, Y.-Q., Liu, Z.-Q., Yang, X.-H., y Wan, F.-S. (2018) Effect of taurine on cell proliferation and apoptosis human lung cancer A549 cells [Efecto de la taurina sobre la proliferación celular y la apoptosis de células A549 de cáncer de pulmón humano] [Publisher: Spandidos Publications]. *Oncology Letters* 15, 5473-5480. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8036>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., y Cloos, J. (2011) Cell sensitivity assays: The MTT assay [ensayos de sensibilidad celular: El ensayo MTT]. En I. A. Cree (Ed.), *Cancer cell culture: Methods and protocols* (pp. 237-245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- van Rijjt, A., Stefanek, E., y Valente, K. (2023) Preclinical testing techniques: Paving the way for new oncology screening approaches [técnicas de pruebas preclínicas: Allandando el camino para nuevos enfoques de detección oncológica] [Number: 18 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Cancers* 15, 4466. <https://doi.org/10.3390/cancers15184466>
- Venturella, G., Ferraro, V., Cirlincione, F., y Gargano, M. L. (2021) Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials [Hongos medicinales: compuestos bioactivos, usos y

- ensayos clínicos]. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 634. <https://doi.org/10.3390/ijms22020634>
- Wade, L. G., y Simek, J. W. (2017) *Química orgánica* [OCLC: 1224065991]. Pearson Education. Consultado el 10 de julio de 2021, desde http://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187ycodigo_libro=6676
- Wang, C. Q., Lim, P. Y., y Tan, A. H.-M. (2024) Gamma/delta T cells as cellular vehicles for anti-tumor immunity [Células T gamma/delta como vehículos celulares para la inmunidad antitumoral] [Publisher: Frontiers]. *Frontiers in Immunology* 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1282758>
- Weeden, C. E., Hill, W., Lim, E. L., Grönroos, E., y Swanton, C. (2023) Impact of risk factors on early cancer evolution [impacto de los factores de riesgo en la evolución temprana del cáncer]. *Cell* 186, 1541-1563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.013>
- WHO. (2018) Mechanisms of Carcinogenesis [Mecanismos de carcinogénesis]. https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/wcr_2008_5.pdf
- Wu, H.-T., Lu, F.-H., Su, Y.-C., Ou, H.-Y., Hung, H.-C., Wu, J.-S., Yang, Y.-C., y Chang, C.-J. (2014) In vivo and in vitro anti-tumor effects of fungal extracts [efectos antitumorales in vivo e in vitro de extractos fúngicos] [Number: 2 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Molecules* 19, 2546-2556. <https://doi.org/10.3390/molecules19022546>
- Wu, R., Zhao, J., Wei, P., Tang, M., Ma, Z., Zhao, Y., Du, L., y Wan, L. (2023) Piper nigrum extract inhibits the growth of human colorectal cancer HT-29 cells by inducing p53-mediated apoptosis [el extracto de piper nigrum inhibe el crecimiento de células de cáncer colorrectal humano HT-29 al inducir la apoptosis mediada por p53] [Number: 9 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute]. *Pharmaceuticals* 16, 1325. <https://doi.org/10.3390/ph16091325>
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., y Hannun, Y. A. (2016) Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development [Contribución sustancial de los factores de riesgo extrínsecos al desarrollo del cáncer]. *Nature* 529, 43-47. <https://doi.org/10.1038/nature16166>
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., y Hannun, Y. A. (2018) Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors [evaluación de factores de riesgo intrínsecos y no intrínsecos del cáncer] [Publisher: Nature Publishing Group]. *Nature Communications* 9, 3490. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>
- Wyld, L., Audisio, R. A., y Poston, G. J. (2015) The evolution of cancer surgery and future perspectives [la evolución de la cirugía del cáncer y perspectivas futuras] [Publisher: Nature Publishing Group]. *Nature Reviews Clinical Oncology* 12, 115-124. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.191>
- Xu, J., Shen, R., Jiao, Z., Chen, W., Peng, D., Wang, L., Yu, N., Peng, C., Cai, B., Song, H., Chen, F., y Liu, B. (2022) Current Advancements in Antitumor Properties and Mechanisms of Medicinal Components in Edible Mushrooms [Avances actuales en las propiedades antitumorales y los mecanismos de acción de los componentes medicinales en hongos comestibles]. *Nutrients* 14, 2622. <https://doi.org/10.3390/nu14132622>
- Yeo, D., Yun, Y. G., Shin, S.-J., Dashnyam, K., Khurelbaatar, A., Lee, J. H., y Kim, H.-W. (2024) Chaga mushroom extract suppresses oral cancer cell growth via inhibition of energy metabolism [el extracto de hongo chaga suprime el crecimiento de células cancerosas orales mediante la inhibición del metabolismo energético.] [Publisher: Nature Publishing Group]. *Scientific Reports* 14, 10616. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-61125-z>
- Yu, J., y Zhang, L. (2008) PUMA, a potent killer with or without p53 [PUMA, un potente asesino con o sin p53]. *Oncogene* 27, S71-S83. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.45>
- Zhou, L.-W., y May, T. W. (2023) Fungal taxonomy: current status and research agendas for the interdisciplinary and globalisation era [Taxonomía fúngica: estado actual y agendas de investigación para la era interdisciplinaria y de la globalización] [Publisher: Taylor Francis _eprint: <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2103194>]. *Mycology* 14, 52-59. <https://doi.org/10.1080/21501203.2022.2103194>

Ziv, E., Durack, J. C., y Solomon, S. B. (2016) The Importance of Biopsy in the Era of Molecular Medicine [La importancia de la biopsia en la era de la medicina molecular]. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 22, 418-422. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000228>

Anexo A. Evaluación de viabilidad celular

Cuadro 11: Resultados del ensayo con Azul de Tripano (TB) y MTT a diferentes tiempos y concentraciones.

Línea	Muestra	24 TB	48 TB	24 MTT	48 MTT
LAN	PS100	87.719	91.489	100	100
	PS200	92.5	89.552	63.134	54.964
	TV100	68.333	86.301	48.39	59.39
	TV200	78.889	79.412	62.986	84.583
	TM100	85	75.862	100	65.606
	TM200	91.667	72.581	100	44.492
	SC100	91.429	86.726	100	56.387
	SC200	61.905	93.75	38.605	47.585
UFH	PS100	47.651	66.225	72.631	79.309
	PS200	56.818	75.556	100	50.053
	TV100	86.957	74.419	93.927	8.38
	TV200	81.818	62.712	87.587	48.298
	TM100	44	57.303	45.729	44.867
	TM200	45.455	70.27	57.645	74.581
	SC100	52.5	58.333	100	62.188
	SC200	28.571	60	75.837	67.787
CHO	PS100	100	100	71.807	72.982
	PS200	100	100	76.613	75.412
	TV100	100	100	46.475	56.979
	TV200	100	100	85.723	65.007
	TM100	96.552	100	61.834	26.097
	TM200	100	90.909	52.361	73.37
	SC100	100	100	44.389	43.387
	SC200	100	100	52.378	63.106

Anexo B. Cuantificación de ADNc

Cuadro 12: Cuantificación de ADNc de la línea celular LAN-1

Muestra	ng/uL	260/A280	A260/A230
PS(-) 24	549.8	2.08	1.71
PS100 24	545.1	2.09	1.83
PS200 24	570.6	2.07	1.66
PS(-) 48	707.3	1.97	1.23
PS100 48	585.0	2.03	1.49
PS200 48	600.6	2.07	1.63
TV(-) 24	596.4	2.08	1.74
TV100 24	548.5	2.07	1.66
TV200 24	592.2	2.08	1.73
TV(-) 48	583.3	2.06	1.30
TV100 48	618.2	2.07	1.56
TV200 48	568.6	2.03	1.46
TM(-) 24	606.4	1.99	1.19
TM100 24	575.9	2.05	1.50
TM200 24	564.2	2.05	1.53
TM(-) 48	582.6	2.06	1.55
TM100 48	579.5	2.06	1.54
TM200 48	553.4	2.07	1.51
SC(-) 24	558.6	2.08	1.55
SC100 24	587.0	2.07	1.65
SC200 24	550.9	2.09	1.66
SC(-) 48	555.7	2.09	1.67
SC100 48	565.1	2.07	1.62
SC200 48	613.8	2.08	1.53

[H]

Cuadro 13: Cuantificación de ADNc de la línea celular UFH-001

Muestra	ng/uL	260/A280	A260/A230
PS(-) 24	690.2	1.92	1.09
PS100 24	634.2	1.96	1.05
PS200 24	623.9	1.94	1.07
PS(-) 48	635.5	1.94	1.08
PS100 48	669.9	1.89	1.01
PS200 48	670.7	1.87	0.97
TV(-) 24	584.6	1.99	1.26
TV100 24	629.7	2.00	1.24
TV200 24	621.9	1.99	1.17
TV(-) 48	599.1	2.03	1.24
TV100 48	617.2	2.02	1.35
TV200 48	580.2	2.01	1.44
TM(-) 24	592.7	2.04	1.33
TM100 24	554.4	2.03	1.41
TM200 24	632.8	2.06	1.51
TM(-) 48	587.1	2.06	1.39
TM100 48	596.4	2.06	1.60
TM200 48	586.5	2.08	1.57
SC(-) 24	555.1	2.08	1.73
SC100 24	605.9	2.10	1.80
SC200 24	565.8	2.07	1.54
SC(-) 48	648.1	2.00	1.45
SC100 48	606.2	2.11	1.73
SC200 48	559.0	2.09	1.75

Cuadro 14: Cuantificación de ADNc de la línea celular CHO

Muestra	ng/uL	260/A280	A260/A230
PS(-) 24	614.7	2.08	1.67
PS100 24	562.2	2.16	2.30
PS200 24	581.9	2.12	1.95
PS(-) 48	567.3	2.12	2.01
PS100 48	688.8	2.01	1.25
PS200 48	606.7	2.12	1.98
TV(-) 24	642.8	2.11	1.81
TV100 24	665.6	1.95	1.13
TV200 24	629.2	2.05	1.53
TV(-) 48	631.0	2.09	1.70
TV100 48	630.3	2.07	1.64
TV200 48	689.4	1.98	1.31
TM(-) 24	672.5	2.00	1.26
TM100 24	683.5	1.95	0.98
TM200 24	677.3	1.94	0.99
TM(-) 48	696.4	1.88	0.77
TM100 48	674.3	1.88	1.06
TM200 48	681.3	1.90	0.94
SC(-) 24	714.1	1.89	0.96
SC100 24	686.1	1.91	0.90
SC200 24	701.6	1.91	1.00
SC(-) 48	675.5	1.94	1.01
SC100 48	739.6	1.90	1.03
SC200 48	716.2	1.91	1.01

Anexo C. Cebadores y secuencias

Cuadro 15: Genes y secuencias de cebadores

Gen	Cebador (5' → 3')	Tamaño de amplicón (pb)	Tm (°C)	%GC
Puma	F-ACGACCTCAACGCACAGTACGA	147	64.12	54.55
	R- CCTAATTGGGCTCCATCTCGGG		62.52	59.09
Bax	F- TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	103	62.57	54.55
	R- TGTGTCCACGGCGGCAATCATC		65.91	59.09
GAPDH	F- ATGGGTGTGAACCATGAGAA	79	56.73	45
	R- GTGCTAAGCAGTTGGTGGTG		59.41	55

Anexo D. Curvas de amplificación y niveles de expresión

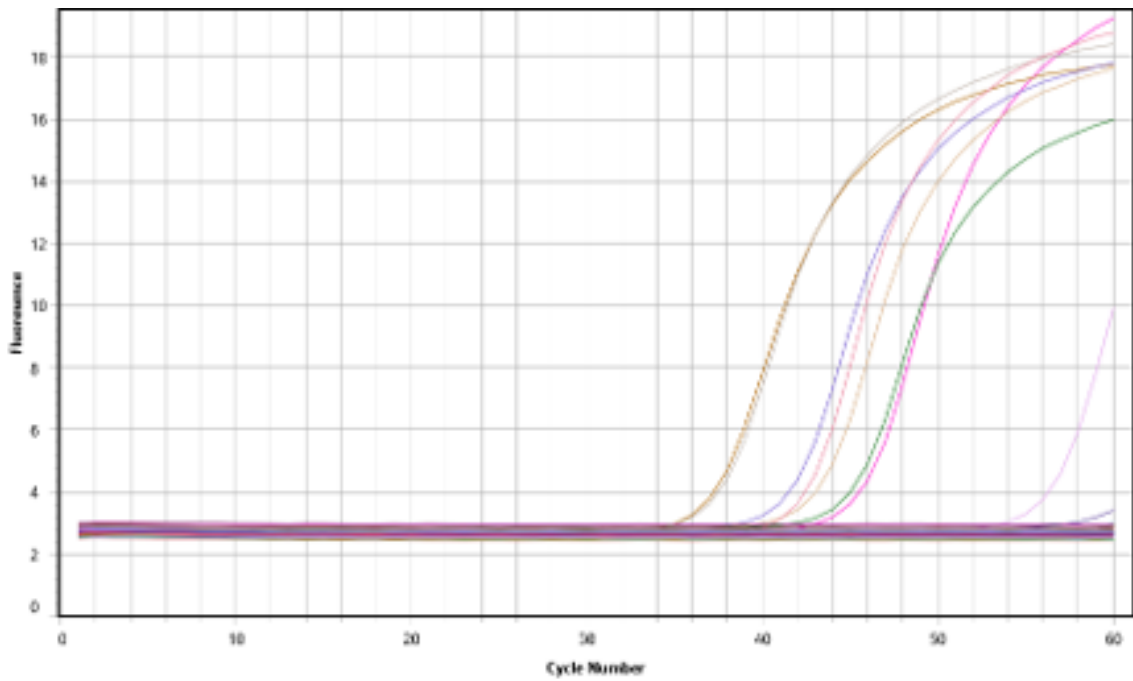


Figura 47: Curva de amplificación de *Puma*

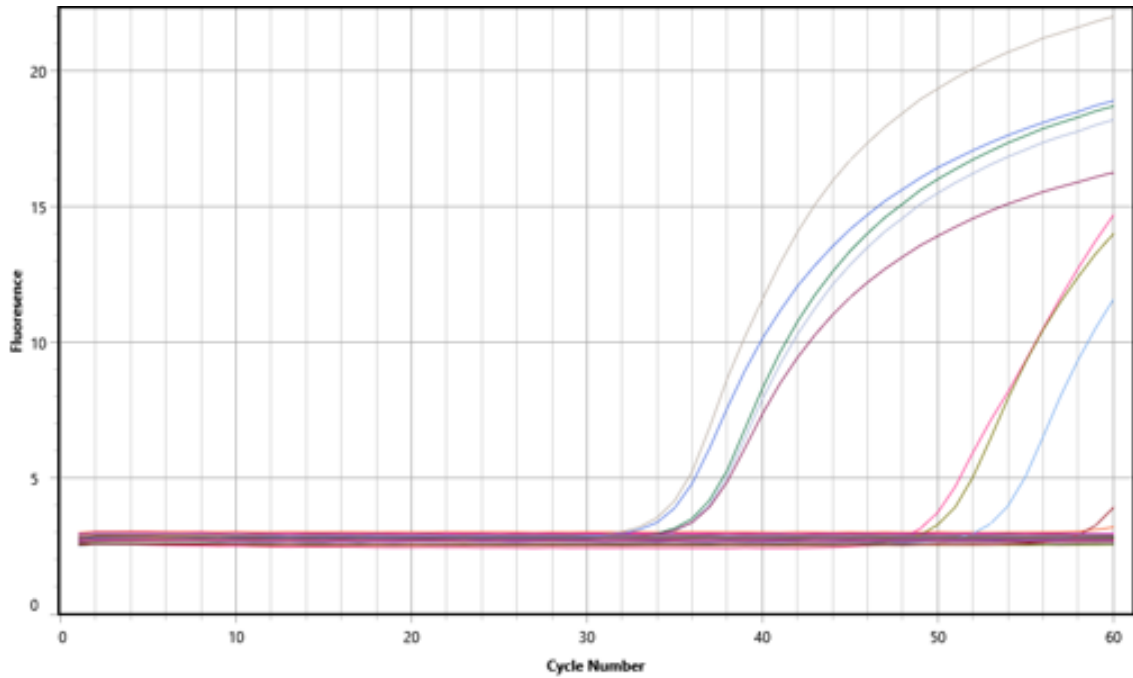


Figura 48: Curva de amplificación de *Bax*

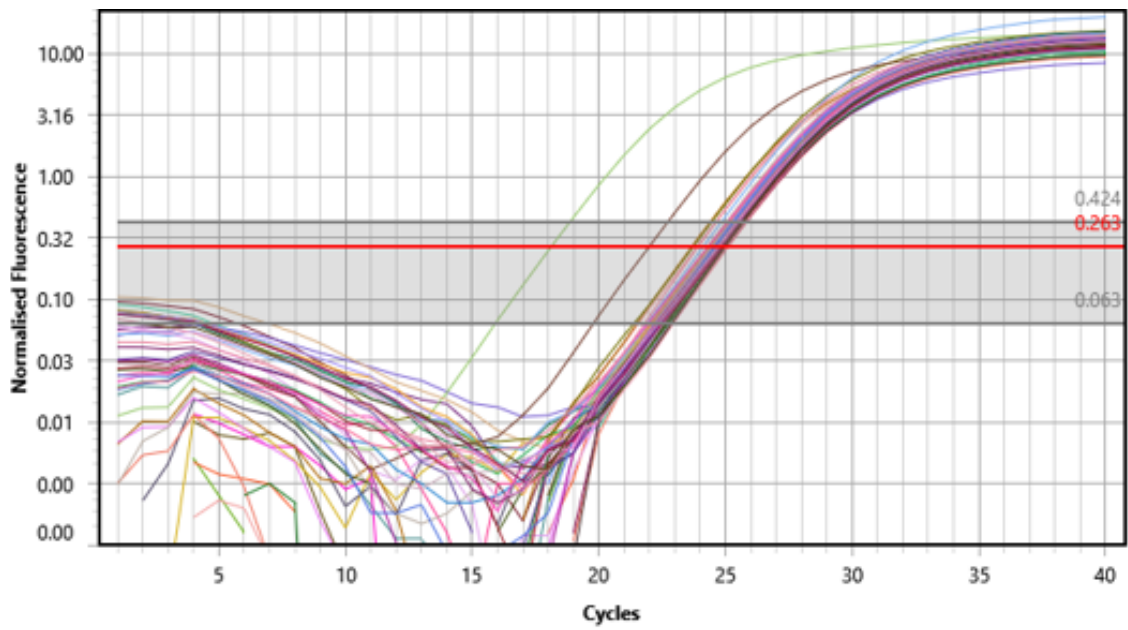


Figura 49: Curva de amplificación de *GAPDH*

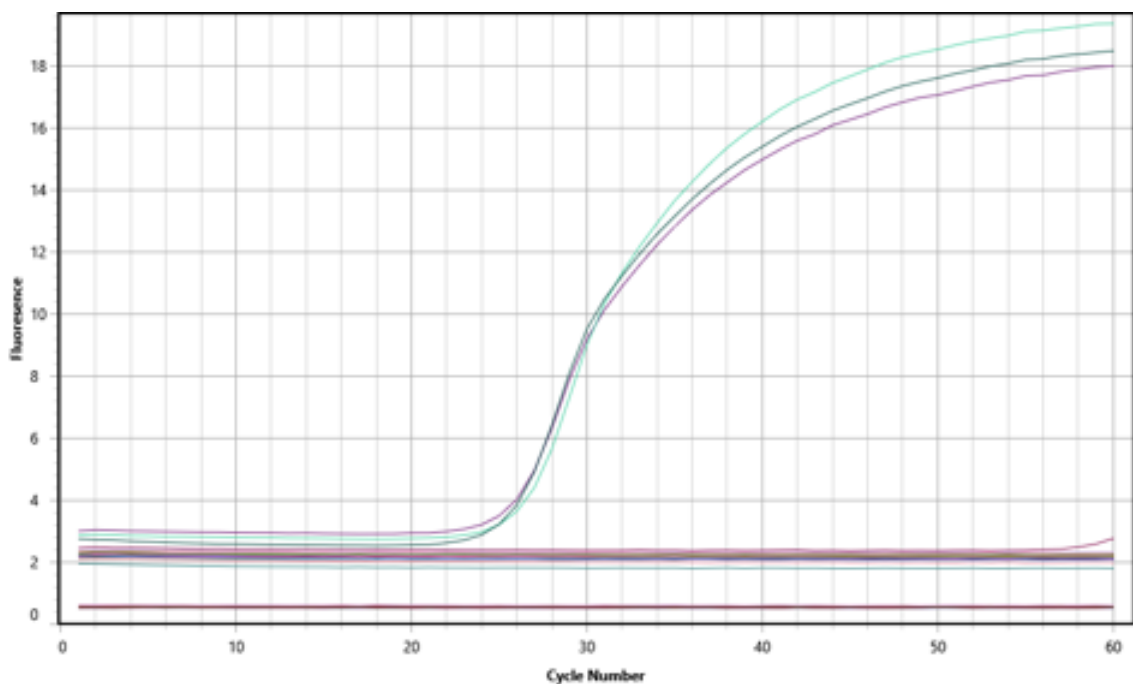


Figura 50: Curva de amplificación de los controles negativos

Cuadro 16: Niveles de expresión relativos de *Bax* y valores de Ct para diferentes muestras

Muestra	Ct	Niveles de expresión relativos
LAN TM200 48	47.078	1.62
LAN SC200 24	34.138	15377.60
LAN SC100 48	34.037	18200.71
UFH TV100 24	32.137	60294.06
UFH TM200 24	34.297	23750.99
UFH SC100 24	48.077	0.65
UFH SC200 24	51.072	0.11
CHO TM100 48	32.399	40029.90

Cuadro 17: Niveles de expresión relativos de *Puma* y valores de Ct para diferentes muestras

Muestra	Ct	Niveles de expresión relativos
LAN TV200 48	42.673	37.65
LAN SC200 48	53.569	0.03
UFH PS100 24	34.279	8782.72
UFH TV100 24	34.600	10937.82
UFH TV200 24	38.822	986.82
UFH TV200 48	40.335	224.51
UFH TM100 48	42.295	86.26
CHO TV200 48	39.404	199.38

Anexo E. Espectros IR

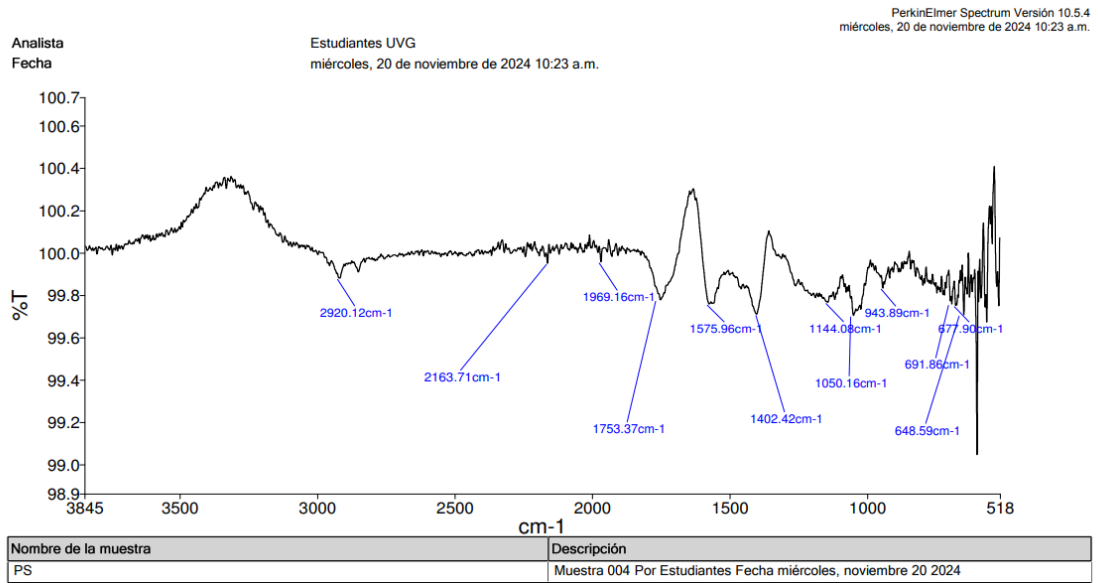


Figura 51: Espectro infrarrojo del extracto de *P. sanguineus*

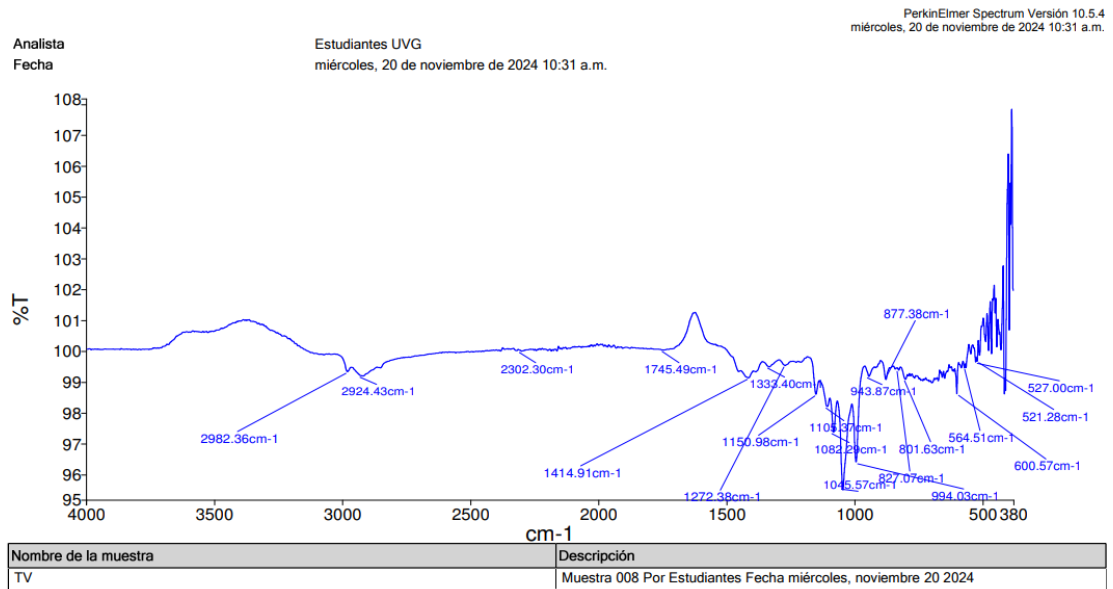


Figura 52: Espectro infrarrojo del extracto de *T. versicolor*

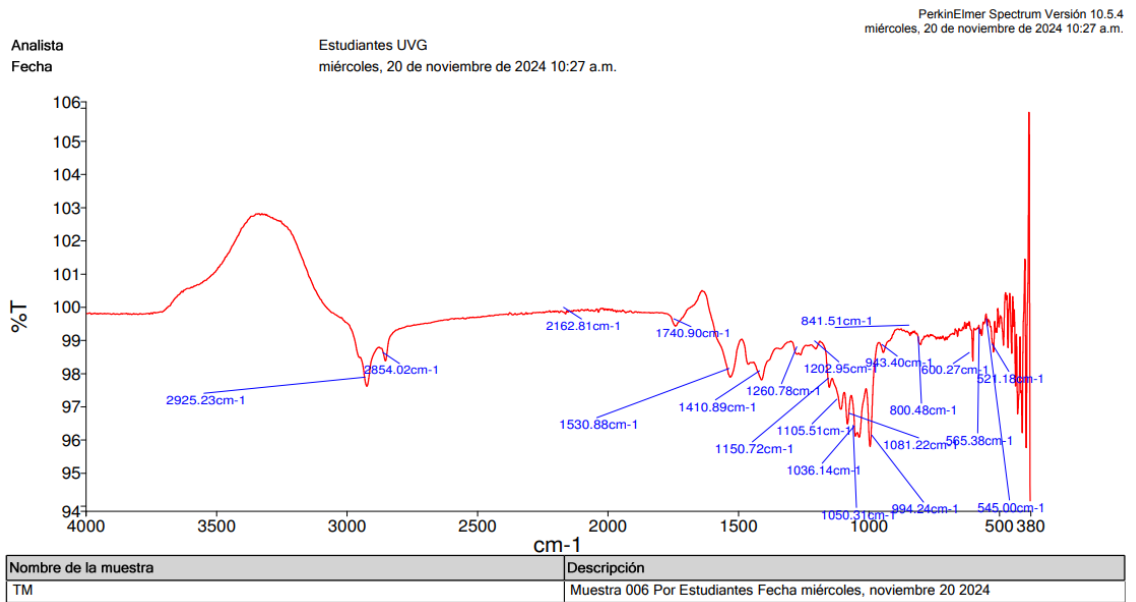


Figura 53: Espectro infrarrojo del extracto de *T. menziensis*

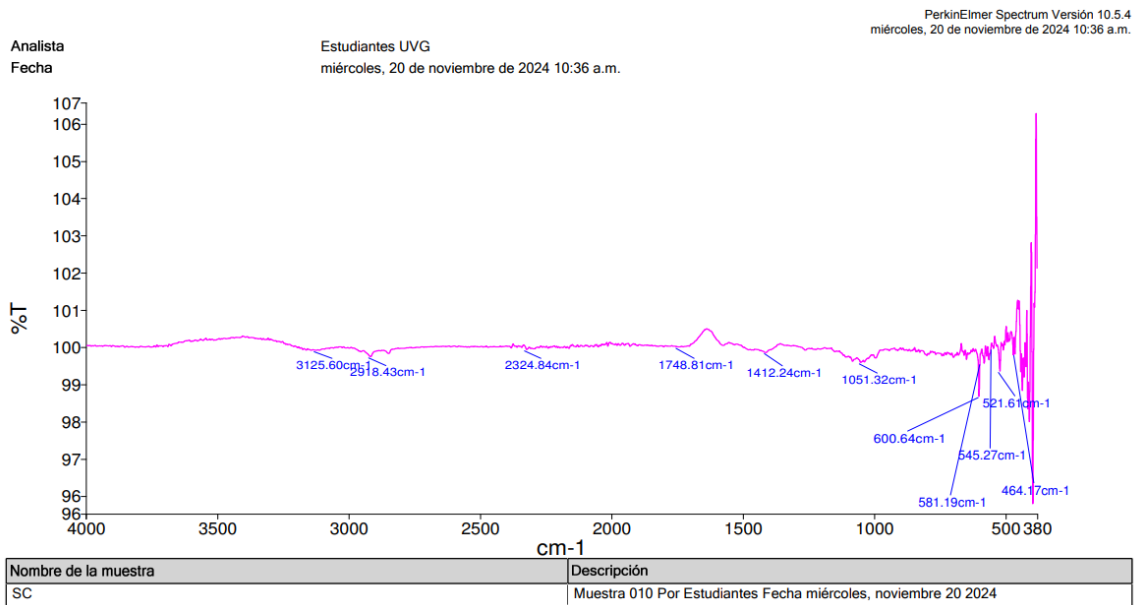


Figura 54: Espectro infrarrojo del extracto de *S. commune*

Anexo F. Mecanismos celulares propuestos del potencial antitumoral

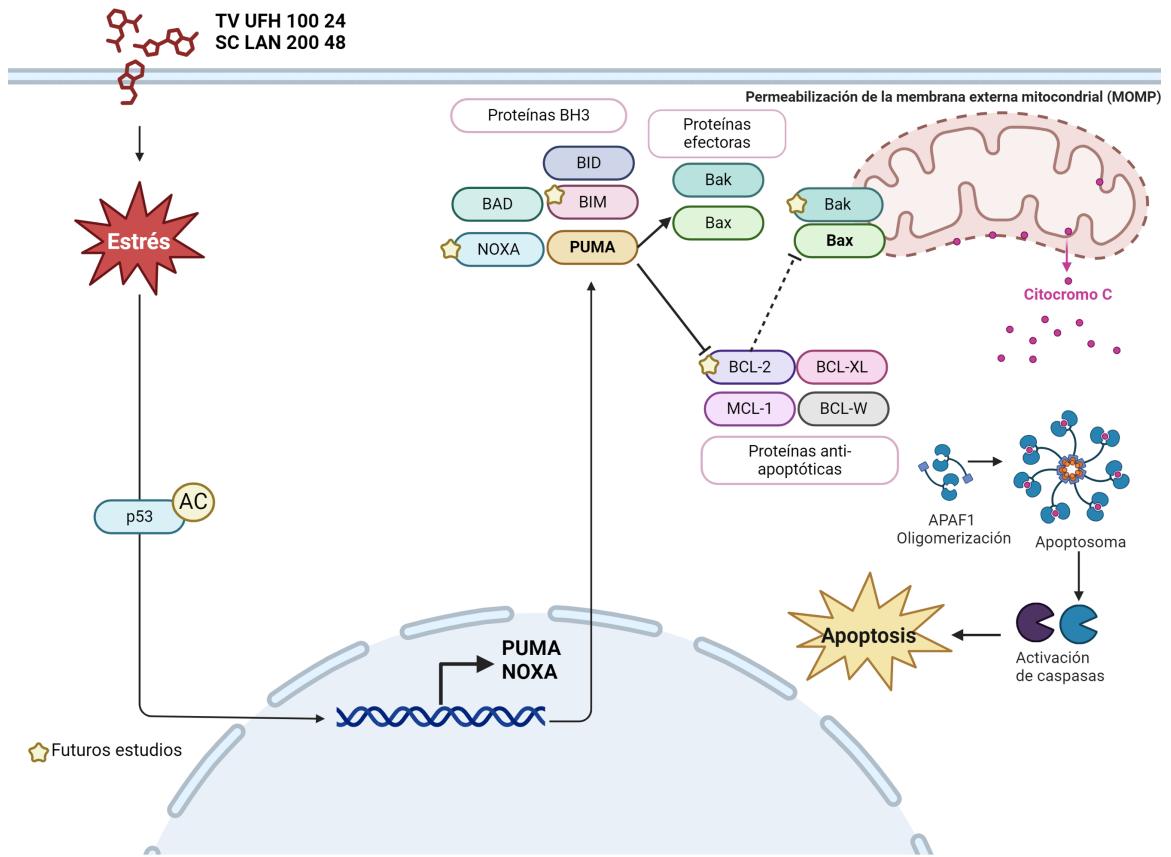


Figura 55: Mecanismo celular propuesto del potencial antitumoral a través de la activación de *Bax*

Elaborado en: BioRender

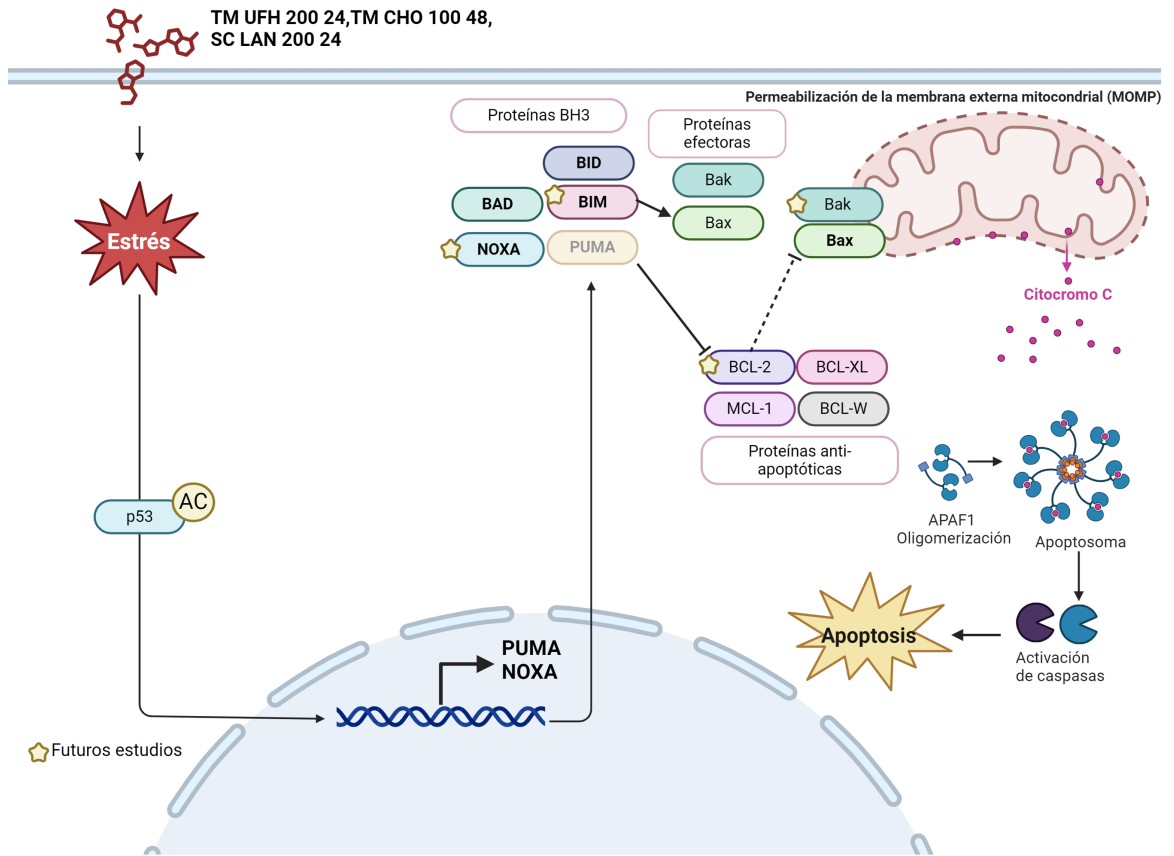


Figura 56: Mecanismo celular propuesto del potencial antitumoral a través de la activación de otro tipo de proteína BH3

Elaborado en: BioRender

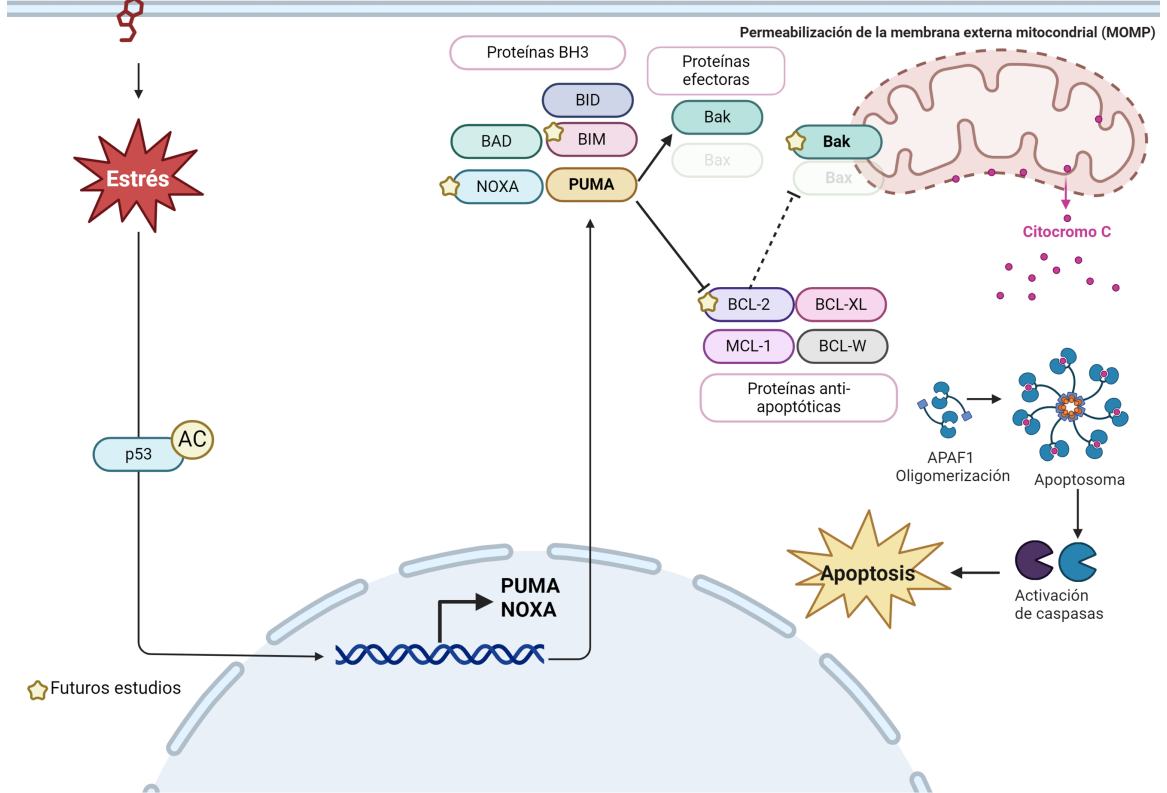


Figura 57: Mecanismo celular propuesto del potencial antitumoral a través de la activación *Bak*
Elaborado en: BioRender