



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
ZARAGOZA (UMIEZ)

LABORATORIO N°2 DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

“Efecto antitumoral del extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* en la línea tumoral de cérvix HeLa”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

GISELA GARCÍA CASILLAS

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Mi vida en estos últimos años ha tenido sabores que nunca hubiera querido probar, sin embargo encontré el sazón a mi exquisita tesis. Un trabajo que cocinaba a fuego bajo, pero cuando obtenía resultados mi emoción se disparaba. Si continúo con la metáfora, debo agradecer y dedicar a los ingredientes indispensables que coadyuvaron en mí cocinar. Primero, dedico esta tesis con todo mi amor a mis padres: Enriqueta Casillas Martínez+ y José García López por educarme, formarme, inculcar valores, y convencerme de la importancia de la educación; por estar ahí, a mi lado siempre. Gracias a ellos por darme mucho más que la vida misma. Los amo

A mis hermanos, sin orden de importancia: Miriam porque ha llenado mi vida de alegrías, por su tenacidad y por las exigencias que me solicitó sin decírmelas; a Aarón por ser noble y generoso, por ser mi punto de apoyo en cualquier circunstancia y ser mi protector; y a Lola, porque más que ser una hermana gemela, ha estado a mi lado desde el primer minuto de vida, comparte y transmite el placer de la ciencia, y juntas conocemos y experimentamos cada paso que damos en la vida misma.

Por supuesto a los amigos inteligentes, honestos y cómplices de la bendita biología (me la he pasado bomba). Gracias: Sonia, Claudia, Emilio, Edith, Casandra, Sansi, Moy, Israel, Iván y Tania (Fatta).

A mi auténtica y gran familia, que si los nombro, creo que, haría una tesis de pura dedicatoria por ello lo resumo: a los amigables García y los incondicionales Casillas.

A Oscar Vázquez por ser una motivación, por su auténtico apoyo, amor, confianza, lealtad y sobre todo por llegar y estar conmigo al pie del cañón en uno de los momentos más difíciles... por pensar distinto. Te amo.

A Yavé.

Agradecimientos

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez agradezco infinitamente por haber dirigido esta tesis, arriesgarse conmigo hasta el final y sobre todo por compartir sus enseñanzas y experiencia; por sus consejos, su perseverancia y paciencia (creo esta última la adquirió conmigo) y por abrirme la puerta a la investigación.

Al M. en C. Hugo López Muñoz por las aportaciones, su exigencia y rigurosidad para mejorar lo que hecho.

Al Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez, por su excelente aportaciones teóricas, por su entrega total y minuciosa a la investigación

A la Dra. María Luisa Escobar, por explicarme y enseñarme sus conocimientos en laboratorio.

A la Biol. Yolanda Córdova Galaviz por tiempo en sus revisiones y observaciones en mi trabajo de tesis.

A la Dra. Leonora Sánchez y Figueroa García por sus revisiones y sugerencias en mi trabajo de tesis.

Esta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto PAPIIME: PE 206812

Índice

| | |
|--------------------------------------|-------|
| Abreviaturas..... | 1-2 |
| Resumen..... | 3-4 |
| Introducción..... | 5 |
| Marco teórico..... | 6 |
| La célula..... | 6 |
| Ciclo celular..... | 6-8 |
| Control del ciclo celular..... | 9-11 |
| Muerte celular..... | 11-12 |
| Necrosis..... | 13 |
| Apoptosis..... | 14-16 |
| El cáncer..... | 17-19 |
| El cáncer cervicouterino (CaCu)..... | 19-21 |
| Tratamientos contra el CaCu..... | 21 |
| Cirugía..... | 21 |
| Radiación..... | 21-22 |
| Quimioterapia..... | 22 |
| Hormonal..... | 23 |
| <i>Lentinula edodes</i> | 24-25 |
| Planteamiento del problema..... | 26 |
| Justificación..... | 27 |
| Hipótesis..... | 28 |
| Objetivo general..... | 29 |
| Objetivos particulares..... | 29 |
| Método..... | 30-40 |
| Resultados..... | 41-53 |
| Discusión de resultados..... | 54-57 |
| Conclusiones..... | 58 |
| Referencias..... | 59-65 |
| Apéndice..... | 66-68 |

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE: acetato de etilo

CaCu: Cáncer cervicouterino

CDK: ciclinas dependientes de cinasas

CO₂: dióxido de carbono

CSFE: carboxifluoresceina

Ctrl: control

G0: de inglés Gap 0

G1: de inglés Gap 1(fase 1).

G2: de inglés gap 2 (ase 2).

h: horas

H₂O: agua

IC₅₀: concentración inhibitoria del cincuenta por ciento.

IP: Ioduro de propidio

Da: Dalton

JP: Japón

L. edodes: *Lentinula edodes*

LDH: lactato deshidrogenasa

M: mitosis

Méx: México

OMS: Organización Mundial de la Salud

S: fase de síntesis

SFB: suero fetal bovino

SNT: suero de neonato de ternera

Tdt: Terminal transferasa desoxinucleotidil

USA: Estados Unidos de América.

VPH: virus del papiloma humano

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es en el ámbito mundial, el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres, precedido por el cáncer de mama y se ubica como una de las principales causas de defunción en nuestro país. Es el responsable de más de 4,500 muertes al año. El cáncer de cérvix está relacionado en un 99 % con el virus del papiloma humano (VPH) y en particular los tipos 16 y 18 acumulan el 70 % de los casos de este cáncer. Desafortunadamente, los tratamientos actuales contra esta enfermedad son ineficientes en estados avanzados de la enfermedad y afectan tanto a células tumorales como a células normales, además de generar efectos secundarios graves. Dentro de las nuevas estrategias para la prevención y tratamiento de este tipo de enfermedad se ha contemplado el uso de extractos o compuestos vegetales orientados hacia el tratamiento del mismo. En el presente trabajo se determinó el efecto antitumoral del extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* (Shiitake), sobre la línea tumoral HeLa proveniente de cáncer cervicouterino. Al respecto, el extracto del hongo Shiitake, presenta una actividad antiproliferativa dosis dependiente, con una IC_{50} de 3.9 μ l/ml. De igual manera el extracto acuoso indujo a esta línea tumoral a un cambio morfológico destacando la compactación celular y la forma esférica, características distintivas de células apoptóticas. La prueba de detección de la enzima Lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con el extracto del hongo Shiitake, establece que el efecto citotóxico o necrótico de éste, fue bajo (10.63 %) en las células tumorales y nulo en las células no tumorales (Linfocitos humanos de sangre periférica), indicando que las células tumorales son inducidas a una muerte diferente a la necrótica. El incremento de la expresión de caspasa 3 activa así como la fragmentación de ADN determinadas por citometría de flujo y la técnica de TUNEL respectivamente, sugiere que el extracto acuoso del hongo Shiitake induce muerte por apoptosis en un 11.8 % de expresión de caspasa 3 activa y 7.9% de fragmentación del ADN en células tumorales, indicando que las células tumorales son inducidas a una muerte apoptótica. Sin embargo, los bajos valores de apoptosis y necrosis registrados en estos cultivos celulares generan la posibilidad de que el extracto induzca otro tipo de muerte diferente a los mencionados. Con respecto a la evaluación del efecto del extracto acuoso en células no tumorales (fibroblastos y linfocitos), se obtuvo que el extracto disminuyó en un 8 % el potencial proliferativo de células fibroblásticas, mientras que en células linfocíticas afectó en un 31.4 %, indicando que el extracto podría presentar una actividad inmunosupresiva. No obstante estos resultados, es conveniente probar el extracto en

más líneas tumorales de cérvix para evaluar si su efecto es generalizado o específico de la línea HeLa o si presenta alguna relación específica con el VPH. De igual manera, es necesario aislar o purificar el compuesto o compuestos responsables de la actividad antitumoral presente en dicho extracto, con la finalidad de aislar el principio activo de las actividades encontradas en el extracto del hongo Shiitake y de esa manera poder estudiar su mecanismo de acción y su posible aplicación terapéutica contra esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En el 2008 en México, la incidencia de cáncer cervicouterino fue de 10.06 en las mujeres de 15 años y más, siendo Veracruz, Coahuila y Oaxaca los estados con mayor incidencia; por su parte, las mujeres que viven en Morelos, Quintana Roo y Tabasco son las que presentan las incidencias más bajas (INEGI, 2011). La Organización Mundial de la Salud prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones. Estudios epidemiológicos han detectado como factores de riesgo: irregularidad en hacerse prueba de Papanicolaou, tabaquismo, sistema inmunológico debilitado, antecedentes sexuales, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, factores genéticos, mala alimentación, alcohol, obesidad y en un 99 % con la infección del virus del papiloma humano (Tirado et al., 2005). Por ello, resulta importante la prevención, el cáncer cervicouterino es prevenible con detección y tratamiento oportuno en estas tempranas del CaCu. Los tratamientos actualmente existentes para combatir esta enfermedad son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; desafortunadamente los últimos dos tienen efectos secundarios en la salud de las pacientes, reduciendo la calidad de vida de éstas, ocasionado por el daño realizado a las células normales. Debido a esta razón el fue interés en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral y que presenten una mayor selectividad entre células normales y células transformadas. Al respecto, el hongo *Lentinula edodes* se le atribuye un efecto antiproliferativo, actividad inductora de apoptosis en células (Gu Yu-Huan et al., 2005), así como la de inhibir la proliferación de el extracto de acetato de etilo inhibe la proliferación de células de carcinoma de mama MDA-MB-453, MCF-7 y de mieloma RPMI-8226 y IM9 (Fang et al., 2006). En este trabajo se evaluó el extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* determinando su actividad antiproliferativa, necrótica e inductora de apoptosis en células de cáncer cervicouterino, HeLa y células no tumorales con la finalidad de saber si existe un efecto selectivo.

MARCO TEÓRICO

La célula

La célula es la unidad básica fundamental y funcional de los seres vivos que tiene la capacidad de regular su medio interno, lo que le permite crecer, dividirse y morir (*Audesirk et al., 2004; Alberts et al., 2006*).

Existe una gran variedad de tamaños, perfiles y formas celulares, pero todas tienen tres estructuras en común: la membrana plasmática, la cual separa la célula del medio que le rodea así como controla la entrada y salida de sustancias, además puede detectar los cambios que se producen en exterior (*Wayne et al., 2007*); el citoplasma que es el espacio que hay entre el núcleo y la membrana, donde se encuentran los organelos citoplasmáticos y la gran mayoría de reacciones química se llevan a cabo en él y, el núcleo, el lugar donde se encuentra el ADN responsable de transmitir la información genética y regular la actividad celular, además es el lugar donde se generan los cromosomas (Figura 1).

El mecanismo que les permite replicarse y dividirse es el ciclo celular; en el cual la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares, duplica su material genético y finalmente se divide (*Alberts et al, 2006*).

Ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de eventos que permiten la generación de dos células hijas idénticas. Este proceso es importante no solo para mantener la

integridad, sino también las funciones biológicas adecuadas del organismo frente a las condiciones que le impone el ambiente (López *et al.*, 2002).

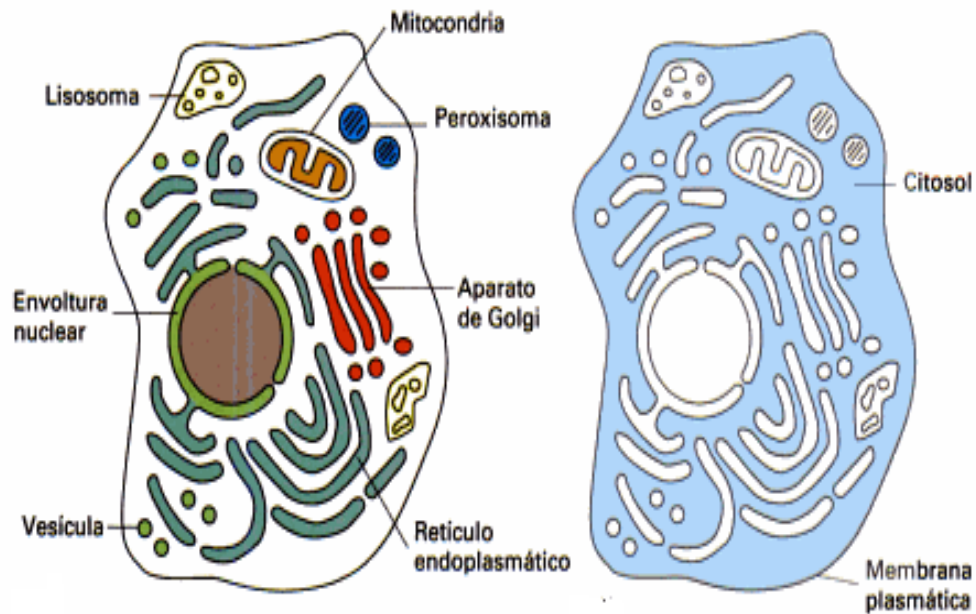


Figura 1. Célula animal donde se muestra el interior y cada uno de sus organelos (Tomada y modificada del *Alberts et al.*, 2006)

El ciclo celular se divide en dos momentos: interfase y mitosis (Figura 2).

El primer momento, la interfase, se subdivide en G₁, S y G₂. Las células que están en reposo, no se dividen se dice que están en estado de G₀ (Jones *et al.*, 2003).

La fase G₁ es variable en cuanto a tiempo, pero es donde la célula aumenta aceleradamente su tamaño. Se sintetizan ribosomas y microtúbulos a partir de las proteínas y otras moléculas que la conforman.

La fase S, tiene su característica fundamental la síntesis del nuevo material genético, para que las células hijas tengan la misma dotación.

Una vez que el ADN se ha duplicado, la célula ensambla las estructuras necesarias para la separación de las células hijas durante la división celular y la citocinesis, y esta actividad es la fase G2.

Finalizada la interfase la célula entra a la mitosis. Esta incluye dos etapas en las que primero se divide el núcleo y después el citoplasma. En síntesis la división nuclear se conoce como cariocinesis, y la división del citoplasma para producir dos células hijas se denomina citocinesis (Wayne et al., 2007).



Figura 2. Ciclo celular (tomada Devlin et al., 2004).

Control del ciclo celular.

La transición de una fase a la otra ocurre solo si se ha asegurado que la progresión se realice si los eventos de la etapa previa han concluido. El sistema de control es un dispositivo bioquímico que pueden detener el ciclo en puntos específicos (*Bucher et al., 2008*).

La célula pasa al menos tres puntos de control con la participación de proteínas reguladoras interactivas: las ciclinas, proteínas que controlan la actividad de sus proteínas dependientes de cinasas. La concentración de ciclinas varía en forma cíclica, aumentando o disminuyendo durante el transcurso del ciclo celular. Esto se debe a variaciones en la velocidad de degradación de la ciclina, dado que la velocidad de síntesis es casi constante durante todo el ciclo, y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), enzimas que mediante la fosforilación de determinadas proteínas que desencadenan los procesos subordinados del ciclo celular.

En los mamíferos se conocen cinco CDK las cuales forman tres grupos principales (Figura 3). Ambas inducen y coordinan los procesos básicos del ciclo celular, como la duplicación de ADN y la división celular (*Stephen et al., 2007*).

Existen tres puntos de control, en el ciclo celular:

- Punto de control G1, es donde se evaluará la integridad del ADN, la presencia de nutrientes en el entorno y el tamaño celular, es aquí donde generalmente actúan las señales que detienen el ciclo (*Quezada et al., 2007*).



Figura 3. Complejo activo ciclina - ciclina dependiente de cinasa (ciclina-CDK) (Tomada y modificada *Sabbatino et al., 2010*)

- Punto de control *G2- M*, relacionado con el compromiso al inicio de la mitosis ya que verifica el término de la duplicación del ADN, que no haya daño y que el entorno sea favorable de lo contrario se bloquea el inicio de la mitosis.
- Punto de control de la metafase o del huso, revisa si los cromosomas están alineados apropiadamente en el plano metafásico antes de ingresar en anafase. Este punto protege de pérdidas o ganancias de cromosomas (*Hartwell et al., 1989*).

Estos puntos de control regulan el ciclo celular facilitan la reparación ya sea en la maquinaria o en el daño del ADN si es necesario detienen el ciclo y si no es posible reparar el daño, inducen la expresión de genes que regulan la muerte celular. De tal manera que se deshacen de aquellas células que estén dañadas o que no son funcionales (Figura 4).

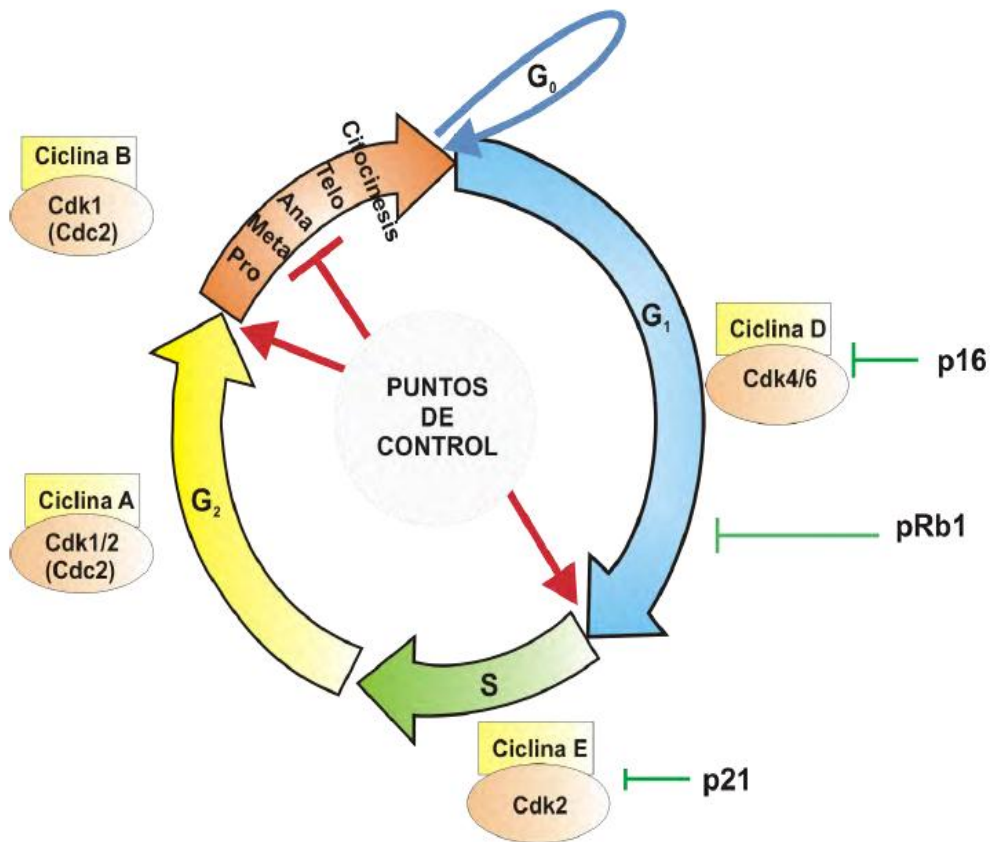


Figura 4. Regulación del ciclo celular. La activación estimuladora de los factores de crecimiento conlleva la activación dependiente de ciclinas de las fases del ciclo, mediante las CDK y sus inhibidores. CDK= cinasa dependiente de ciclina; Rb= proteína del retinoblastoma, y puntos de control del ciclo celular (tomada y modificada de *Alberts et al., 2006; Baynes et al., 2008*).

Muerte celular

Durante el desarrollo y la madurez, hay numerosas células que degeneran y mueren. La muerte celular puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes.

La muerte celular como un proceso fisiológico conduce a la eliminación celular y promueve la homeostasis de los tejidos, y como proceso patológico el cual no mantiene el equilibrio del organismo.

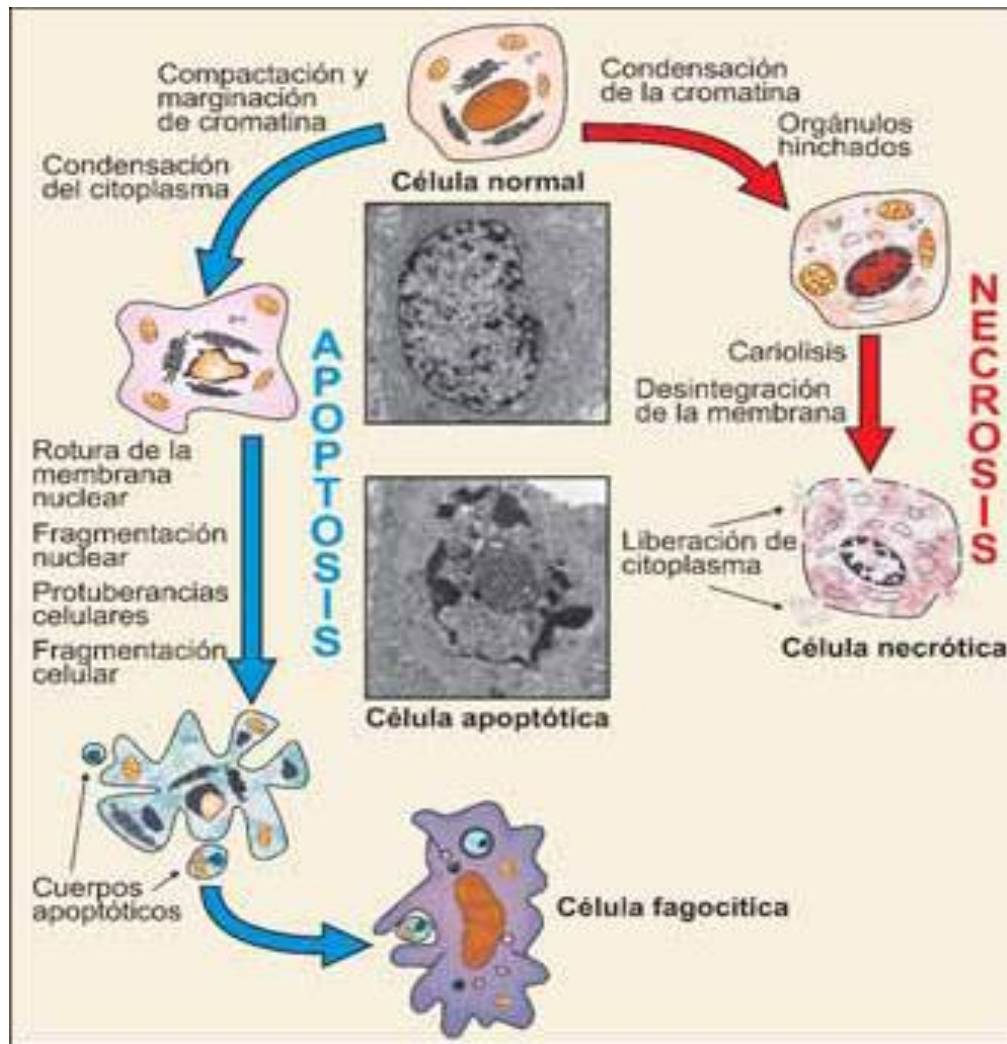


Figura 5. Esquema de apoptosis y necrosis (Imagen tomada y modificada de *Lizarbe et al., 2007*).

Existen dos tipos de muerte principalmente: necrosis y apoptosis (*Buja et al., 1993; Lizarbe et al., 2007*) entre estas hay diferentes características comparativas, (Figura 5). Se distinguen principalmente en su morfología, bioquímica y biología (*Majno et al., 1995*).

Necrosis

La necrosis es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Ocurre, generalmente por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a sustancias tóxicas condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, venenos metabólicos, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune.

Este tipo de muerte celular se califica como un proceso violento se caracteriza por que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida (*Lizarbe et al., 2007*). La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática, y permite la entrada de agua, por lo que se produce un aumento de volumen.

La cromatina nuclear forma pequeños agregados, el retículo endoplásmico y las mitocondrias se dilatan por el exceso de agua; los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Finalmente, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se disgrega y el contenido intracelular se vierte al exterior promoviendo una respuesta inflamatoria (*Dubin et al., 2000*).

Apoptosis

El término apoptosis, del griego caída de las hojas de los árboles o los pétalos de las flores, (*Kerr et al., 1972*) o muerte celular programada, es un proceso de autodestrucción celular controlada ya que permite al organismo su correcta morfogénesis, renovación y eliminación de células que amenacen su supervivencia. Esta muerte es de vital importancia, en el desarrollo embrionario, porque mueren desde blastómeros hasta neuronas y abundan en fenómenos donde hay reabsorción de algunas estructuras como por ejemplo la reabsorción de la cola en anfibios y la reabsorción de las membranas. También intervienen en los procesos de metamorfosis o en los mecanismos de renovación de algunos tejidos, como son el timo, la próstata, el intestino, el hígado, ganglios linfáticos, glándula mamaria y ovario. (*Glücksmann et al., 1995; Lockshin et al., 2001*).

Las características morfológicas de la apoptosis son: contracción atípica del volumen celular, cambios morfológicos nucleares acompañados por la contracción exagerada del volumen celular, la condensación de la cromatina nuclear, la fragmentación del ADN; la alteración de la membrana celular con aumento de la permeabilidad y el aumento de la capacidad para ligar anexina (*Kerr et al., 1972*).

La apoptosis puede ocurrir en la célula por dos vías: la extrínseca, también llamada vía del receptor de muerte y la intrínseca o mediada por la mitocondria (Figura 6). Sin embargo, ambas activan de enzimas inductoras, y efectoras (causan la muerte) llamadas caspasas.

La vía extrínseca se desencadena tras la unión de ligandos a receptores de muerte celular presentes en la superficie. Fas es uno de estos receptores (CD95) y su ligando, FasL. FasL se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formándose grupos de tres o más moléculas de Fas. El resultado de esta interacción es que los receptores se polimericen para formar sitios de unión para las proteínas adaptadoras que, a su vez, aproximan múltiples moléculas de caspasa 8 inactivas, y posteriormente activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (*Mitchell et al., 2007*). También la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C, generando con Apaf-1 el apoptosoma y activación de la vía intrínseca.

Por su parte, en la vía intrínseca o mitocondrial la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumenta y se liberan moléculas proapoptóticas al citoplasma. Bcl-2 y Bcl-x son dos proteínas antiapoptóticas. Cuando las células se ven privadas de las señales de supervivencia o sometidas a estrés, Bcl-2 y Bcl-x se pierden de la membrana mitocondrial y son sustituidos por los miembros proapoptóticos como Bak, Bax y Bim. Al disminuir los niveles de Bcl-2/Bcl-x, aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con lo que se produce una fuga de varias proteínas que pueden activar caspasas, entre las que se encuentra el citocromo c, que es liberado se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de apoptosis) y el complejo desencadena la activación de la caspasa-9, formando el llamado apoptosoma. (*Mitchell et al., 2007*).

Por lo anterior, ya sea porque la caspasa 9 o la caspasa 8 adquieren actividad proteolítica, convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, principalmente la caspasa 3, escindiendo los diferentes sustratos de muerte. En este punto la apoptosis es irreversible. Como consecuencia de la activación de la caspasa 3 se da la fragmentación del ADN, permite que la nucleasa degrade la cromatina. La formación de pequeñas vesículas llamados cuerpos apoptóticos así como la externalización de la fosfatidilserina que permite que la célula sea fagocitada (*Gupta et al., 2006*).

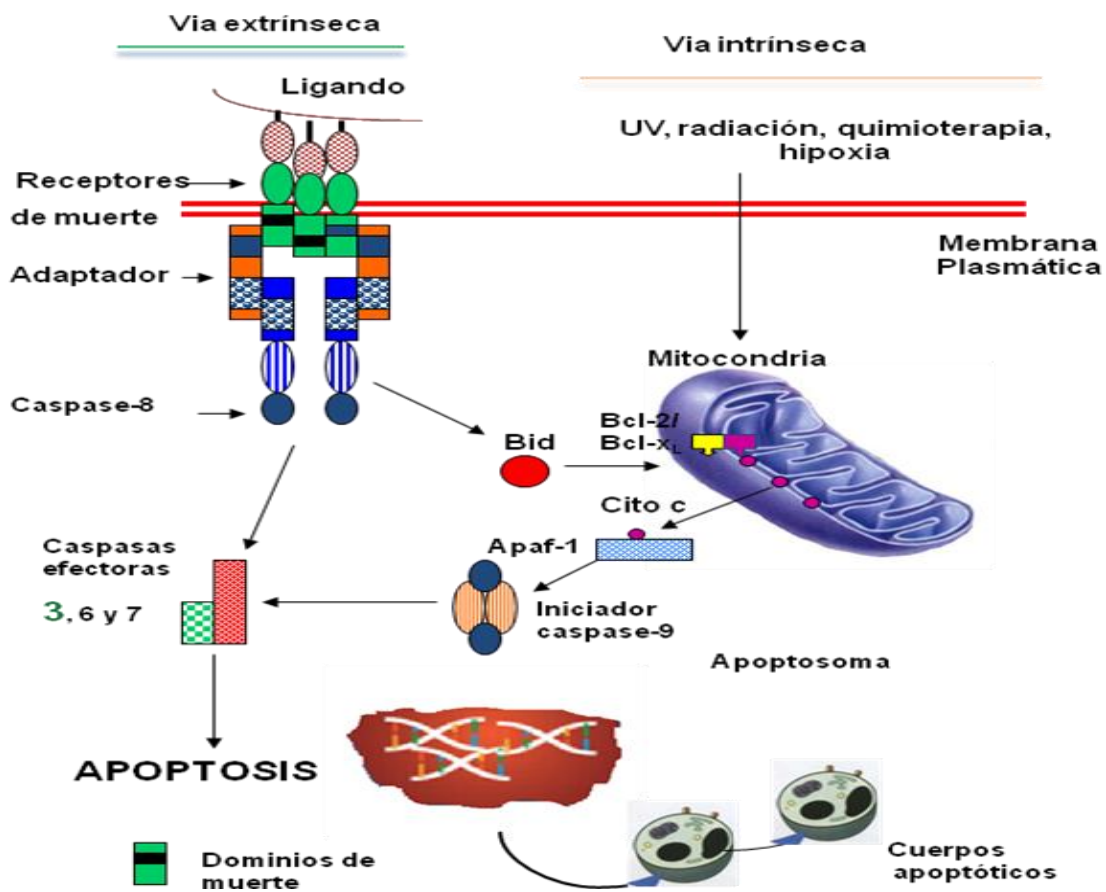


Figura 6. Vías de señalización de la apoptosis: extrínseca e intrínseca (Imagen tomada y modificada de *Gupta et al., 2006*)

Actualmente se sabe que la pérdida del control en los mecanismos que regulan la división celular o por mutaciones en el material genético de la célula, así como en la diferenciación, y la muerte celular provoca que la célula pueda dar origen a la formación de una célula cancerosa.

Cáncer

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, característico para cada especie. Ese número es resultado de la proliferación celular, la muerte y eliminación de un número igual de células redundantes. El desequilibrio de esos procesos determina efectos que pueden ser letales, sea por exceso en la destrucción celular, causa de atrofia de tejidos y órganos o por destrucción defectuosa, causa de hiperplasias o neoplasias (*Dubin et al., 2000*).

A nivel mundial el cáncer es una de las primeras causas de muerte ya que se le atribuyen 7,6 millones de defunciones ocurridas en 2008. Se estima que 30% de las muertes por cáncer se deben a factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, y consumo de tabaco y alcohol (*OMS 2011*).

Los tipos de cáncer se pueden agrupar en categorías más amplias:

-Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.

-Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.

-Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.

-Linfoma y mieloma: cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.

-Cánceres del sistema nervioso central: cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal (*National Cancer Institute, 2012*).

La transformación de una célula normal a una tumoral es un proceso que consiste en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y las tres siguientes categorías de agentes exteriores:

- carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes;
- carcinógenos químicos, como el amianto, componentes del humo de tabaco, aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y arsénico (contaminante del agua de bebida);
- carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (*OMS, 2011*).

Las alteraciones en la fisiología de las células cancerosas que determinan su comportamiento y su crecimiento son: autosuficiencia en las señales de

crecimiento, insensibilidad señales de inhibición de crecimiento, la evasión de apoptosis, el potencial de replicación sin límites, la angiogénesis sostenida, y la invasión de tejidos y metástasis. Cada una de estas capacidades de los cambios fisiológicos nuevos adquiridos durante el desarrollo del tumor representa el incumplimiento de éxito de un mecanismo de defensa contra el cáncer (*Douglas et al., 2000; Hanahan et al., 2000*).

Cáncer cervicouterino (CaCu)

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial, precedido por el cáncer de mama (*Melo et al., 2003*). En el 2008 la incidencia de CaCu en México fue de 10.06 casos por cada 100 mil mujeres de 15 años y más, las veracruzanas las que tienen la mayor incidencia (25.28), seguidas de las residentes en Coahuila (19.56) y Oaxaca (15.25). Las mujeres que viven en Morelos (2.73), Quintana Roo (2.74) y Tabasco (3.55) son las que presentan las incidencias más bajas. (*SINAVE, 2011*)

Los tumores en el cérvix pueden ser benignos o malignos, los primeros no son cancerosos, se manifiestan como verrugas genitales, pólipos, quistes. Mientras que los malignos pueden poner en peligro la vida, pueden invadir los tejidos y órganos cercanos y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo.

El cáncer cervicouterino inicia en las células de la superficie del cuello uterino. Existen dos tipos de células en dicha superficie: escamosas y columnares. La

mayoría de los cánceres de cuello uterino provienen de las células escamosas (*Alonso et al., 2005*).

Estudios epidemiológicos han detectado los siguientes factores de riesgo para el inicio y desarrollo de esta patología: irregularidad en hacerse pruebas de Papanicolaou, tabaquismo, sistema inmunitario debilitado, antecedentes sexuales, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, factor genético, factor nutricional, tener muchos hijos y en un 99% con la infección por el virus del papiloma humano, VPH (*NCI, 2009*).

Para la infección por el VPH es necesario el contacto de viriones intactos con las células inmaduras del epitelio escamoso ya sean células basales o células metaplásicas; después que el virus se introduce en el epitelio pueden ocurrir dos clases de infecciones: latentes o productivas. En las primeras el ADN viral permanece en el núcleo en su forma circular libre o episomal; el virus se mantiene en la superficie sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos identificables. Por el contrario, en la infección activa o productiva hay una intensa actividad de replicación del ADN viral, con generación de viriones, misma que se lleva principalmente en las células escamosas diferenciadas, es decir, en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso, con la producción de proteínas de cápside y síntesis de gran cantidad de ADN viral que induce cambios celulares característicos en las células infectadas (*Alonso et al., 2005*).

Hasta el momento han descrito tres grupos clínico-patológicos del VPH: cutáneo, mucoso y epidermo-displasia verruciforme. A su vez, los virus con afinidad por las mucosas se reclasifican según su riesgo de progresión del cáncer: en alto y bajo riesgo. Los VPH de alto riesgo se asocian en todo el espectro de las lesiones intraepiteliales e invasoras son capaces de iniciar el desarrollo del cáncer cérvix y ano (*Alonso et al., 2005*), también pueden transformar queratinocitos humanos en células tumorales, inducir aberraciones cromosómicas, como consecuencia del efecto de las oncoproteínas virales en el descontrol celular (*Panduro et al., 2000*). Los papilomavirus humanos de bajo riesgo infectan epitelios estratificados queratinizados con una alta especificidad y están asociados con la aparición y persistencias de neoplasias benignas y el condiloma acuminado (*Álvarez et al., 1995*). Entre los VPH de alto riesgo se incluyen (los tipos: 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58) los cuales están relacionados en mayor proporción con la presencia de cáncer cervicouterino y cáncer anal (*OMS, 2011*).

Tratamientos contra el cáncer cervicouterino

Hoy en día, existen diferentes tratamientos para la cura del cáncer de cérvix. Los más conocidos son: cirugía, radioterapia y quimioterapia, o una combinación de estos. La selección del tratamiento depende principalmente del tamaño del tumor y si el cáncer se ha diseminado.

La cirugía es una opción para las mujeres con estadio I o II, se extirpa el tejido que puede contener células cancerosas. Los efectos secundarios de la cirugía dependen de muchos factores, inclusive del tamaño y lugar del tumor,

del tipo de operación y del estado general de salud del paciente.

La radioterapia es una opción para cualquier estadio del cáncer, con una serie de radiaciones ionizantes se destruye células normales y tumorales en una región determinada del cuerpo. La radiación puede administrarse en forma externa por medio de una máquina que apunta la radiación a la zona del tumor. La radiación puede administrarse también internamente; agujas, semillas, alambres o catéteres que contienen una sustancia radioactiva se implantan cerca del cáncer. Los tratamientos de radiación no causan dolor. Los efectos secundarios son ordinariamente temporales y la mayoría pueden tratarse y controlarse. Al atravesar la célula, la radiación induce modificaciones en las moléculas presentes. Cuando el impacto tiene lugar en el ADN puede impedir la división celular, y por tanto morirá por su bloqueo de su capacidad de proliferación (*Tubiana et al., 1971*). La radioterapia puede causar la disminución del número de glóbulos blancos en la sangre, los cuales ayudan a proteger el cuerpo contra la infección, que se caiga el pelo temporalmente en la zona tratada y que la piel se ponga roja, reseca, sensible y con comezón (*National Cancer Institute, 2012*)

En el caso de la quimioterapia se suministran fármacos para destruir las células que están en división. Tanto en células cancerosas como en normales, se afecta el ADN de modo que éstas ya no pueden reproducirse (*Sen et al., 1992*).

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen principalmente de los fármacos y de la dosis que recibe el paciente. La caída del pelo es un efecto secundario común de la quimioterapia. Los fármacos anticancerosos pueden

también causar fatiga temporal, falta de apetito, náuseas y vómitos, diarrea, o llagas en la boca y labios.

La terapia hormonal se usa para tratar ciertos cánceres que dependen de hormonas para su crecimiento. La terapia hormonal impide que las células cancerosas utilicen las hormonas que necesitan para crecer. Este tratamiento puede incluir el uso de fármacos que detienen la producción de ciertas hormonas o que cambian la forma como funcionan las hormonas.

La terapia hormonal puede causar un número de efectos secundarios. Los pacientes pueden sentirse cansados o retener líquidos, subir de peso, tener bochornos o sofocos, náuseas y vómitos, cambios de apetito y, en algunos casos, coágulos de sangre. La terapia hormonal puede causar también osteoporosis en mujeres premenopáusicas. Dependiendo del tipo de terapia hormonal que se use, estos efectos secundarios pueden ser temporales, pueden durar mucho tiempo o ser permanentes (*National Cancer Institute, 2012*).

Pese a la eficiencia de estas terapias su eficacia se presenta principalmente cuando los tumores sean detectados a tiempo. Sin embargo, estas terapias resultan ineficientes en tumores avanzados o cuando los pacientes están en etapas finales de la enfermedad, por ello existe la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta patología. En este sentido, hay interés en extractos de origen vegetal con actividad antitumoral e inductora de apoptosis, como *Lentinula edodes*.

Lentinula edodes

Lentinula edodes, conocido como shiitake es uno de los hongos comestibles y medicinales utilizado durante siglos en los países asiáticos como China y Japón (Miles et al., 1997). El shiitake viene del japonés, shii (árbol) y take (hongo), el hongo que crece en árboles y únicamente se puede encontrar, de manera silvestre en Japón (Figura 7). Sin embargo se cultiva masivamente en todo el mundo, utilizando suplementos y aserrín esterilizado pues es el hongo más comestible después del champiñón a nivel mundial.



Figura 7. Hongo *Lentinula edodes*

Estudios bromatológicos han reportado que aparte de los minerales como calcio, fósforo, potasio, zinc, ácido proteicos y vitaminas del grupo B; también presenta sustancias farmacológicas para el tratamiento contra infecciones virales, bacterianas, en la inmunidad, antiinflamatorio, así como anticancerígeno (Gu Yu-Huan et al., 2005) como el lentinan el cual ya se utiliza para el tratamiento para el cáncer, eritadenin, KS-2, LEM (Ulrike et al., 2005),

Ensayos clínicos que utilizan estas setas comestibles en los diferentes tipos de cáncer reportan éxito en prolongar la supervivencia de los pacientes y/o mejorar su calidad de vida de los pacientes con cáncer avanzado (*Nanba et al., 1987*).

Se ha reportado que la administración oral del cuerpo fructífero del hongo shiitake presenta un efecto anticancerígeno *in vitro* contra algunos tipos de tumor. Ha reducido el crecimiento de células de Sarcoma 180 de ratón y carcinoma C3H y MM-46, pero presenta poco efecto en células de melanoma B-16, y en carcinoma pulmonar de Lewis o fibrosarcoma (*Fang et al., 2006*).

Los extractos reportados muestran la solubilidad con etanol y acetato de etilo (AE). El extracto de AE se ha evaluado con líneas celulares provenientes de cáncer de cérvix, CasKi, SiHa y HeLa los datos sugieren una muerte por apoptosis a una concentración de 20µg/ml (*Han et al., 2000*).

Sin embargo, se carece de información sobre extractos acuosos que induzcan un efecto antiproliferativo en líneas de CaCu así como comparar su efecto sobre células no tumorales.

Planteamiento del problema

Los tratamientos que actualmente se aplican para combatir el cáncer, resultan ser agresivos, poco selectivos e ineficientes en estadios avanzados de la enfermedad, generando la necesidad de buscar nuevas alternativas en compuestos de origen vegetal que contribuyan al tratamiento de esta enfermedad. Al respecto, existe un fuerte interés en extractos orgánicos, en particular, especies de hongos, de los cuales *Lentinula edodes* se ha reportado con actividad antiproliferativa en extracciones etanólicas. La actividad del extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* tanto en células tumorales como en células normales no es conocida por ello es necesario la investigación acerca de la actividad que posee este extracto.

Justificación

Los tratamientos existentes y las campañas de prevención no han logrado disminuir el cáncer cervicouterino siendo la segunda causa de mortalidad en mujeres con cáncer en México y el mundo, después del cáncer de mama. El INEGI reporta un total de 4,500 defunciones anuales constituyéndose en un problema de salud grave, por lo que es necesario buscar nuevas terapias o agentes terapéuticos que contribuyan al tratamiento o cura de ésta enfermedad.

Hipótesis

Se ha encontrado que extractos orgánicos de especies de hongos *Lentinula edodes* reducen la actividad tumoral en líneas de cáncer cérvix por ello se genera la posibilidad de que el extracto acuoso de *Lentinula edodes* presente actividad antitumoral en la línea tumoral de CaCu, HeLa además de ser selectivo en células no tumorales.

Objetivo

Determinar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* en la línea celular proveniente de cáncer cervicouterino, HeLa así como en células no tumorales.

Objetivos particulares:

- a. Determinar la concentración necesaria del extracto acuoso de *Lentinula edodes* para inducir un decremento del 50 % en el número celular (IC_{50}), en cultivos de la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa.
- b. Evaluar el efecto antiproliferativo del Shiitake en células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana y fibroblastos de cérvix humano.
- c. Determinar la actividad necrótica del extracto acuoso de *Lentinula edodes* en cultivos de células HeLa mediante la incorporación de Ioduro de propidio y la detección de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH).
- d. Evaluar la apoptosis de las células HeLa de CaCu inducidas por el hongo Shiitake por medio de la expresión de la caspasa 3 activa, así como la fragmentación del ADN.

Método

Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino.

Células provenientes de cáncer cervicouterino HeLa, provenientes de American Type Culture Collection, ATCC), fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grunenthal, MEX), rojo fenol y SNT (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5 %, previamente desactivado a 56 °C durante 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de esterilidad y de incubadora (Nuair, USA) a 37 °C, 5 % CO₂ y a una atmósfera, saturación húmeda. Se permitió la proliferación de los cultivos hasta una densidad del 70 % para realizar los ensayos posteriores (*Morgan et al., 1993*).

Las líneas celulares de CaCu que se utilizaron en éste trabajo son: HeLa, células derivadas de adenocarcinoma metastásico estadio IV-B, positiva al VPH 18 (*ATCC, 2012*).

Preparación del extracto acuoso *Lentinula edodes* (Shiitake).

El extracto acuoso se preparó a partir de 10 g del hongo seco *Lentinula edodes* obtenidos de la Universidad Autónoma Chapingo y determinado por el Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz del herbario de la FEZA.

El hongo fue macerado y disuelto en 100 ml de agua destilada, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se filtró en gasas; después se centrifugó a 6 000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue filtrado y liofilizado durante 24 h. En seguida, se resuspendió en 2 ml de agua destilada hasta homogenizar. Finalmente se filtró en condiciones de esterilidad en una membrana de 0.2 μm (Millipore, JP); a ese extracto se le llamó extracto completo del hongo *Lentinula edodes*. Para las pruebas biológicas este se mantuvo en refrigeración a 4 °C.

Para la obtención de la separación del extracto por peso molecular el extracto completo del hongo *Lentinula edodes* fue filtrado por una membrana de corte de 10 000 Da (Millipore, JP) durante 2 h a 6 000 rpm, resuspendidos cada 30 min. De esta manera se obtiene tres extractos del hongo: completo, mayor de 10 000 Da y menor de 10 000 Da.

Determinación de la proliferación celular a través de la técnica del colorante cristal violeta.

Para establecer la concentración del extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* a la cual se disminuye un 50 % del número celular (IC_{50}) de cultivos de la línea tumoral proveniente de CaCu, HeLa, fueron sembradas 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100 μl de medio de cultivo RPMI-1640 suplementados con 5 % de SNT, durante 24 h. Trascorrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se adicionó el extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* en RPMI-1640 fresco (5 % de SNT) en

dilución seriada desde 100 hasta 6.25 $\mu\text{l}/\text{ml}$. El ensayo control contemplo la cantidad de agua utilizada en la concentración máxima a probar, en estas condiciones se mantuvo el cultivo por 24 h más. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción de cristal violeta. Para ello primeramente se retiró el medio contenido en la placa de cultivo de 96 pozos y se procedió a agregar el fijador glutaraldehído al 1.1 % (Sigma-Aldrich, USA) el cual se mantuvo durante 15 min en el agitación. En seguida, el fijador fue retirado y la placa fue lavada un par de veces con un buffer salino de fosfatos, $\text{pH}=7.2$ (PBS) durante 5 minutos. El PBS fue retirado y la placa de cultivo se dejó secar al aire, posteriormente se agregó el colorante cristal violeta al 0.1 % en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) durante 15 min agitación (Labnet, USA). Al término de este tiempo se procedió a lavar las placas con agua desionizada, con la intención de retirar el exceso de colorante. Se dejó secar al aire y por último, se procedió a solubilizar el colorante con una solución de ácido acético (J.T. Baker, Méx) al 10 % en agitación durante 20 min., para finalmente medir la absorbancia a 590 nm en lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA). Los resultados de los grupos estimulados se compararon con respecto al control. Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se procede a elaborar una curva de porcentaje de proliferación celular contra la concentración del extracto, obteniendo la ecuación lineal y su coeficiente de correlación para poder determinar la concentración a la cual se disminuye en un 50 % la población celular de la línea HeLa.

Determinación de la naturaleza química de la actividad antiproliferativa presente en el extracto del hongo Shiitake.

Fueron sembradas 7,500 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 suplementados con 5 % de SNT, durante 24 h. Trascorrido 23 h, la IC₅₀ del extracto de shiitake se calentó a diferentes temperaturas de manera independiente durante 30 minutos, 40, 55, 60 y 90 °C además, fue combinado con una enzima péptidas, tripsina, a concentraciones de 1 %, 0.1 % y 0.01 %. A las 24 h se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se estimulo con cada condición: (1) control, (2) agua, (3) IC₅₀ Shiitake, 37 °C, (4) IC₅₀ Shiitake, 40 °C, (5) IC₅₀ Shiitake, 55 °C, (6) IC₅₀ Shiitake, 60 °C, (7) IC₅₀ Shiitake, 90 °C, (8) IC₅₀ Shiitake, 1 %tripsina, (9) IC₅₀ Shiitake, 0.1 %tripsina, (10) IC₅₀ Shiitake, 0.01 %tripsina; se mantuvo el cultivo por 24 h más. La medición de la proliferación celular se realizó con la técnica de tinción de cristal violeta.

Ensayo de citotoxicidad por medio de la incorporación de yoduro de propidio (IP) en células tumorales.

Fueron sembradas 5X10⁴ células tumorales/pozo en placas de 24 pozos en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % SNT durante 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con la IC₅₀ del extracto acuoso del hongo Shiitake con medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de SNT, como vehículo se utilizó agua a la misma concentración que el extracto y se dejaron los tratamientos durante 24

h. Una vez concluido el tiempo, las células fueron cosechadas se mantuvieron en medio de cultivo, el control fue permeado con etanol durante 20 min., después de añadieron 3 μ l de una solución de yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich, USA) (200 mg/l) a los tratamientos y las células positivas al IP fueron determinadas por citometría de flujo (marca FACSAria II) previamente calibrado con células negativas al IP y los datos obtenidos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Ensayo de necrosis por liberación de LDH en células tumorales y linfocitos no tumorales.

El ensayo necrosis se realizó sembrando 7 500 células provenientes de CaCu fueron sembradas en placa de 96 pozos (CORNING, USA) con 100 μ l de medio RPMI al 5 % SNT (Gibco, USA) por 24 h. Posteriormente se retiró el medio y se adicionó la IC₅₀ en medio fresco 5 % SNT, contemplando los siguientes controles: control basal (únicamente medio de cultivo), control negativo (células con medio y suero al 5 %), control positivo (Tritón X-100 al 1 %) y vehículo (agua) cada uno por triplicado. El cultivo se mantuvo por 24 h más, dando un tiempo total de 48 h. Posteriormente se colecto el medio de cultivo y centrifugó a 1 400 rpm (Becton Dickinson, USA) durante 5 minutos (conservando el sobrenadante). Después se transfirió 40 μ l de sobrenadante de cada uno de los controles y del tratamiento a otra placa de 96, para adicionarle 40 μ l de mezcla de reacción del kit Nonradiactive Cytotoxicity assay (250 μ l de solución catalítica y 11.25 ml de solución de marcado) a cada pozo y

se incubo durante 20 minutos, protegida de la luz a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se midió la absorbancia en el lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculo el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula: % citotoxicidad = [(muestra - control negativo)/ (control positivo - control negativo)]*100.

Detección específica de la caspasa 3 activa en cultivos celulares.

Fueron sembradas 5×10^4 células/pozo en placas de 24 pozos de las líneas de CaCu, en un volumen de 1 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT. Al paso de las 24 h las células fueron tratadas con IC_{50} de *Lentinula edodes* con medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de SNT durante 24 h y se procedió la detección de la caspasa 3 por Citometría de flujo, las células fueron cosechadas y fijadas a las 24 h de cultivo, con etanol 70 % en agua destilada durante 20 minutos, al término del tiempo se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS, pH 7.3., posteriormente se adicionó el anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa, anticuerpo producido en conejo (SIGMA) 1:250 en PBS (CPP32 Ab4; Lab Vision, USA), durante toda la noche a 4 °C, al término del tiempo, las muestras se lavaron con PBS. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo, FITC, anticuerpo de cabra anticonejo anticaspasa 3 con FITC 1:500 en PBS (Invitrogen, USA), en oscuridad durante 3 horas, se lavaron la muestra 3 veces con PBS para después ser analizadas en el citómetro de flujo (FACSAria II) y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Detección específica de fragmentos de ADN a través de la técnica de TUNEL.

Para la técnica de TUNEL se utilizó el kit ApopTag (Chemicon International, USA). Se sembraron 2×10^5 células en un volumen de 2 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT en cajas Petri de 2.50 ml. Después de 24 h se estimuló a las células con las IC_{50} de *Lentinula edodes* en medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de SNT. Al término de 24 h del cultivo, las células fueron cosechadas y fijadas con paraformaldehído al 2 % en PBS el cual fue preparado al momento. Se lavaron 3 veces con PBS y se permearon con tritón X-100 0.5 % en PBS, durante 5 minutos a 4°C. En seguida se lavaron con PBS 3 veces. Inmediatamente después se adicionó el buffer de equilibrio (20-30 μ l) en cámara húmeda durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se incubó inmediatamente por 1 hora con enzima Tdt (33 μ l de enzima Tdt más 77 μ l de buffer de reacción), en cámara húmeda. La reacción se detuvo con buffer de paro (Chemicon international, USA) (1 ml de buffer de paro en 34 ml de agua bidestilada), se agitó suavemente por 10 minutos, en cámara húmeda. Posteriormente se lavo 3 veces con PBS, 1 minuto cada lavado. Se incubó con antidigoxigenina acoplada a rodamina, 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (Chemicon international, USA) (68 μ l de solución bloqueó más 62 μ l de antidigoxigenina-rodamina). Se realizaron 3 lavados con PBS en cámara húmeda, cada uno de dos minutos. Finalmente se analizaron en el citómetro de flujo marca FACSAria II y se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Procesamiento y obtención de células fibroblásticas de cérvix humano.

Las células fibroblásticas no tumorales fueron obtenidas de una muestra de tejido del cérvix, de pacientes sometidas a histerectomía por causas diferentes a cáncer cervicouterino. Una vez que se obtuvo la pieza quirúrgica, una porción de tejido fue transportada en medio de cultivo RPMI al 20 % de suero fetal bovino (SFB) a 4 °C y fue procesada en las siguientes dos a tres horas. El procesamiento consistió en la separación por disección de la capa epitelial del tejido conjuntivo donde se encuentran los fibroblastos, ambas partes fueron cortadas por separado en trozos pequeños (1-2 mm), y sometidos a una disgregación enzimática con tripsina al 0.05 %. En seguida, se colocó los trozos de tejido en un matraz Erlen Meyer de 50 ml, con 10 ml de tripsina a 37°C en un baño con agitación durante 15 minutos. Concluido el tiempo, la mezcla se vertió a través de una malla de nylon, dejando el tejido no disgregado en la malla, la solución de tripsina se colectó en un tubo de centrífuga de 15 ml que contenía 1 ml de SFB y fue centrifugado a 2000 rpm en una centrífuga clínica. El paquete celular obtenido de la disgregación fue resuspendió en RPMI al 10 % de SFB, de tal manera que las células del paquete fueron sembradas en cajas de cultivo de 5 ml (Corning inc. USA). Por otro lado, se añadió nuevamente a la muestra de tejido remanente 10 ml de tripsina y se continuó durante 15 minutos más con agitación suave a 37 °C. La mezcla se vertió a través de una malla de nylon que permitió solo el paso de la tripsina con el material disgregado, dejando el tejido no disgregado en la malla. Las células obtenidas del disgregado fueron cultivadas en cajas de cultivo de 5 ml y se mantuvieron en una incubadora (Scientific) al 5 % de CO₂ y una atmósfera

de humedad a punto de rocío, durante 24 horas máximo, después de este tiempo de incubación, se realizó el cambio de medio, de tal manera que fueron removidas las células no adheridas, añadiéndose medio fresco suplementado con SFB al 10 %. En este momento se obtienen poblaciones fibroblásticas o epiteliales, las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo resiembras, que permitieron mantener poblaciones de un solo tipo celular. La resiembra consistió en separar las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo que se encuentra a un 70 % de saturación, con ayuda de la proteasa tripsina al 0.05 % por 1 a 3 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas por centrifugación (2000 rpm) dos veces y posteriormente fueron contadas con la ayuda de un hemocitómetro y sembradas nuevamente con la densidad celular requerida para cada ensayo (*Freshney et al., 1994., Griffiths et al., 1988*).

Proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CSFE).

En tubos vacutainer con EDTA, fueron obtenidos 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano y colocados (5 ml) en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA) que contengan 5 ml de Histopaque (un total de 4 tubos), se cubrieron con aluminio y se centrifugaron (centrífuga: Dinac, USA), inicialmente a una velocidad de 300 rpm y se fue aumentando gradualmente la velocidad (300 rpm cada 2 minutos) hasta llegar a 1500 rpm después de lo cual se dejó centrifugar por 25 minutos más. Con ayuda de la pipeta de 1000 μ l se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos, posteriormente el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a tubos limpios y se resuspendió en 10 ml de PBS (por tubo), se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 %

de SFB (el total de células quedó contenido en un solo tubo con un volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, y se incubó durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se cosecharon todas las células que permanecían en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Se tomó una alícuota de 20 ml, y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

Para marcar con carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, USA) los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10 μ l de carboxifluoresceína (12 μ M por mililitro de solución/millón de células) y se incubaron 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Se agregó en cada tubo cónico de plástico de 1.6 ml, la concentración del tratamiento a evaluar cuidando de mantener la concentración final de 1×10^6 de células/ml de medio total.

Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 5 % SFB, se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Para activarlos con fitohemaglutinina, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de plástico de 1.6 ml a una densidad de 1×10^6 de células por ml de RPMI-1640 suplementado con 20 % de SFB y 25 μ l de fitohemaglutinina/ml (Micro Lab S.A., Méx.). Para el tratamiento con *Lentinula edodes* se trataron las células con la IC_{50} . Las células contenidas en cada tubo cónicos de plástico de 1.6 ml fueron sembradas en la placa de cultivo de 96 pozos a una

concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200 μ l e incubadas hasta su evaluación. Para la evaluación, se cosecharon los linfocitos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de verseno frío por 5 min, se retiró el verseno y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 500 μ l de PBS (dos veces), y 500 μ l de paraformaldehído al 2 %, para leerse en el citómetro de flujo marca FACSAria II y finalmente se procesaron los datos en el programa FACSDiva versión 6.1.2.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se mostraron como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 3 repeticiones. A los que se les realizó análisis de varianza (ANDEVA) para comparación entre medias, se utilizó el programa SPSS 14.0 para Windows 7 seguida de la prueba de Tukey para determinar la diferencia entre pares de medias con un nivel de significancia del 0.05.

Resultados

Actividad antiproliferativa

Con la intención de establecer si el extracto acuoso proveniente del hongo Shiitake afecta el potencial proliferativo en células tumorales del cérvix, cultivos de células HeLa, fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto y la actividad antiproliferativa del hongo Shiitake fue determinada como la concentración requerida del extracto que induce un decremento del 50% en el número celular (IC_{50}) (Figura 8.).

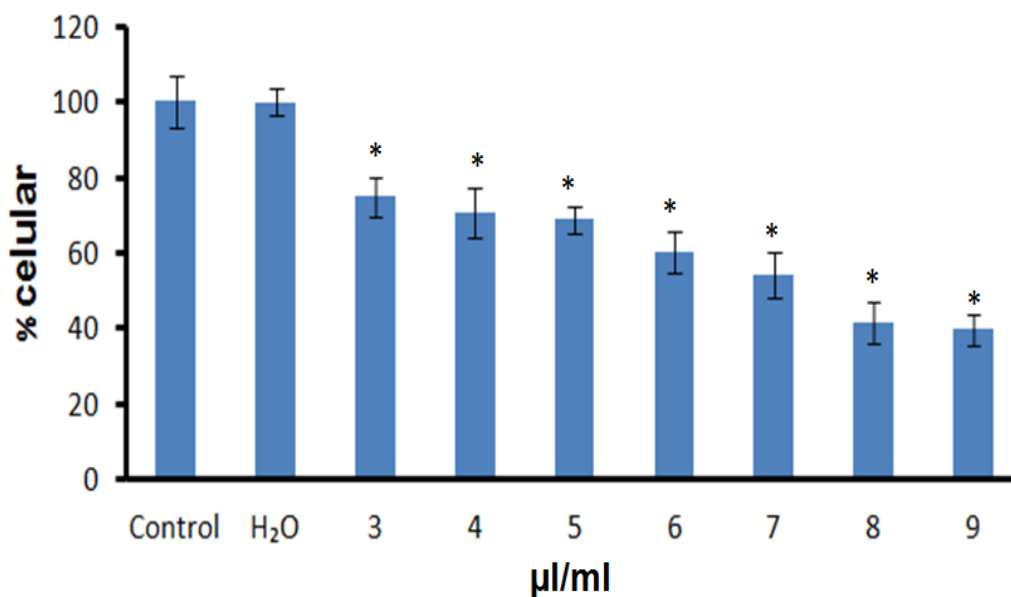


Figura 8. Efecto del extracto acuoso del hongo Shiitake sobre la proliferación de la línea celular de CaCu, HeLa. 7500 células fueron sembradas en placas de 96 pozos por 24 h para permitir su adherencia y posteriormente fueron estimuladas con diferentes concentraciones de Shiitake durante 24 h. La IC_{50} fue calculada mediante una linearización de los datos obtenidos (ver método). El gráfico representa por lo menos tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por sextuplicado. * $p < 0.05$ vs H₂O (ANDEVA).

Los resultados encontrados sugieren que el extracto acuoso del hongo *L. edodes* ejerce un efecto antiproliferativo en las células HeLa dependiente de

la concentración, esto es, conforme se incrementa la concentración de extracto la proliferación celular disminuye, obteniendo una IC_{50} de $6.4 \mu\text{l/ml}$ la cual fue calculada mediante la ecuación lineal.

Determinación de la naturaleza química de la actividad antiproliferativa presente en el extracto del hongo Shiitake.

Con la finalidad de establecer si el, o los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa presentes en el extracto es de naturaleza proteica el extracto fue fraccionado a través de una membrana de corte de $10,000 \text{ Da}$, obteniendo dos fracciones, una enriquecida con moléculas mayores a $10,000 \text{ Da}$ y otra menor a $10,000 \text{ Da}$, y ambas fracciones fueron evaluadas para su actividad antiproliferativa (Figura 9).

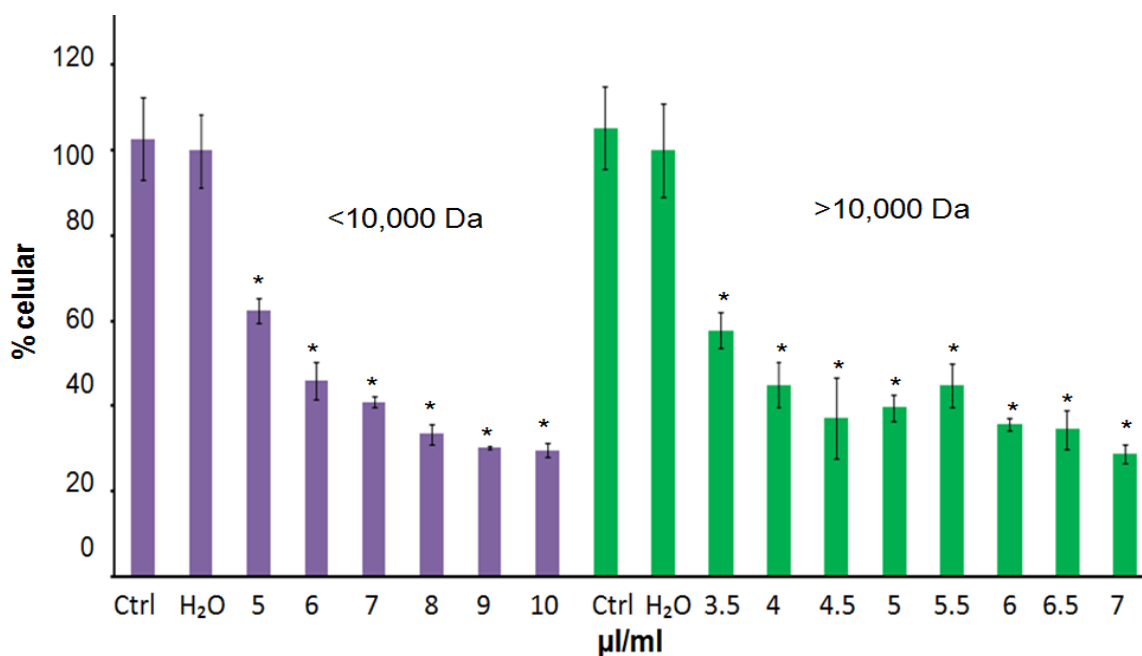


Figura 9. Efecto del extracto acuoso de las fracciones del hongo Shiitake sobre el potencial proliferativo de la línea HeLa. 7500 células fueron cultivadas en placa de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones del extracto por 24 horas. El número celular fue evaluado a través de la técnica cristal violeta. Los datos son representativos de un mínimo de tres

ensayos independientes. La gráfica representa por lo menos tres ensayos independientes.
* $p < 0.05$ vs H_2O (ANDEVA).

Los resultados mostrados en la figura 9 muestran que el efecto en la proliferación celular se mantuvo en ambas fracciones, sin embargo, la fracción mayor a 10,000 Da presentó un efecto mayor que la menor a 10,000, obteniendo una IC_{50} de $3.9 \mu\text{l/ml}$ para la fracción mayor, mientras que para la fracción menor fue de $5.5 \mu\text{l/ml}$, indicando que se requiere 1.4 veces más del extracto menor a 10,000 para realizar la misma actividad. En base a estos resultados que muestran que ambas fracciones presentan actividad antiproliferativa, se decidió continuar el trabajo únicamente con la fracción mayor a 10,000 Da. Una vez que se confirmó que ambas fracciones presentan actividad antiproliferativa y que la de mayor de 10,000 presentó una menor IC_{50} , ésta fue sometida a diferentes temperaturas y a la acción de la proteasa tripsina de manera independiente, con la intención de establecer si el o los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa son de naturaleza proteica (Figura 10).

Como se muestra en la figura 10, la actividad antiproliferativa presente en la fracción mayor de 10,000 no fue afectada ni por la temperatura ni por la acción proteolítica de la tripsina, sugiriendo que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa no son de naturaleza proteica.

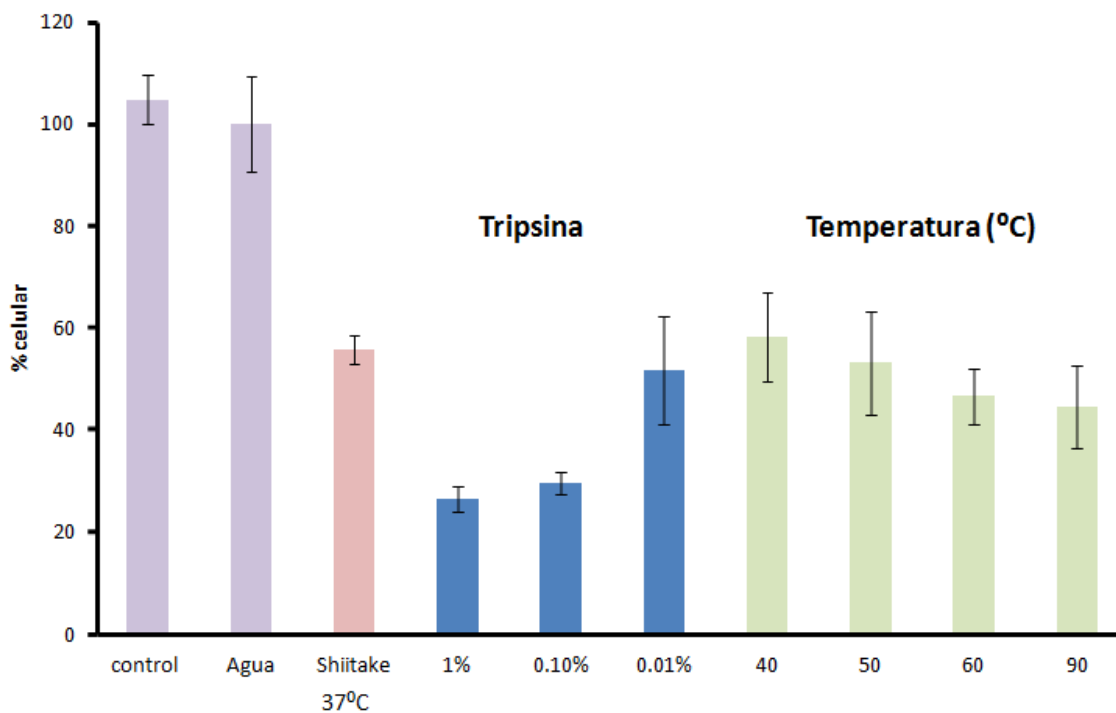


Figura 10. Efecto de la temperatura y la enzima proteolítica Tripsina sobre la actividad antiproliferativa presente en el extracto acuoso mayor de 10,000 Da del hongo Shiitake. 7500 células HeLa fueron cultivadas en placa de 96 pozos y estimuladas con la IC_{50} (3.9 μ l/ml). El número celular fue evaluado a través de la técnica cristal violeta. La gráfica representa por lo menos tres ensayos independientes. * $p < 0.05$ vs Shiitake a 37 °C (ANDEVA).

Efecto en la morfología celular

Con el fin de determinar el efecto del extracto de *L. edodes* en la morfología celular, las células de CaCu, HeLa fueron estimuladas con 3.9 μ l/ml del extracto acuoso del hongo Shiitake por 24 h y los cultivos fueron observados y fotografiados en un microscopio de campo claro con contraste de fases (Nikon, JAP).

Como se aprecia en la figura 11 el extracto acuoso de Shiitake afecta la morfología de la línea celular HeLa, induciendo en ellas una forma esférica, sin

presentar variación en el tamaño celular, sugiriendo que la fracción mayor a 10,000 Da induce en las células HeLa una pérdida de la adhesión celular.

Actividad necrótica en células tumorales.

Se sabe que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto puede ser causado por un efecto citotóxico que lleva a la célula a una muerte por necrosis. La necrosis causada por un agente tóxico puede ser evaluada mediante la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática de la célula, la cual es una característica principal de la necrosis. Sin embargo, la necrosis es un proceso gradual, que inicia con la formación de pequeños poros en dicha membrana, permitiendo la entrada de pequeñas moléculas como el Ioduro de propidio (IP) sin liberar las enzimas citoplasmáticas, y termina con el rompimiento total de la membrana plasmática, liberando las enzimas citoplasmáticas.

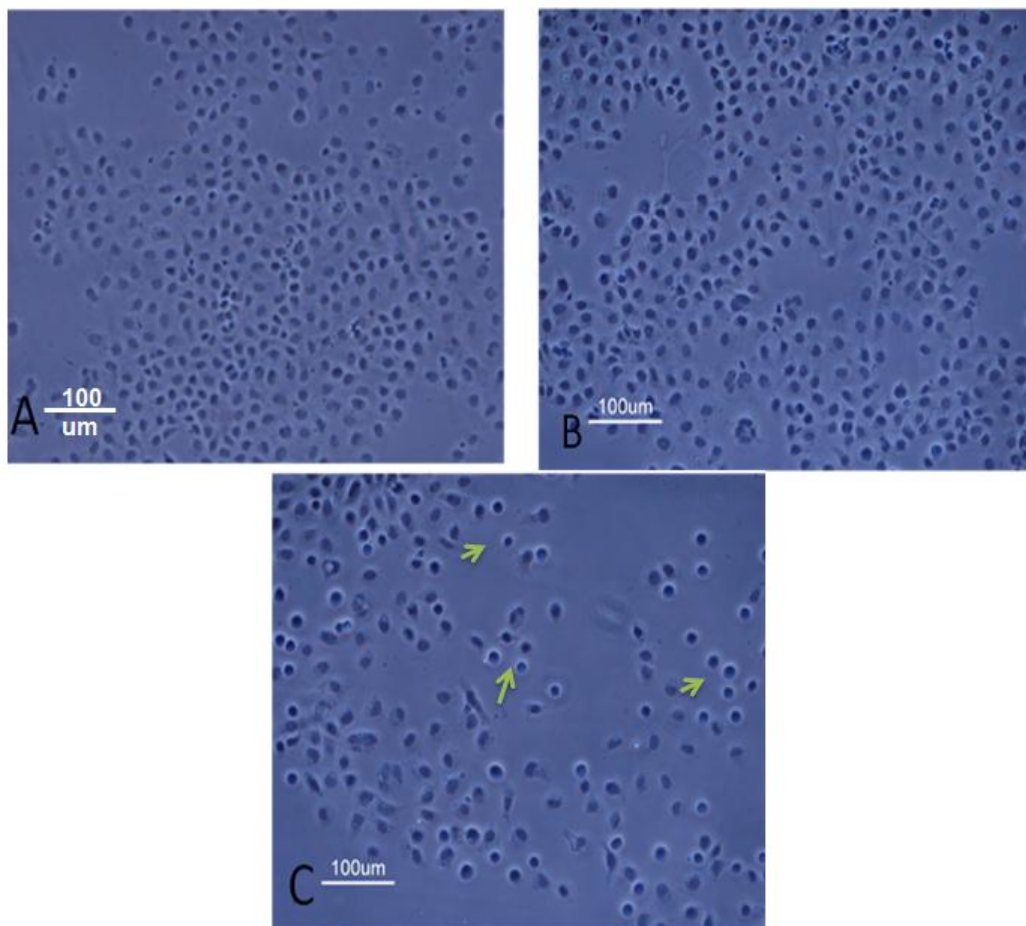


Figura 11. Efecto de La fracción mayor a 10,000 Da del hongo Shiitake en la morfología celular de la línea de CaCu HeLa. A control; B: estimulado con 3.9 $\mu\text{l/ml}$ de agua, C: células estimuladas con 3.9 $\mu\text{l/ml}$ del extracto acuoso de Shiitake.

Con el interés de evaluar si el extracto del hongo Shiitake induce una muerte necrótica en la línea de CaCu, HeLa, fueron tratadas con 3.9 $\mu\text{l/ml}$ del extracto durante 24 h. La actividad de necrosis temprana fue evaluada por la incorporación de yoduro de propidio (un agente intercalante al surco corto del ADN), mientras que la necrosis tardía fue evaluada mediante la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de

estos cultivos, mediante el kit LDH-Cytotoxicity Assay kit (Viobision; N° Cat. K311-400) (Figura 12).

Los resultados mostrados en la figura 12 establecen que el extracto acuoso del hongo Shiitake induce un mayor porcentaje de células en necrosis temprana (A) 15.5 %, mientras que en necrosis tardía (B) el porcentaje de células fue del 10.63 %, indicando que el efecto necrótico del extracto es pequeño e indica que el decremento observado en el número celular en los cultivos de las células HeLa es debido a una acción diferente a la vía necrótica.

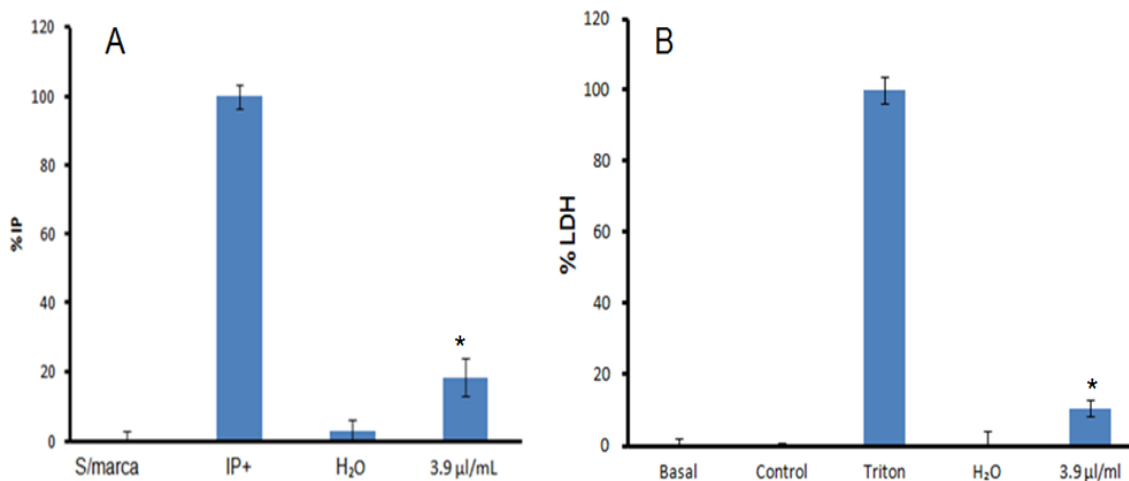


Figura 12. Efecto necrótico temprano A. Incorporación de Ioduro de propidio por células de CaCu, HeLa tratadas con el extracto de Shiitake a una concentración de 3.9 µl/ml, el H₂O se utilizó a una concentración de 3.9 µl/ml mientras que el etanol se utilizó como control positivo; B. Necrosis tardía determinada por la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos celulares se utilizó el Tritón X-100 como control positivo. Los datos mostrados muestran diferencia significativa *p<0.05 vs H₂O

Actividad necrótica en células no tumorales.

Con el propósito de evaluar si el extracto acuoso de *L. edodes* induce una muerte necrótica en células no tumorales, al respecto, cultivos de células de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica fueron tratados con 3.9 $\mu\text{l/ml}$ del extracto acuoso durante 72 h y la enzima LDH fue evaluada en los sobrenadantes como marcador de necrosis (Fig. 13).

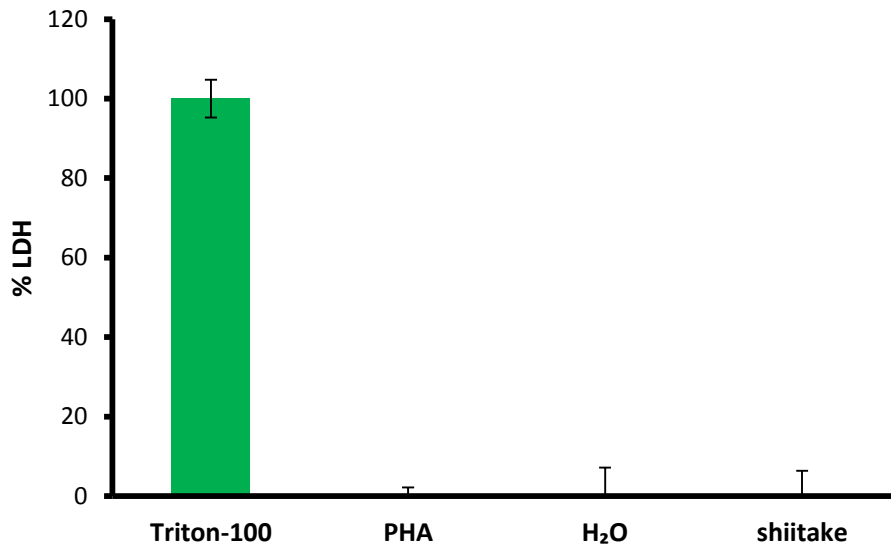


Figura 13. Determinación de la actividad de la LDH en sobrenadantes provenientes de cultivos de células linfocíticas estimuladas con el extracto acuoso a una concentración de 3.9 $\mu\text{l/ml}$, el H₂O se utilizó a la misma concentración, mientras que la Fitohemaglutinina se utilizó para activar la proliferación de los linfocitos. Se realizó un análisis ANDEVA y no se encontró una diferencia significativa entre activados con el H₂O y el extracto acuoso con una * $p < 0.05$.

Como se muestra en la figura 13, no se observa actividad de la LDH en los cultivos de células linfocíticas tratados con el extracto acuoso del hongo Shiitake, sugiriendo que el extracto no ejerce una acción necrótica sobre células no tumorales.

Detección de caspasa-3 activa y fragmentación de ADN como parámetros de evaluación de una muerte apoptótica.

Los resultados mostrados en la figura 12 indican que el extracto inducen solo un 10 % de muerte necrótica, sugiriendo otro tipo de muerte celular por ello es importante evaluar si *L. edodes* induce a una muerte por apoptosis en células tumorales mediante la activación de caspasas efectoras como la caspasa 3 activa y de igual manera evaluar la fragmentación de ADN como evento concluyente de este tipo de muerte. Al respecto, cultivos de células de CaCu, HeLa fueron estimuladas con 3.9 μ l/ml de extracto acuoso del hongo shiitake y la población celular positiva a caspasa 3 activa fue cuantificada por citometría de flujo (Figura 14) y la fragmentación de ADN fue detectada mediante la técnica de TUNEL y cuantificada por citometría de flujo (Figura 15).

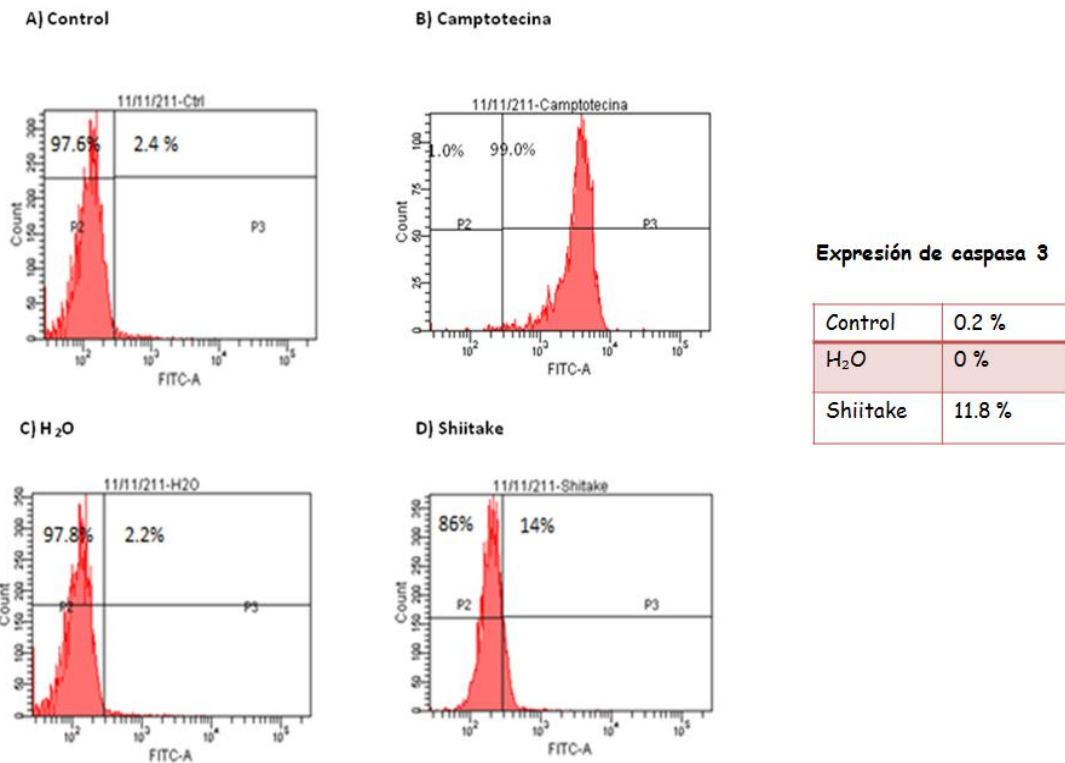


Figura 14. Determinación de la expresión de la caspasa 3 activa en cultivos de células HeLa. 250,000 células HeLa fueron sembradas en cajas petri de cristal de 100 mm de diámetro y tratadas con 3.9 μ l/ml de extracto del hongo Shiitake. Posteriormente la detección de la caspasa 3 activa fue evaluada por citometría de flujo. P2: células que no expresan caspasa 3; P3: células que expresan caspas 3. A: control, C: cultivos de células HeLa tratadas con camptotecina como un control positivo (2 μ l/ml), D: cultivos de células HeLa tratadas con H₂O (3.9 μ l/ml) y E: cultivos de células HeLa tratadas con 3.9 μ l/ml de extracto del hongo Shiitake. Los datos son representativos de un solo ensayo de tres ensayos independientes.

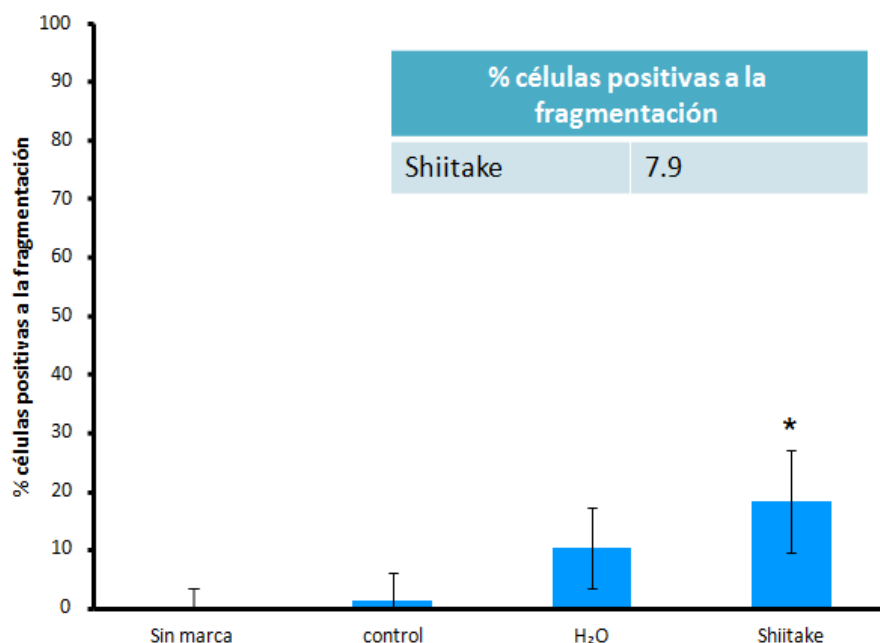


Figura 15. Determinación de la fragmentación del ADN en cultivos de células HeLa. 250, 000 células HeLa fueron sembradas en cajas petri de cristal de 100 mm de diámetro y tratadas con 3.9 $\mu\text{l/ml}$ de extracto del hongo Shiitake. Posteriormente la fragmentación del ADN fue evaluada por citometría de flujo. Control: cultivos de células HeLa en cultivo normal; Camptotecina: cultivos de células HeLa tratadas con camptotecina como un control positivo (2 $\mu\text{l/ml}$); Agua: cultivos de células HeLa tratadas con H₂O (3.9 $\mu\text{l/ml}$); Shiitake: cultivos de células HeLa tratadas con 3.9 $\mu\text{l/mL}$ de extracto del hongo Shiitake. Los datos mostrados muestran diferencia significativa * $p < 0.05$ vs H₂O

Los resultados mostrados en la figura 14 y 15 establecen que el extracto acuoso del hongo Shiitake induce un 11.8 % en la expresión caspasa 3 activa y un 7.9 % fragmentación de ADN, indicando que este extracto induce apoptosis.

Efecto antiproliferativo en células no tumorales

Con el propósito de establecer si el extracto del hongo Shiitake afecta el potencial proliferativo de células no tumorales de la misma manera que lo hace en células tumorales, cultivos de fibroblastos provenientes de cérvix humano, así como de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana, fueron estimuladas con $3.9\mu\text{l}/\text{ml}$ de extracto y el número celular fue evaluado por la técnica de cristal violeta e incorporación de carboxifluoresceína respectivamente (Figura 16 y 17).

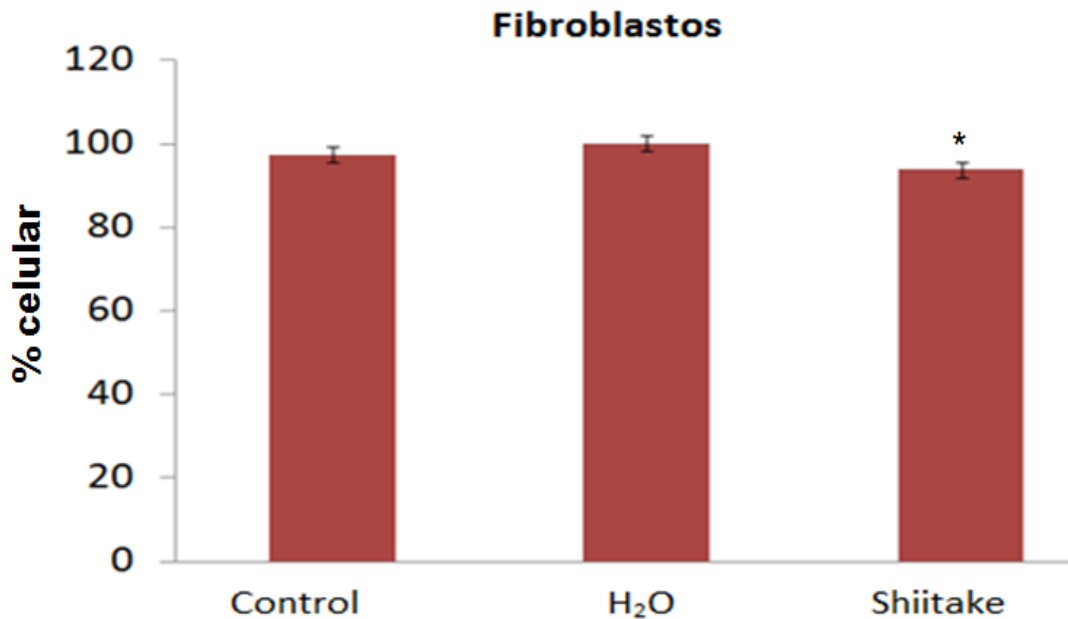


Figura 16. Efecto del extracto del hongo Shiitake sobre el potencial proliferativo de células fibroblásticas no tumorales, provenientes de cérvix humano. 7500 células fibroblásticas fueron sembradas en placa de cultivo de 96 pozos en RPMI al 10 % de SFB y tratadas con el extracto por 24 h. El número celular fue evaluado a través de la técnica de cristal violeta. Control, Agua y $3.9\mu\text{l}/\text{ml}$ de Shiitake. Los datos mostrados muestran diferencia significativa * $p < 0.05$ vs H₂O

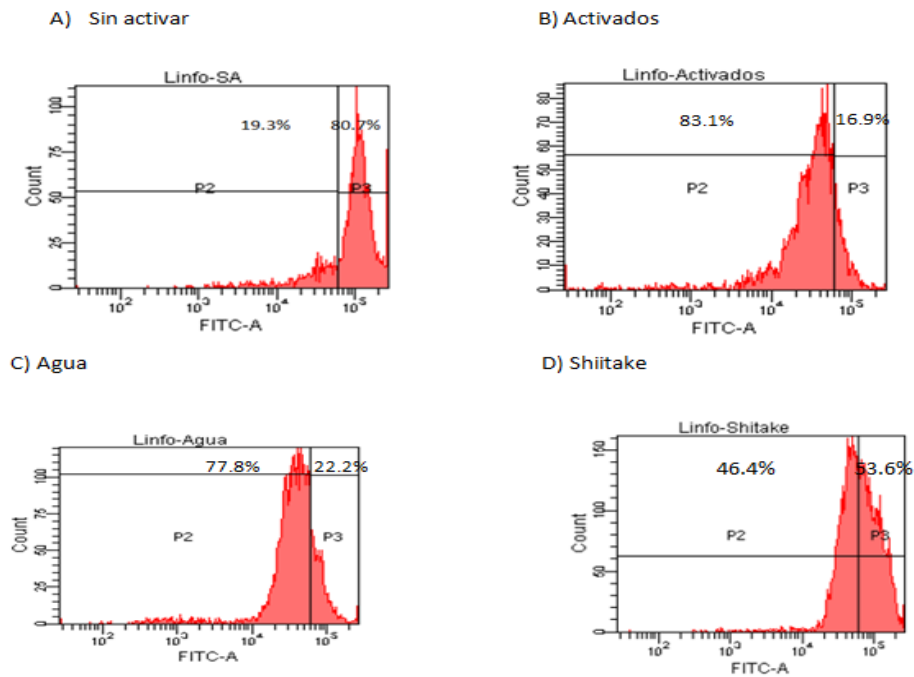


Figura 17. Efecto del hongo Shiitake en la proliferación de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica humana fueron marcados con carboxifluoresceína y tratados con el extracto del hongo Shiitake y el potencial proliferativo fue evaluado por citometría de flujo a las 72 h. P2: Región de células proliferantes. P3: Región de células no proliferantes. A) Linfocitos sin activar: Linfo.SA; B) Linfocitos activados: Linfo-activados; C) Linfocitos con Agua 3.9 $\mu\text{L}/\text{mL}$: Linfo-Agua; D) Linfocitos con estímulo de Shiitake 3.9 $\mu\text{L}/\text{mL}$: Linfo-Shiitake.

Los resultados obtenidos en las figuras 16 y 17 muestran que el extracto del hongo Shiitake afectó el potencial proliferativo de las células fibroblásticas en un 8 % a la concentración de 3.9 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sin embargo, el potencial proliferativo de las células linfocíticas fue afectado en un 31.4%, indicando que las células linfocíticas son más sensibles al efecto del extracto que las células fibroblásticas.

Discusión

En los últimos años, los extractos de hongos han sido un importante remedio para la prevención y tratamiento para combatir el cáncer, principalmente en el Oriente (*Israilides et al., 2008; Kidd et al., 2000*). La propiedad antitumoral de éstos se presenta en muchas especies comestibles, tales como el Shiitake (*Lentinula edodes o Lentinus edodes*), Maitake (*Grifola frondosa*), Turquía cola (*Coriolus versicolor*), Reishi (*Ganoderma lucidum*), y el León melena (*Hericium erinaceus*). Sin embargo, el hongo Shiitake es diez veces más potente que los otros (*Gu Yu-Huan et al., 2005*).

Se ha reportado que el extracto etanólico del hongo Shiitake inhibe la proliferación de células de carcinoma de piel CH72 en un 50 % a una concentración de 4 μ l/ml, determinado por exclusión del azul tripano y Assay CellTiter 96 Aqueous (*Gu Yu-Huan et al., 2005*). Sin embargo, la actividad antiproliferativa reportada para el micelio cultivado del hongo Shiitake fue mas potente, se ha descrito que el extracto obtenido con acetato de etilo inhibe la proliferación en un 60-80 % con una concentración menor para carcinoma CaSKi, SiHa, HP-1, y en melanoma maligno A375 (2 μ g/ml), en comparación a la de las células HeLa y 3T3 (4 μ g/ml). Por otro lado, el extracto de acetato de etilo inhibe la proliferación de células de carcinoma de mama MDA-MB-453, MCF-7 y de mieloma RPMI-8226 y IM9 en un 50 % a concentraciones de 289 \pm 108, 179 \pm 34, 444 \pm 40 y 477 \pm 88 mg/l respectivamente (*Fang et al., 2006*). En el caso del extracto acuoso del hongo Shiitake, nuestros resultados establecen que este extracto afecta el potencial proliferativo de las células de cáncer cervicouterino HeLa, con una IC₅₀ de 3.9 μ l/ml, dato que contrasta con lo reportado por Bingye, 2000 quién establece que el extracto

acuoso de este hongo presenta una pobre actividad antiproliferativa (20 $\mu\text{g/ml}$ sólo afecta el crecimiento celular en un 5% determinado por MTT).

Con respecto a la naturaleza química de las moléculas responsables de la actividad antiproliferativa reportada para este hongo, se ha descrito que el hongo shiitake es la fuente de polisacáridos responsables de efectos farmacológicos como la actividad antitumoral. Por ejemplo, el lentinan, LEM y KS-2 se obtienen de acuerdo al tipo de extracción. Lentinan tiene un peso molecular aproximado de 500.000 Da y se obtiene de una extracción metanol-agua (1:2) (Aoki *et al.*, 1984), mientras que el LEM se obtiene de un extracto micelial, es un conjugado heteroglicano-proteína que contiene 24,6 % de proteína y azúcares 44 %, que comprende principalmente de pentosas, así como de glucosa y pequeñas cantidades de galactosa, manosa y fructosa (Lizuka *et al.*, 1986; Sugano *et al.*, 1982). También contiene derivados de ácidos nucleicos, vitaminas del complejo B, ergosterol, eritadenina (Sugano *et al.*, 1986). KS-2 es un complejo péptido-polisacárido que además de su actividad antitumoral, ha demostrado aumentar la resistencia del huésped a las infecciones bacterianas y virales (Jong *et al.*, 1993). Con respecto a la naturaleza química de la o las moléculas responsables de la actividad antiproliferativa presentes en el extracto acuoso del hongo Shiitake, nuestros resultados establecen que dicha actividad no se ve afectada por la temperatura (37-95 °C) ni por la acción proteolítica de la enzima tripsina, indicando que la o las moléculas responsables de esta actividad no son de naturaleza proteica. Sería conveniente en un futuro cercano, aislar o purificar el compuesto o los compuestos responsables de esta actividad con la finalidad de identificar al o los responsables (Principio activo).

Se ha reportado que el extracto del hongo Shiitake presenta un pequeño efecto inductor de caspasa 3 activa en células HeLa sin inducir fragmentación del ADN (*Bingye et al., 2000*). Sin embargo, en las células CH72 se observó una acumulación gradual de fragmentos de ADN después de 10 h. determinado por geles de agarosa al 2 %, indicando un pequeño o nulo efecto inductor de apoptosis. Sin embargo, Gu Yu-Huan, reportó que el efecto apoptótico y necróticos fueron inducidos por una serie de dosis de Shiitake en las células CH72, medido por microscopia de fluorescencia con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio; observando un efecto moderado sobre los dos índices de apoptosis y necrosis en comparación con el control del vehículo a las 24 h de exposición. En otro estudio, una fracción de acetato de etilo del hongo shiitake utilizando dos líneas celulares de carcinoma de mama humano (MDA-MB-453 y MCF-7) y una línea celular epitelial de mama no maligno (MCF-10F), así como dos líneas celulares de mieloma (RPMI-8226 y MI-9), obtuvieron que aproximadamente 50 mg/l inducen la inhibición del crecimiento de células tumorales por consecuencia de la inducción de la apoptosis en las cuatro líneas celulares tumorales humanas mediado por la proteína proapoptótica Bax (*Feng et al., 2006*). No obstante estos resultados, en nuestro trabajo se encontró una muerte por apoptosis en un 11.8 % en la expresión de caspasa 3 activa y un 7.9 en la fragmentación del ADN en los cultivos de células HeLa, mientras que la liberación de la LDH al medio y la incorporación del Ioduro de propidio a la célula, prueban que el extracto induce muerte por necrosis, con un máximo de actividad del 15.5 %. No obstante estos resultados, la inducción de apoptosis junto con la inducción de necrosis, no explica el decremento del 50 % en la densidad celular observada en los cultivos de células HeLa tratadas con el

extracto, sugiriendo la existencia de otro tipo de muerte diferente a la apoptosis y la necrosis. A pesar de que estos resultados demuestran la actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular del extracto del hongo Shiitake en células tumorales, es conveniente demostrar si la actividad antiproliferativa e inductora de muerte celular presente en el extracto del hongo Shiitake afecta también a las células no tumorales. Es importante resaltar que la mayoría de los estudios que han evaluado el extracto del hongo Shiitake en las diferentes líneas tumorales, carecen de pruebas en células no tumorales, de tal manera que se desconoce el efecto de este extracto en células normales. Al respecto, nuestros resultados mostraron solo 8 % de actividad antiproliferativa en células fibroblásticas no tumorales provenientes del cérvix humano, indicando un efecto con acción selectiva. Sin embargo, en cultivos de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana de donadores sanos, el extracto no indujo una muerte por necrosis, indicando que para estas células el extracto no es citotóxico, no obstante este resultado, el extracto afectó el potencial proliferativo de estas células, indicando que el extracto del hongo Shiitake podría tener una acción inmunosupresora. Sería pertinente en un futuro, purificar e identificar la o las moléculas responsables de cada actividad con la intención de establecer si la actividad antiproliferativa e inductora de necrosis y/o apoptosis es debido a una sola molécula o es causada por moléculas diferentes, de tal manera que ambas posibilidades representan un fuerte interés, ya que podrían ser estudiadas como agentes con potencial terapéutico, por ejemplo en enfermedades como el cáncer.

Conclusiones

- El extracto acuoso del hongo *Lentinula edodes* presenta una actividad antiproliferativa de un 50 % para la línea HeLa a una concentración de 3.9 $\mu\text{l/ml}$.

- El hongo *Lentinula edodes* a una concentración de 3.9 $\mu\text{l/ml}$ presenta un efecto necrótico temprano de 15.5 % y tardío de 10.63 % para la línea HeLa, sin embargo, nula para linfocitos de sangre periférica humana.

-El hongo *Lentinula edodes* induce a una activación de caspasa 3 en un 11.8% y en un 7.9% en la fragmentación del ADN.

-*Lentinula edodes* a una concentración de 3.9 $\mu\text{l/ml}$ afecta el potencial proliferativo de fibroblastos de cérvix en un 8 % pero en un 31.4 % en linfocitos de sangre periférica humana.

Referencias

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2006). *Introducción a la biología celular*. 2ª edición. Editorial Medica Panamericana. España, 740 pp.
2. Alonso R., Lazcano P., Hernández A. (2005). *Cáncer cervicouterino: diagnóstico, prevención y control*. 2ª edición. Editorial Medica Panamericana. México, 385pp.
3. Álvarez S., López B (1995) *Regulación genética de los papilomavirus humanos genitales*. Salud Pública de México, Vol. 37, 240-247 pp.
4. Aoki, T. 1984. *El lentinan: estudios de Inmunología, agentes de modulación inmune y sus mecanismos*. 25:62-77
5. Audesirk T., Audesirk G y Byers B (2004). *Biología. Ciencia y naturaleza*. Person Educación, México, 592 pp.
6. Baynes J. M. y Dominiczak M. H. (2008). *Bioquímica médica*. 2ª edición. Editorial Elsevier. España, 703 pp.
7. Bingye H., Toyomasu T., Shinozawa T. (2000). *Induction of apoptosis in cultured cells by extracts from shiitake (Lentinula edodes) mycelialculture broth*. Mycoscience 41: 623-631.
8. Bucher N. y Britten C. (2008). *G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer*. British Journal of Cancer, 98:523-528.

9. Buja L., Eigenbrodt M., Eigenbrodt E. (1993). *Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death.* Arch pathol Lab Med; 117: 1208-14.
10. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva
<http://www.cnegsr.gob.mx/programas/cancer-cervico-uterino.html>
11. Devlin T (2004). *Bioquímica con aplicaciones clínicas.* 4ta edición. Editorial Reverté. España, 1219 pp.
12. Douglas H (2000). *The Hallmarks of Cancer.* Cell, Vol 100, 57-70.
13. Dubin M. y Stoppani A. (2000). *Muerte celular programada y apoptosis,* Medicina 60:375-386.
14. Fang N., Qinglin L., Yu A., Zhanhg J., He L., Ronis J., Badgar T. (2006), *Induction of growth and Induction of Apoptosis in Human Cancer Cell Lines by an Ethyl Acetate Fraction from Shiitake Mushrooms.* The Journal of alternative and complementary medicine. Vol. 12, Núm. 2, 125-132 pp.
15. Freshney R., 1994. *Culture of animal cell. A manual of basics technique.* Wiley-Liss Inc. New York. USA. 397pp.
16. Glüksmann A. (1951). *Cell death in normal vertebrate ontogeny.* Bio. Rev. 26, 59-86.
17. Griffiths B., 1988. *Scaling-up of animal cell cultures.* Ed. Freshney R.I. Animal cell culture: A practical approach IRL. Press England. 345 pp.

18. Gu Yu-Huan., Belury M. (2005). *Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cell (CH72) by ethanol extract of Lentinula edodes*. Cancer Lett. 18; 220(1): 21-8.
19. Gupta S., Agrawal A., Agrawal S., Su H. y Gollapudi S. (2006). *A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis*. Immunity & Ageing, 3:1-8
20. Hanahan D. Weinberg R. (2000). *The hallmarks of cancer*, Cell, Vol.100, 57-70 pp.
21. Hartwell L., Weinert T. (1989): *Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events*. Science 246: 629- 634.
22. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2011) Consultado el 6 de noviembre del 2012.
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>
23. Israilides C., Kletsas D., Arapoglou D (2008). *In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom Lentinula edodes*. Phytomedicine 15(6-7):512-9.
24. Jones E., Manson A (2003). *Lo esencial en célula y genética*. Editorial Elsevier, España 242 pp.
25. Jong S., Birmingham J., (1993). *Medicinal and Therapeutic Value of the Shiitake Mushroom*. Advances in Applied Microbiology. 39. 153-184

26. Kerr J., Wylie A., Currie A (1972). *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*, Br. J. Cancer, Vol. 26, 239-257 pp.
27. Kidd, P.M. (2000): *The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment*. Altern. Med. Rev. 5: 4-27
28. Lizarbe I (2007). *El suicidio y la muerte celular*, Rev.R.Acad.Cienc. Exact.Fís.Nat., Vol 101, no. 2, 1-33 pp.
29. Lizuka C. (1986): *Antiviral Substance and the Manufacturing Method Thereof*. United States Patent 4: 627-629.
30. Lockshin R., Zakeri Z. (2001), *Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory*, Nature reviews, Vol. 2, 545-550 pp.
31. López, Casillas F. (2002). *El ciclo celular bien vale un galardón*. Ciencia Enero- marzo: 74-77
32. Majno G., Joris I. (1995). *Apoptosis, oncosis, necrosis an overview of cell death*. American Journal of Pathology, Vol. 146, 3-16 pp.
33. Melo A., Montenegro H., Hooper T., Capurro V., Roa S., Roa E (2003). *Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma de cuello uterino en mujeres de la IX región*. Chile, Rev. Méd. Vol. 131, 1382-1390 pp.
34. Miles, P. G., & Chang, S. T. (1997). *Mushroom biology: Concise basics and current developments*. World Scientific Press 161-175pp.

35. Mitchell R. N., Kuman V., Abbas A. K. y Fausto N. (2007). Compendio Robbins y Cotran patología estructural y funcional, 7ª edición, Editorial Elsevier. España, 877 pp.
36. Morgan S. J. y Darling D. C. (1993). *Cultivo de las células animales*. Editorial Acriba. España. 159 pp.
37. Nanba H., Mori K., Toyomasu T (1987). *Antitumoral of Shiitake (Lentinus edodes) fruit bodies orally administrated to mice*. Clin Pharm Bull 35:2453-2458.
38. National Cancer Institute (2009). Lo que usted necesita saber sobre el cáncer de cérvix. NIH 09-20475
39. National Cancer Institute (2012), National Institutes of Health. U.S.A. Consultada: 3 de septiembre del 2012, Disponible en: <http://www.cancer.gov/>.
40. Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). *Cáncer*. Nota descriptiva No. 297. Documento revisado el 19 de septiembre de 2012, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
41. Panduro A. (2000), Biología Molecular en la Clínica, Editorial McGraw-Hill. México, 130-140 pp.
42. Quezada M. (2007). *El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en las células troncales embrionarias*. ContactoS 65, 5-22.

43. Sen, S. y M. D'Incalci. (1992). *Apoptosis: Biochemical Events and Relevance to Cancer Chemoterapy*. FEBS Letters. 307:122-127
44. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud (2011). *Anuarios de morbilidad*. Revisado el 12 de enero de 2011 de: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
45. Stephen R. y Bolsover. (2007). *Biología celular*. Editorial Acriba. 2ª edición. Editorial Acriba. Zaragoza. 477pp.
46. Sugano N, Choji Y, Hibino Y, (1985). *Anticarcinogenic action of an alcohol insoluble fraction (LAP1) from culture medium of Lentinus edodes mycelia*. Cancer Lett, 27,1-6.
47. Sugano N, Hibino Y, Choji Y., (1982) *Anticarcinogenic actions of water soluble and alcohol insoluble fractions from culture medium of Lentinus edodes mycelia*. Cancer Lett, 17, 109-14.
48. Tirado G., Betancourt M., Cervantes L., Carrancá G., Marina F., Borges G. (2005), *Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas*, Salud pública de México, Vol. 47, no. 5, 342-350 pp.
49. Tubiana M. (1971). *The Kinetics of Tumour Cell Proliferation and Radiotherapy*. British Journal of Radiology. 44:325-347
50. Ulrike Lindequist (2005). *The Pharmacological Potential of Mushrooms*. Evid Based Complement Alternant Med. 2(3)285-299.

51. Wayne M., Becker, Lewis J., Klensmith y Jeff H., (2007). *El mundo de la célula*. Pearson Educación, Madrid, 1008 pp.

Apéndice

- Medio de cultivo

RPMI-1640 (GIBCO, USA) 10.42 g

NaHCO₃ (SIGMA, USA) 2 g

Los reactivos se disuelven en 800 mL de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 μm. Se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con suero de neonato de ternera (NSC), en la proporción requerida y posteriormente es nuevamente filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 22 μm.

- Desactivación del suero

Una botella de suero de neonato de ternera (NCS) se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelado, posteriormente se coloca a baño maría a 57 °C durante 30 min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 50 ml. para su mejor uso y manipulación.

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 L de agua bidestilada.

Cloruro de sodio (SIGMA, USA) 8.00 g

Cloruro de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Fosfato monoácido de sodio (SIGMA, USA) 2.16 g

Fosfato diácido de potasio (SIGMA, USA) 0.20 g

Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCl 8 N y se afora finalmente a un volumen final de 1000 ml. Ésta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con diámetro de poro de 22 μm , la solución se almacena a 4 °C hasta el momento del uso.

- Verseno

Ésta solución se empleó para despegar las células tumorales HeLa y ViBo adherentes, y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

EDTA (SIGMA, USA) 0.4 g

NaCl (SIGMA, USA) 8 g

KCl ((SIGMA, USA) 0.4 g

Tris (SIGMA, USA) 3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml. de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCl 1 N y se afora a 1000 mL de agua bidestilada. La solución se esteriliza en autoclave a 20 Ibs durante 20 min.

- Solución Tripsina

Ésta solución se empleó para despegar las células ViBo, es preparada al 0.05% en Verseno.

- Solución cristal violeta (0.1 %)

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración 0.1 % se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (SIGMA, USA) 3.96 g

Ácido Fórmico (SIGMA, USA) 4.28 mL

Cristal violeta (SIGMA, USA) 1 g

- Colorante Cristal Violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, la cual consiste en agregar 3.96 g de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500 mL con agua bidestilada. Una vez preparada la solución debe ser filtrada.

- Glutaraldehído

A 1.57 mL de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4 °C.

- Solución de ácido acético (10 %)

A 10 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker) se le agrega 90 mL de agua bidestilada.

- Paraformaldehído (2%)

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño María sin que la temperatura rebase los 60 °C. Se almacena a 4 °C.