



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Carrera de Biología

Efecto del extracto metanólico de *Lentinula edodes*
sobre las gelatinasas A y B (MMP2 y MMP9) y la
uroquinasa (PLAU) en células de cáncer de mama
MCF7.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JACQUELINE VIRIDIANA LARA ESPINOSA

Director de tesis

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México, 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

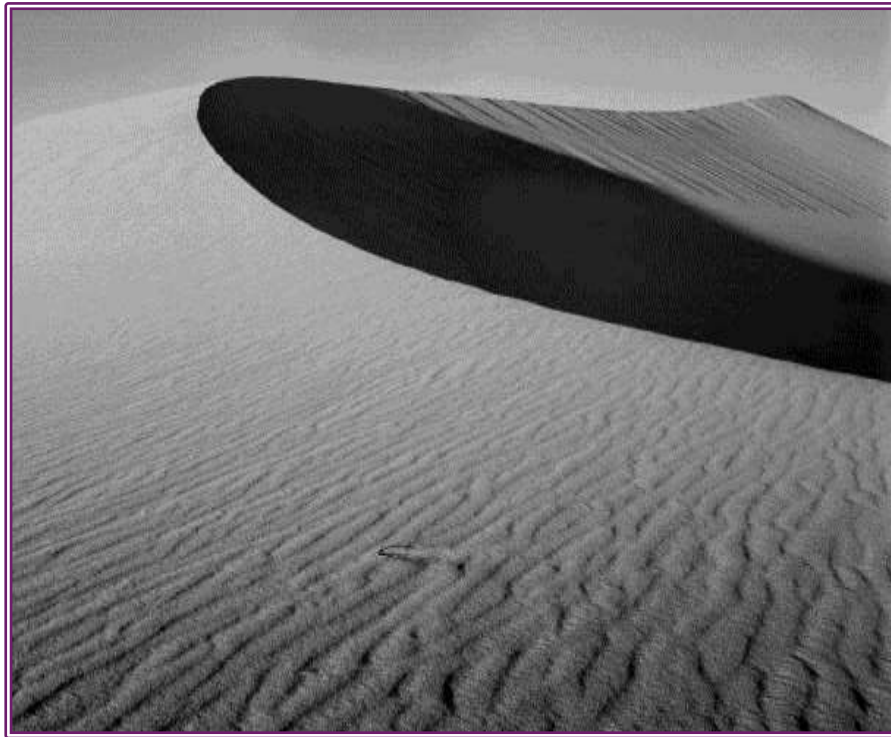


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



***“La naturaleza nos ha dado las semillas
del conocimiento, no el conocimiento
mismo”.***

Séneca (2 AC-65) Filósofo latino.



AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de pertenecer a esta casa de estudios.
- A mi asesor el Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y a la Dra. Guadalupe Martínez Hernández por su apoyo durante la realización de este proyecto.
- A la doctora Martha Martínez García por todo su apoyo y enseñanza.

DEDICATORIAS

- A Dios por darme la oportunidad de lograr todas las metas de mi vida, que a pesar de los tropiezos siempre me ha dado fuerzas para salir adelante.
- A mi mamá que gracias a ella estoy donde estoy hoy en día, gracias por ser la mejor mamá del mundo y por apoyarme y soportarme en todo momento. T.Q.M.
- A mi hermana Cynthia, gracias hermosa por ser esa chispa que le da luz a mi vida.
- A mi abuelita Remedios y a mi tía Maru.
- A Miriam, Rosa, Luis y Viri, por ser mis grandes compañeros y amigos durante la travesía que fue estudiar esta hermosa carrera.
- A Fanny, Karla y Diana.
- A mis compañeras de laboratorio, Andrea, Ale, Rubi y Gisela.
- A todos y cada uno, de quienes pusieron un granito de arena para poder realizar este sueño y lograr un objetivo más en mi sendero académico

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, de la Unidad de Morfofisiología de la FES Iztacala, UNAM, bajo la dirección del **Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyecto IN230611 “Regulación de proteinasas durante el desarrollo periimplantacional del ratón: MMP9 y sistema de activación del plasminógeno” y proyecto IN223014 “Regulación del sistema de activación del plasminógeno y metaloproteinasas de matriz extracelular por glucosa y estrés oxidante en procesos de invasión tisular: trofoblasto y células de cáncer de mama”. Agradezco a la DGAPA, UNAM la beca recibida.

El comité tutorial que supervisó el desarrollo de la presente tesis está conformado por:

- **Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez**
- **Dra. Ana María García Bores**
- **Dra. María Guadalupe Martínez Hernández**
- **M. en C. Luis Antonio Hernández**

ÍNDICE

PÁGINA

• Lista de abreviaturas.....	I
• Índice de figuras y cuadros.....	II
• Resumen.....	IV
• Abstract.....	V
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	15
3. Planteamiento del problema.....	16
4. Justificación.....	17
5. Hipótesis.....	17
6. Objetivos.....	17
7. Materiales y método	18
8. Resultados.....	24
9. Discusión.....	32
10. Conclusiones.....	35
11. Literatura citada.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
g	Gramos
M	Molar
mA	Miliamperes
MCF7	Línea celular tumoral que corresponde a un cáncer de glándula mamaria
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP2	Gelatinasa A/Metaloproteínasa de matriz extracelular 2
MMP9	Gelatinasa B/ Metaloproteínasa de matriz extracelular 9
MMP	Metaloproteasas de matriz
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nm	Nanómetros
PAI 1	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PBS	Salina amortiguada con fosfatos
PLAT	Activador del plasminógeno tisular
PLAU	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
PLAUR	Receptor de PLAU
Plg	Plasminógeno
p-NA	<i>Para</i> -nitro anilina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFBi	Suero fetal bovino inactivado
Tritón X-100	Octil fenoxi polietoxietanol
U	Unidades
µg	Microgramos
µm	Micrómetros

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

		Página
Figura 1	Tasa de mortalidad por cáncer mamario y cérvico-uterino en México 1955-2010.	3
Figura 2	Mecanismos moleculares del cáncer.	4
Figura 3	Tejido conjuntivo.	5
Figura 4	Estructura básica de las metaloproteasas.	9
Figura 5	Regulación de la expresión y actividad de las MMP.	11
Figura 6	Sistema plasminógeno/ plasmina en la degradación de la matriz extracelular.	14
Figura 7	Cultivo de <i>Lentinula edodes</i> .	19
Figura 8	Extracción con metanol de cuerpo fructífero y micelio.	20
Figura 9	Cultivo de las células de cáncer de mama MCF7.	21
Figura 10	Efecto de los extractos metanólicos de micelio (A) y cuerpo fructífero (B) sobre el crecimiento de la población de células MCF7.	26
Figura 11	Efecto de los extractos metanólicos de micelio sobre el contenido de gelatinasas en el medio condicionado por células MCF7.	27
Figura 12	Efecto de los extractos metanólicos de cuerpo fructífero sobre el contenido de gelatinasas en el medio condicionado por células MCF7.	28
Figura 13	Efecto de los extractos metanólicos de “shitake” sobre la actividad del activador del plasminógeno en el medio condicionado por células MCF7.	29
Figura 14	Efecto del extracto metanólico de micelio de shitake sobre la formación de plasmina a partir de plasminógeno en el medio condicionado por células MCF7.	30
Figura 15	Efecto del extracto metanólico de cuerpo fructífero de shitake sobre la formación de plasmina a partir de	31

plasminógeno en el medio condicionado por células MCF7.

Cuadro 1	Funciones de la matriz extracelular.	6
Cuadro 2	Clasificación de las metaloproteinasas de matriz extracelular presentes en el humano.	8

RESUMEN

El cáncer de mama se forma en los conductos y los lobulillos de este órgano. El cáncer es una enfermedad que presenta cambios dinámicos en los tejidos, siendo la capacidad migratoria, invasiva y de generar metástasis una característica en los tumores malignos. La matriz extracelular (MEC), es la primera barrera que las células cancerosas deben cruzar para poder generar metástasis. Las metaloproteasas de matriz (MMP) son una familia de endopeptidasas que degradan todos los componentes de la MEC, dentro estas encontramos a las gelatinasas A (MMP2) y la gelatinasa B (MMP9) las cuales están involucradas en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama y su sobreexpresión está correlacionada con tumores agresivos. El sistema del activador del plasminógeno/plasmina se ha considerado como uno de los pasos iniciales en la activación de la cascada proteolítica en procesos de migración celular. Existen dos tipos de activadores de plasminógeno: el tipo uroquinasa (PLAU) y tipo tisular (PLAT). Estos activadores participan en la formación de plasmina a partir de plasminógeno. Algunas alteraciones en la regulación de este sistema se asocian a procesos patológicos como el cáncer. Un prometedor grupo de agentes preventivos del cáncer son aquellos derivados de productos naturales. El uso de los hongos con propiedades terapéuticas ha aumentado el interés de la comunidad científica y clínica debido a su eficacia contra enfermedades y trastornos metabólicos como el cáncer. *Lentinula edodes*, más conocido como “shiitake”, es un hongo al cual se le han atribuido propiedades antitumorales, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los extractos metanólicos de cuerpo fructífero y micelio de *L. edodes* a una concentración de 200, 100, 50 y 25 µg/ mL sobre la expresión de MMP2 y MMP9 y la uroquinasa (PLAU), en la línea celular de cáncer de mama MCF7. Para cumplir con este objetivo se realizó el ensayo de MTT para determinar el efecto de dichos extractos sobre la proliferación de la población de células MCF7, zimogramas en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina para medir el contenido de las gelatinasas MMP9 y MMP2 y un ensayo amidolítico para evaluar la actividad de uroquinasa (PLAU). Como resultados se encontró que al aplicar los extractos de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* se presentó una inhibición del 60% en el crecimiento de la población de células, disminuyó la concentración de MMP2 y MMP9 secretadas, redujo la actividad de transformación de plasminógeno a plasmina en las células de cáncer y disminuyó la actividad de PLAU. Sin embargo, es necesario la realización de más ensayos para lograr comprender el mecanismo por el cual estos extractos tienen este efecto sobre las células tumorales, lo que abriría nuevos horizontes como potenciales agentes quimioterapéutico, coadyuvantes de terapias farmacológicas y agentes como quimiopreventivos.

Palabras clave: *Lentinula edodes*, MMP2, MMP9, PLAU, MCF7.

ABSTRACT

Breast cancer is formed in the ducts and lobules of this organ. The ability migratory, invasive and metastasize is a characteristic of malignant tumors. The extracellular matrix (ECM) is the first barrier that cancer cells must cross to generate metastases. Matrix metalloproteinases (MMP) are a family of proteinases that degrade all the components of the ECM, in this group we can find gelatinase A (MMP2) and gelatinase B (MMP9) which are involved in the growth and metastasis of cancer breast and its overexpression correlates with aggressive tumors. The system plasminogen activator / plasmin has been considered as one of the initial steps in the activation of the proteolytic cascade in cell migration. There are two types of plasminogen activators: urokinase type (PLAU) and tissue-type (PLAT). These activators are involved in the formation of plasmin from plasminogen. Some alterations in the regulation of this system are associated with disease processes such as cancer. A promising group of cancer preventive agents are those derived from natural products. The use of fungi therapeutics has increased the interest of the scientific and clinical community because of its effectiveness against diseases and metabolic disorders such as cancer. *Lentinula edodes*, known as "shiitake" is a mushroom which has been attributed antitumor properties, so the objective of this study was to evaluate the effect of methanol extracts of fruiting body and mycelium of *L. edodes* at a concentration of 200, 100, 50 and 25 µg/mL on the expression of MMP2 and MMP9 and urokinase (PLAU), in the breast cancer cell line MCF7. To meet this objective, the MTT assay was performed to determine the effect of these extracts on the proliferation of MCF7 cells population, zymogrammes polyacrylamide gels copolymerized with gelatin were made to measure the content of gelatinases MMP2 and MMP9 and an amidolytic assay was made to evaluate the activity of urokinase (PLAU). As a result it was found that when applying extracts of mycelia and fruiting bodies of *L. edodes* an inhibition of 60% in the growth of the cell population was submitted, it decreased the concentration of MMP2 and MMP9 secreted, reduced the transforming activity of plasminogen plasmin in cancer cells and decreased PLAU activity. However, further testing in order to understand the mechanism by which these extracts have this effect on tumor cells is necessary, which would open new horizons as potential chemotherapeutic agents, adjuvants and drug therapies as chemopreventive agents.

Key words: *Lentinula edodes*, MMP2, MMP9, PLAU, MCF7.

1. INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se forma por lo general en los conductos y los lobulillos de los tejidos de la mama. Se puede presentar tanto en los hombres como en las mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro (Instituto Nacional de Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EUA, 2010).

ETAPAS DEL CANCER DE MAMA

El cáncer de mama se clasifica en cuatro etapas con base al tamaño del tumor y si es o no invasivo. Las etapas son (Instituto Nacional de Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EUA, 2010):

Etapa 0: Alrededor del 15%-20% de las neoplasias mamarias son tempranas, también llamadas carcinomas *in situ*. Existen 2 tipos de cáncer de mama *in situ*, el carcinoma intraductal y el carcinoma lobular. Las pacientes con esta condición tienen una probabilidad del 25% de desarrollar cáncer de mama en cualquiera de las mamas en los próximos 25 años.

Etapa I: El cáncer no mide más de 2 centímetros y no se ha extendido fuera de la mama.

Etapa II: Se divide en etapa IIA y IIB. La etapa IIA se reconoce por cualquiera de las siguientes características: el cáncer no mide más de 2 centímetros pero se ha diseminado a los ganglios linfáticos debajo del brazo (los ganglios linfáticos axilares). El cáncer mide entre 2-5 centímetros pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares. La etapa IIB tiene las siguientes características: el cáncer mide entre 2-5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares. El cáncer mide más de 5 centímetros pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares.

Etapa III: Se divide en etapa IIIA y IIIB. La etapa IIIA tiene las siguientes características: el cáncer mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado

a los ganglios linfáticos axilares y estos están unidos entre sí o a otras estructuras. El cáncer mide más de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares. La etapa IIIB cuenta con las siguientes características: el cáncer se ha diseminado a tejidos cerca de la mama (la piel o la pared torácica, incluyendo las costillas y los músculos del tórax). El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón.

Etapa IV: El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia a los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro; o el tumor se ha diseminado localmente a la piel y a los ganglios linfáticos dentro del cuello, cerca de la clavícula.

TENDENCIA EN EL ÁMBITO INTERNACIONAL

El cáncer de mama está alcanzando proporciones epidémicas en todo el mundo. En el ámbito mundial, 1.3 millones de casos fueron diagnosticados en 2009, equivalentes a 10.5% de todos los casos nuevos de cáncer (Porter, 2009). Este tipo de cáncer es el de mayor prevalencia en el mundo y aproximadamente 4.4 millones de mujeres viven actualmente con él (Boyle y Levin, 2013).

La incidencia de cáncer de mama se encuentra en aumento y se prevé que la mayoría de los nuevos casos tendrán origen en los países en vías de desarrollo. Se calcula que para el año 2020, 1.7 millones de casos nuevos serán diagnosticados, lo que representa un incremento del 26% (Beaulieu *et al.*, 2009). Estados Unidos encabeza la lista con 240,721 nuevos casos calculados durante 2009, sin embargo la mayoría de ellos, en este país son detectados y tratados en etapas tempranas y la tasa de supervivencia a cinco años es de 98% (American Cancer Society, 2009).

En América Latina más de 40,000 mujeres mueren cada año de cáncer de mama, y más de 117,000 casos son reportados (Knaul *et al.*, 2009). Para el año 2020 existirán cerca de 143,000 nuevos casos, lo que representa un aumento de 31%, con una proyección de 52,000 muertes (Beaulieu *et al.*, 2009).

Las mujeres de los países en vías de desarrollo son más propensas a fallecer por esta causa. La tasa de letalidad refleja las inequidades en la detección temprana y acceso al tratamiento. El porcentaje promedio de las muertes por los casos nuevos es de 56% para el ingreso económico bajo; 44 % para nivel medio bajo, y 39%, para medio alto, en comparación con el mundo desarrollado donde alcanza el 24% (Beaulieu *et al.*, 2009).

TENDENCIA Y SITUACIÓN EN MÉXICO

En México, en el año 2008 murieron de esta enfermedad 4,818 mujeres, lo que se traduce en una muerte cada dos horas. En el 2006, la mortalidad por cáncer de mama se presentó en los estados con mayor desarrollo económico-social y con una mayor población: Guadalajara, Monterrey y la Ciudad de México, que en conjunto concentran el 50% de las muertes por esta patología. La tasa de mortalidad por cáncer de mama, ajustada por edad, ha superado la mortalidad por cáncer cervicouterino y ha registrado un aumento de 1955 a 2010, pasando de un tasa de 2 por 100,000 mujeres a 9 por 100,000 mujeres (figura 1) (Knaul *et al.*, 2009).

En México, el cáncer de mama se presenta en mujeres más jóvenes que en los países económicamente más desarrollados. Además se detecta tardíamente, con altos porcentajes en las etapas III y IV (López- Carrillo, 2003).

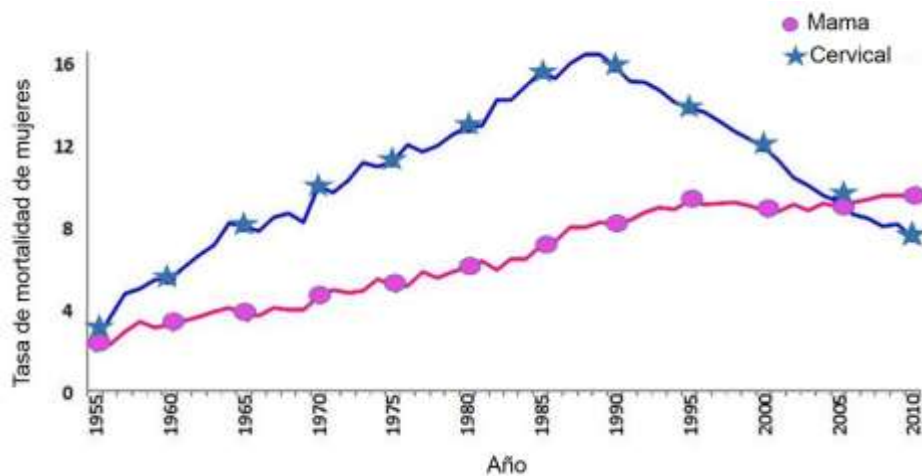


Figura 1. Tasa de mortalidad por cáncer mamario y cervicouterino en México 1955-2010 (Tómatelo a pecho, 2013).

MECANISMOS MOLECULARES DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que presenta cambios dinámicos en el genoma. Esto debido a mutaciones que producen oncogenes dominantes con ganancia de función y genes recesivos supresores de tumor con pérdida de función. Las células tumorales presentan defectos en los circuitos que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. Se ha sugerido que los distintos fenotipos de células cancerosas se manifiestan debido a alteraciones en la fisiología de la célula que en conjunto promueven un crecimiento maligno (Hanahan y Weinberg, 2000) (figura 2). Dentro de estos mecanismos, la capacidad de invadir tejidos y generar metástasis es una característica en los tumores malignos. La matriz extracelular (MEC), es la primera barrera que las células cancerosas deben cruzar para poder generar metástasis. Primero pasan a través de la membrana basal epitelial y posteriormente invaden el estroma subyacente. Finalmente entran a los vasos linfáticos y sanguíneos y se extravasan a distintos órganos formando un nuevo tumor proliferativo. Las enzimas proteolíticas, gracias a su capacidad de degradar proteínas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión, son importantes componentes de este proceso (Overall y López-Otín, 2002)



Figura 2. Mecanismos moleculares del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

MATRIZ EXTRACELULAR

La relación de las células con su entorno es esencial para el adecuado funcionamiento e integridad de los tejidos. Estos últimos, están conformados por células y por una trama de proteínas denominada MEC (figura 3). Esta es una estructura insoluble de proteínas y carbohidratos secretados por todas las células de los organismos vertebrados, se ensambla localmente formando una compleja red que se encuentra en íntima asociación con la superficie de las células que la produce; su principal función es proporcionar soporte a las células. Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular son de cuatro grandes tipos (Carnegie y Cabaca, 1993):

- Colágenas
- Sistema elástico Proteoglicanos
- Glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina, trombospondina y otras).

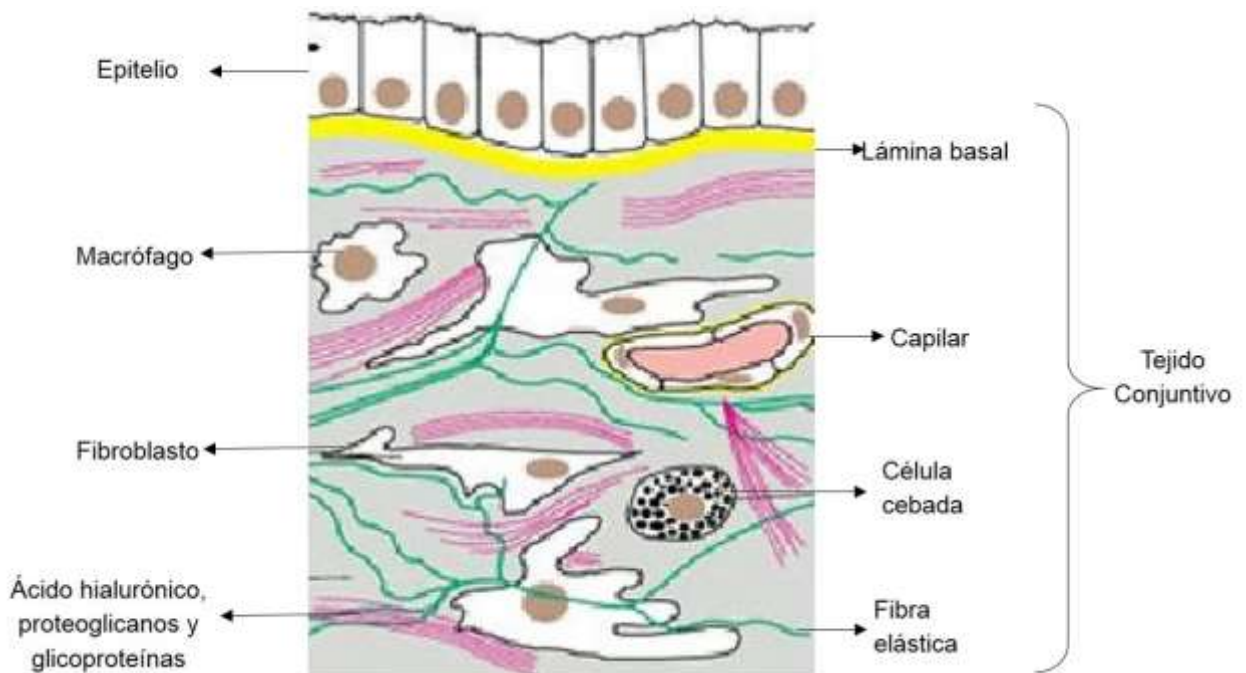


Figura 3. Tejido conjuntivo. Este tejido se localiza subyacente a un epitelio y contiene diversas células y componentes de la matriz extracelular (MEC) (Alberts *et al.*, 2008).

Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás; esto hace que la matriz sea calificada como un verdadero complejo funcional (cuadro 1). Las colágenas y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular. Las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión al sustrato o intercelular, importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-básico (Silvera-Arenas y Barrios de Zurbarán, 2002).

Cuadro 1. Funciones de la MEC (Silvera-Arenas y Barrios de Zurbarán, 2002).

Relleno de los intersticios o espacios entre las células.
Confiere resistencia mecánica (a la compresión, estiramiento, etc.) a los tejidos.
Constituye el medio homeostático, nutricional y metabólico para las células.
Constituye el medio adecuado para el tránsito celular.
Provee fijación para el anclaje celular
Es el medio por el cual se transportan diferentes señales entre las células.

REMODELACIÓN DE LA MEC

La MEC es una estructura dinámica sujeta a un constante recambio de las proteínas y elementos que la conforman mediante una cascada de eventos proteolíticos. Durante los procesos de diferenciación en el desarrollo embrionario o en la migración celular, la remodelación se da de acuerdo a los requerimientos celulares. En tejidos adultos, dicha remodelación ocurre en la neovascularización, así como en los cambios que sufren las glándulas mamarias y el tejido uterino durante el ciclo menstrual (Streuli, 1999). Una degradación anormal pero regulada de la MEC se observa en otras condiciones, como la invasión y metástasis de células neoplásicas (Stettler-Stevenson *et al.*, 1993).

Diversas enzimas proteolíticas juegan un papel importante durante diversos procesos celulares, al degradar, por hidrólisis total o parcial, a las proteínas de la MEC. Las proteasas, se clasifican por la naturaleza química del sitio catalítico, en cuatro grupos que son (Cascales Angosto y Álvarez-Gómez, 2010):

- Metaloproteasas.
- Serina-proteasas.
- Cisteína-proteasas.
- Aspartato-proteasas

METALOPROTEASAS

Las metaloproteasas de matriz (MMP) son una familia de endopeptidasas dependientes de Zn^{++} y Ca^{++} , que en conjunto son capaces de degradar todos los componentes de la MEC, tanto de la membrana basal, como de la matriz intersticial. Intervienen en los procesos fisiológicos de organogénesis, cicatrización, involución uterina y también en diversas condiciones patológicas, como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis; ya que su capacidad de actuar a pH fisiológico, convierten a estas enzimas en candidatos que participan en la destrucción tisular que acompaña al cáncer (Visse y Nagase, 2003).

Los sustratos de las MMP también incluyen una amplia variedad de proteínas, como moléculas quimiotácticas, de adhesión, inhibidores de proteasa, receptores de superficie celular, factores de coagulación y factores de crecimiento. Se conocen 26 tipos diferentes en humanos con una homología entre ellas del 30 al 50%. Se las clasifica, de acuerdo a sus diferencias estructurales, en cinco grupos claramente diferenciados a los que se sumaron una serie de MMP que no correspondían a ninguna de estas categorías y no podían asociarse entre sí (cuadro 2). La expresión, secreción y actividad de estas enzimas en los tejidos normales dependen de un estricto control (Verma, 2007).

Cuadro 2. Clasificación de las Metaloproteinasas de matriz extracelular presentes en el humano (Coronato *et al.*, 2012).

Clasificación	MMP	Función
Colagenasas	MMP1, MMP8, MMP13, MMP18	Escindir la colágena intersticial I, II y III dando lugar a colágena desnaturalizada o gelatina.
Gelatinasas	MMP2 y MMP9	Degradan la gelatina. MMP2 también digiere colágenas I, II y III y es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos. La MMP9, en cambio, está casi ausente en tejidos normales y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos.
Estromalisinas	MMP3, MMP10, MMP11	Digieren diversos componentes de la MEC. Son elaboradas por fibroblastos del estroma al ser activados por una glicoproteína de membrana producida por las células tumorales llamada EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer). Esta interacción lleva a la degradación de la membrana basal y de la MEC. Otra función de la MMP3 es activar varias proMMPs.
Matrilisinas	MMP7 y MMP26	Actúan sobre moléculas de la superficie celular y son expresadas específicamente por células tumorales de origen epitelial.
Metaloproteasas asociadas a membrana	MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 y MMP25	Forman parte de las membranas basales e intervienen en la actividad proteolítica de otras MMP. Casi todas ellas son capaces de activar a la pro-MMP2. Digieren algunos componentes de la MEC y algunas participan en la angiogénesis.
MMP que no están clasificadas en las categorías anteriores	MMP12	Es una metaloelastasa, expresada principalmente en macrófagos, e influye en su capacidad migratoria. Su principal sustrato es la elastina
	MMP19	Se presenta en hígado y linfocitos T, en pacientes con artritis reumatoide
	MMP20 o enamelisina	Digiere a los miembros de la familia de las amelogeninas, proteínas de la matriz extracelular.
	MMP22	La función aún se desconoce
	MMP23	Se expresa principalmente en tejido reproductor y carece del dominio hemopexina, pero tiene un dominio rico en cisteína seguido de uno de tipo inmunoglobulina.
	MMP28	Se expresa en queratinocitos e interviene en la hemostasis y la cicatrización de heridas.

ESTRUCTURA DE LAS MMP

La estructura de las MMP comprende varios dominios comunes a la mayoría de ellas (figura 4) (Arvelo y Cotte, 2006).

- **Péptido señal o predominio**, necesario para el desplazamiento intracelular de la enzima hasta la membrana y que es eliminado después de la secreción de la proteasa
- **Dominio propeptídico o prodominio** con capacidad enzimática latente. Está formado por una secuencia peptídica con un residuo de cisteína, que interactúa con el sitio catalítico.
- **Dominio catalítico carboxiterminal** que contiene un átomo de zinc y otros dominios variables.
- **Dominio tipo hemopexina**, en la posición carboxilo terminal que interviene en la unión a sustratos específicos de las metaloproteasas y con los inhibidores endógenos.
- **Dominio transmembrana**, en el caso de las MMP asociadas a la membrana plasmática.

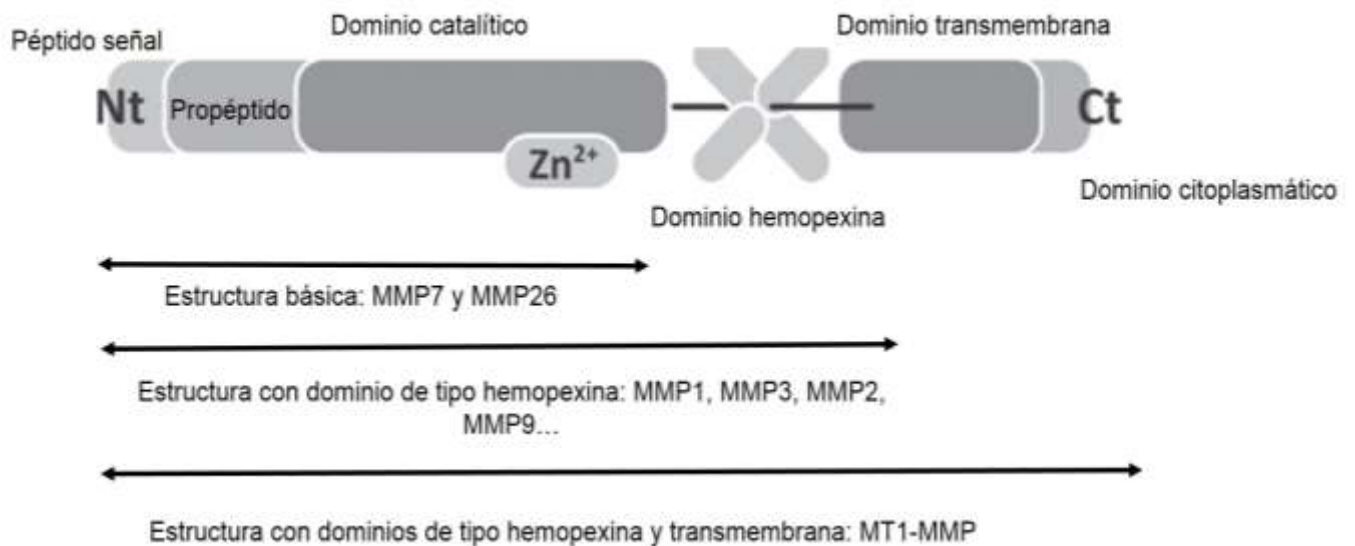


Figura 4. Estructura básica de las metaloproteasas (Coronato *et al.*, 2012).

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LAS MMP.

La actividad proteolítica de las MMP se regula a tres niveles: transcripción, activación del proenzima e inactivación (figura 5). Otros mecanismos se encuentran también implicados: estabilidad del mRNA, eficiencia traduccional, compartimentación y secreción enzimática, reclutamiento en la membrana celular, selección de sustrato, su liberación, oligomerización, incorporación, internalización celular y finalmente autólisis. Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMP se circunscriban a aquellos sitios y condiciones en los que son necesarias (Folgueras *et al.*, 2004).

Diversas señales reguladoras, tales como factores solubles, contactos célula-matriz o célula-célula, interaccionan con receptores específicos en la superficie celular, e inician una cascada de eventos que conduce a la generación de MMP funcionales, localizadas en la superficie celular (MT-MMP) o secretadas al medio extracelular como proMMP. Las proMMP se activan de manera diferente. La autólisis o los inhibidores de las MMP interfieren con la inducción de estos efectos celulares (López-Otín y Bond, 2003).

MMP Y CÁNCER

Las MMP activas están implicadas en procesos que promueven el desarrollo del cáncer, como inestabilidad genética, crecimiento celular, angiogénesis e invasión. También intervienen en la inducción de la apoptosis y la respuesta inmune antitumoral del huésped. Las MMP juegan un papel fundamental en la degradación del tejido conectivo y los componentes de la membrana basal, además de activar factores de crecimiento, receptores de superficie para moléculas de adhesión y quimocinas. Esta interacción con los componentes de la MEC altera la respuesta celular al microambiente, lo que permite que las células tumorales se tornen menos adherentes y por lo tanto con más posibilidades de migrar y producir metástasis (Van Damme *et al.*, 2004).

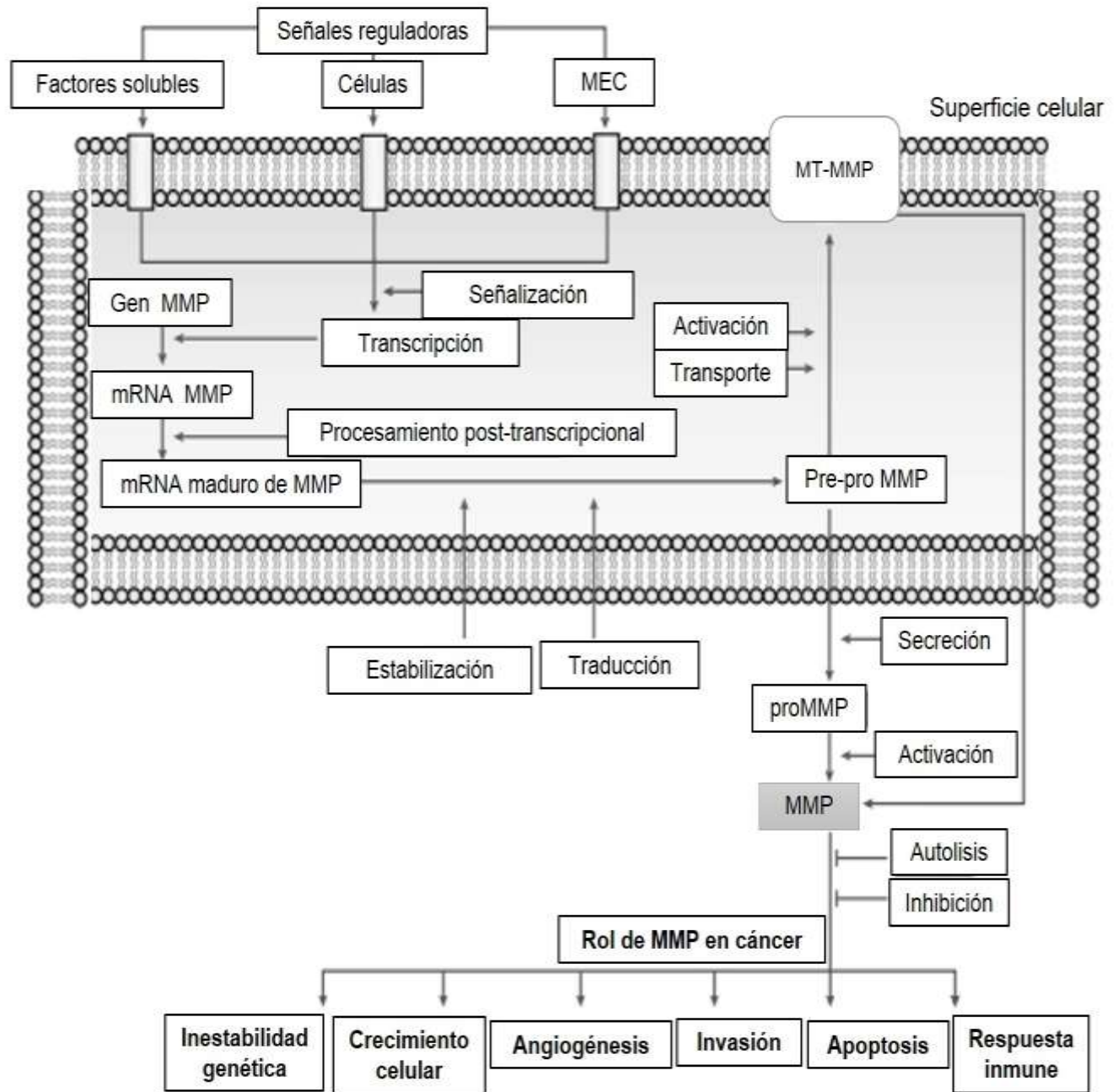


Figura 5. Regulación de la expresión y actividad de las MMP (López-Otín y Bond, 2003).

GELATINASAS

Las gelatinasas constituyen un subgrupo de MMP integrado por la gelatinasa A (MMP2) y la gelatinasa B (MMP9). Su expresión se ha establecido en las células normales, como trofoblastos, osteoclastos, neutrófilos, macrófagos y en células cancerosas donde su producción es elevada. Los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF), factor de crecimiento transformante (TGF- β 1 y β 2) y factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), regulan el incremento de MMP2 y MMP9 (Skrzypczak *et al.*, 2007).

MMP2 y 9 están involucradas en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama y su sobreexpresión está correlacionada significativamente con tumores más agresivos y de mal pronóstico; ya que degradan colágena tipo IV de las membranas basales e inducen la expresión de factores angiogénicos (Jinga *et al.*, 2006).

EL SISTEMA PLASMINÓGENO- PLASMINA

El sistema del activador del plasminógeno/plasmina se ha considerado como uno de los pasos iniciales en la activación de la cascada proteolítica en procesos de migración celular y entre sus componentes podemos señalar:

- Activadores del plasminógeno
- El plasminógeno
- La plasmina
- Los inhibidores del activador del plasminógeno 1 y 2 (PAI -1 y PAI-2)
- Receptores en la membrana

Existen dos tipos de activadores de plasminógeno: el tipo uroquinasa (PLAU) y tipo tisular (PLAT), ambos pertenecen a la familia de las serina proteasas. Estos activadores participan en la formación de plasmina (enzima activa) a partir de plasminógeno (zimógeno inactivo).

PLAT se ha relacionado con la fibrinólisis. Para activar al plasminógeno, se asocia previamente a la fibrina. Este activador se secreta en forma activa, es una proteína sérica que se sintetiza cuando se requiere la fibrinólisis (Ware *et al.*, 2005).

PLAU no se asocia con coágulos de fibrina, sino a un receptor de superficie celular específico (PLAUR). Se produce y se secreta como una sola cadena polipeptídica inactiva, para activarse se escinde en dos cadenas, su activación se potencia al unirse a PLAUR en la superficie de las células a través del dominio similar al factor de crecimiento epidérmico. La unión del pro-PLAU a PLAUR induce su activación que a su vez convierte el plasminógeno en plasmina. La activación del PLAU inicia una cascada de proteólisis en la superficie celular, que a su vez conduce a la degradación de la MEC, promoviendo así la migración celular, remodelación tisular, invasión, metástasis, implantación angiogénesis y organogénesis (Ware *et al.*, 2005).

La regulación de PLAU juega un papel clave en la mediación de la degradación de MEC y la invasión celular, su actividad es controlada por los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI) de los cuales PAI-1 es el inhibidor fisiológico predominante. PAI-1 juega un papel muy importante en varias funciones celulares como angiogénesis, homeostasis e invasión de células tumorales. La interacción PAI-1-PLAU provoca la inhibición de la actividad de proteasa de PLAU, por lo tanto no transforma el plasminógeno en plasmina y se inhibe la fibrinólisis o la degradación de MEC (Castellino y Ploplis, 2005).

La plasmina es una serina proteasa que interviene en la degradación de la MEC, por digestión proteolítica directa de alguno de sus componentes (fibronectina, laminina y fibrina) o mediante la activación de otras proteasas incluyendo metaloproteasas y colagenasas (figura 6) (Castellino y Ploplis, 2005).

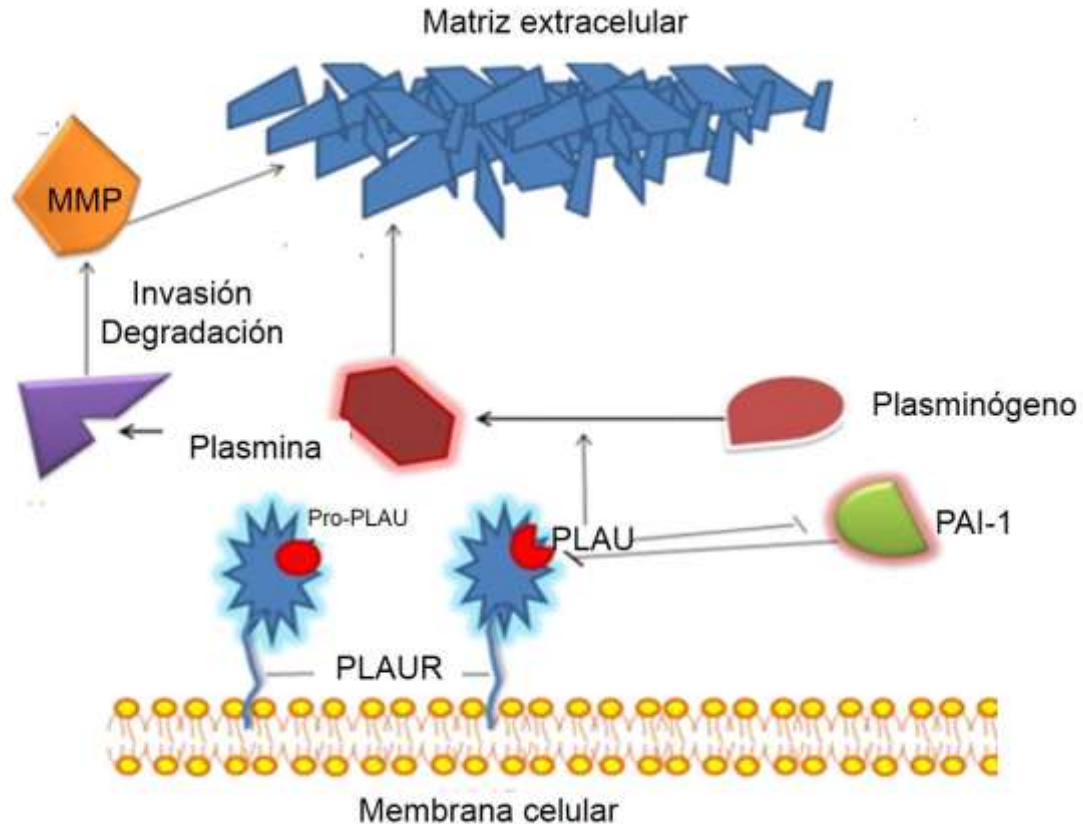


Figura 6. Sistema plasminógeno/plasmina, su activación y participación en la degradación de la matriz extracelular (Martínez-Hernández, 2011).

***Lentinula edodes* (Shitakee)**

El hongo comestible y medicinal *Lentinula edodes*, más conocido como “shiitake”, es de origen asiático y forma parte fundamental de la alimentación de esta región, donde se cultiva hace más de un milenio por su sabor y por sus propiedades nutricionales y medicinales. La morfología de Shiitake corresponde a la morfología típica de los hongos Basidiomicetos. Es un Agarical con píleo marrón oscuro de 5 a 20 cm de diámetro, de forma convexa, las laminillas son planas y blancas. El estípite es fibroso, unido central, excéntricamente y áspero en su textura. Las esporas son blancas de forma ovoide (Fung, 2006).

Dentro de la composición nutricional, Shiitake contiene vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina) y D, todos los aminoácidos esenciales, fibra dietaria, alto valor calórico y proteico, altos niveles de minerales como hierro, potasio y fósforo (Hobbs, 1996).

Dentro de sus propiedades medicinales se pueden citar: antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antiparasitaria, reguladora de la presión sanguínea y de los niveles de colesterol, antidiabético, inmunomodulador, tónico renal, hepatoprotector y potenciador sexual. Estas cualidades son debidas a la presencia de diversos metabolitos tanto secundarios como primarios (β -glucanos, policétidos y terpenos) (Ikekawa, 2001).

2. ANTECEDENTES

Desde hace más de 7000 años, los países asiáticos como China, Corea y Japón, han utilizado los macromicetos como base de su medicina tradicional y su alimentación. Uno de los hongos más utilizados por estas culturas han sido el *L. edodes* o “shiitake” que actualmente constituye el segundo hongo comestible más cultivado en el mundo (Chang, 1996). Los extractos acuosos obtenidos de carpóforos de éste hongo poseen actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* la cual está mediada por estimulación del sistema inmune debido a que contiene lentinano, un polisacárido con efecto antitumoral (Fujii *et al.*, 1979; Ng y Yap, 2002). También presenta actividad antimutagénica *in vivo*, un efecto antigenotóxico (De Lima *et al.*, 2001; Sugui *et al.*, 2003) y propiedades citostáticas e inmunoestimuladoras en términos de actividad mitogénica y co-mitogénica (Israilides *et al.*, 2008). Los polisacáridos obtenidos de *L. edodes* cuentan con una alta actividad inhibitoria contra el crecimiento tumoral al aumentar la expresión de la ciclina D1 y la caspasa 3 (Fu *et al.*, 2011).

La fracción en acetato de etilo y los extractos etanólico y acuoso de micelio de *L. edodes* inducen la muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-453 y MCF7, hepatoma (Hep G2 y Hep 3B), cáncer de colon (HT 29 y COLO 205), leucemia (HL60), la línea celular de epitelio de mama no maligna

MCF-10F y las líneas celulares de mieloma RPMI-8226 e IM-9. Debido a que inducen la expresión de la proteína pro apoptótica Bax; y un arresto en el ciclo celular al disminuir la fase de S, ya que aumenta la expresión de bax, p21, p53, ciclina D1 y la ciclina cinasa 4 (cdk4) (Fang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007).

El extracto acuso del micelio de *L. edodes* presenta un efecto inmunomodulador en pacientes de cáncer avanzado (estudios clínicos, nivel II y III) bajo tratamiento de quimioterapia; ya que disminuye los efectos secundarios causados por la quimioterapia y activa las células CD4, CD8 y T (las cuales disminuyen significativamente en pacientes que reciben quimioterapia) (Okuno y Uno, 2012). Este extracto también aumenta la calidad de vida (funciones fisiológicas, rol físico, dolor corporal, salud, vitalidad, funciones sociales, rol emocional y salud mental) y la expresión del interferón γ (IFN γ) e interleucina (IL)-10 en pacientes de cáncer de mama tratados con terapia hormonal después de cirugía (Suzuki *et al.*, 2013) y en pacientes de cáncer de mama con metástasis, tratados con quimioterapia (FEC75), donde además disminuye la hemotoxicidad (Nagashima *et al.*, 2013).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el punto de vista clínico el cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad a nivel mundial. Los principales tipos de cáncer son, los de pulmón, colon, recto, estómago, mama y cervix (International Agency for Research on Cancer, 2012).

En este contexto; podemos observar que es excepcionalmente difícil curar los tumores malignos, la prevención del cáncer puede ser una estrategia más eficaz para controlar y en última instancia, superar el cáncer. Un prometedor e importante grupo de agentes potencialmente preventivos del cáncer son aquellos derivados de productos naturales, debido a su baja toxicidad y un beneficio evidente en otras enfermedades crónicas (Lim *et al.*, 2005). Dentro de estos encontramos a los hongos comestibles, los cuales constituyen una valiosa fuente biológica debido a sus compuestos activos (Rajewska y Balasinska, 2004). El uso de los hongos con propiedades terapéuticas ha aumentado el interés de la comunidad científica y

clínica debido a su eficacia contra numerosas enfermedades y trastornos metabólicos graves como el cáncer o enfermedades degenerativas. Los efectos medicinales de los hongos y sus metabolitos, que han atraído la atención del público, son aquellos que tienen que ver con las propiedades antitumorales. El uso medicinal de los extractos de los hongos comestibles parece ser una forma más natural, menos costosa y, en general, implica un mínimo de efectos secundarios no deseados (Sliva *et al.*, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la cantidad de trabajos realizados acerca de la actividad anticancerígena de *L. edodes* no se ha probado su efecto sobre los sistemas proteolíticos extracelulares relacionados con la capacidad migratoria e invasiva de las células cancerosas.

5. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* disminuirán la expresión de enzimas proteolíticas (MMP9 y MMP2), así como la expresión del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (PLAU) en la línea celular de cáncer de mama MCF7; ya que se ha reportado que dicho hongo presenta propiedades anticancerígenas debido a la cantidad de metabolitos secundarios que contiene (β -glucanos, policétidos y terpenos).

6. OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto de los extractos metanólicos de cuerpo fructífero y micelio de *Lentinula edodes* sobre las gelatinasas A y B (MMP2 y MMP9) y la uroquinasa (PLAU) en células de cáncer de mama MCF7.

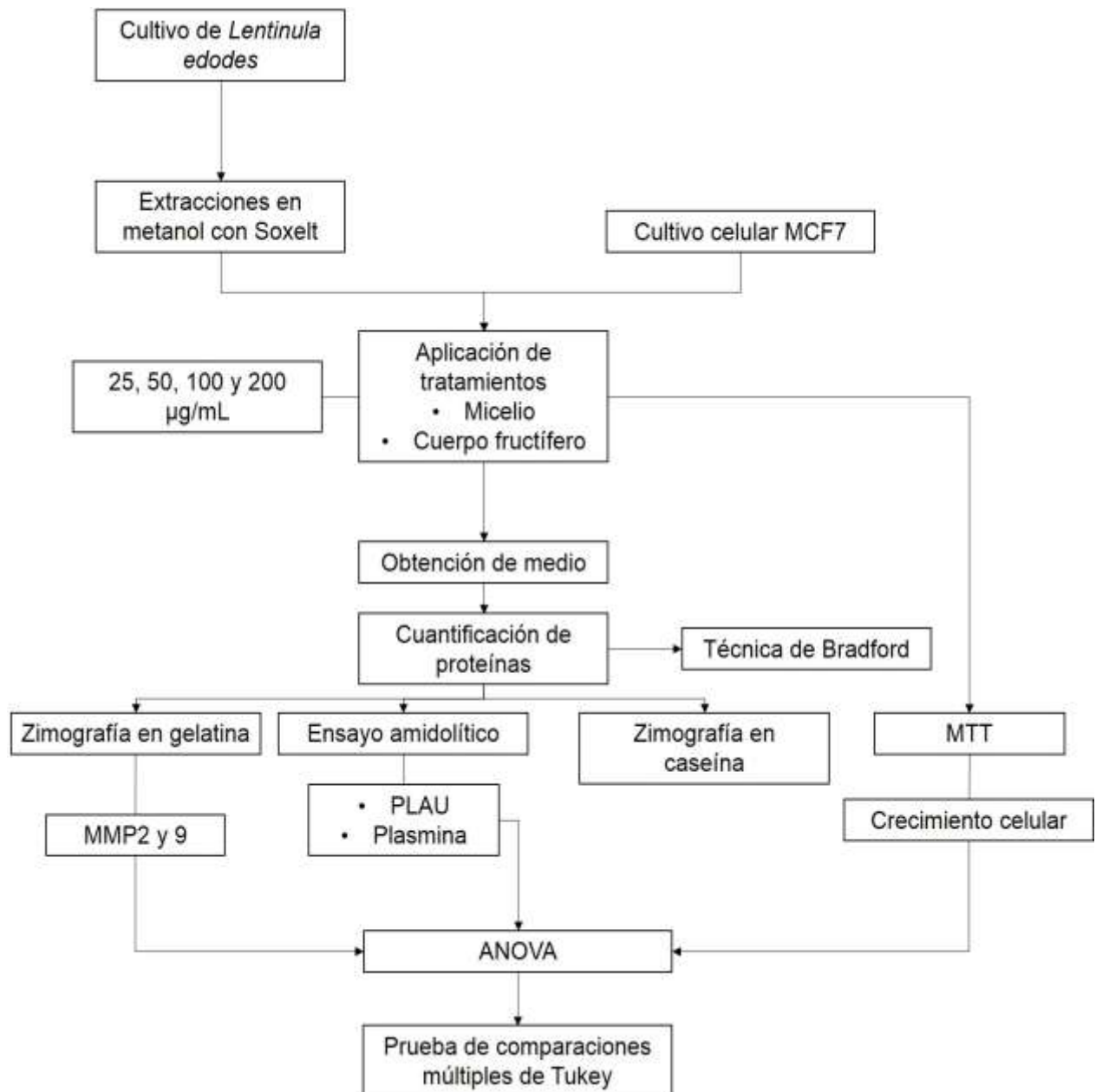
Particulares

- Obtener el extracto metanólico de cuerpo fructífero y micelio de *Lentinula edodes*.

- Determinar el efecto de los extractos metanólico de cuerpo fructífero y micelio de *Lentinula edodes* sobre los sistemas proteolíticos al evaluar: la proliferación de la población de células MCF7, el contenido de las gelatinasas MMP9 y MMP2 y la actividad de uroquinasa (PLAU).

7. MATERIALES Y MÉTODO

Con el fin de cumplir los objetivos del presente trabajo se siguió el siguiente esquema metodológico:



CULTIVO DE *Lentinula edodes*

Cultivo de micelio

El cultivo de los micelios (figura 7a) se realizó en la planta piloto y laboratorio de la enseñanza en la producción de hongos comestibles y medicinales y proyectos productivos, del Jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Dichos cultivos se realizaron en medios de cultivo sólido y líquido (papa-dextrosa).

Cuerpo fructífero

Los cuerpos fructíferos de *L. edodes* (figura 7b) fueron proporcionados por el laboratorio de Proyectos Productivos (Jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala). Se colocaron en rejilla y se pusieron a deshidratar expuestos al sol hasta que estuvieran completamente secos. Una vez deshidratados se realizó el molido en un mortero hasta quedar completamente triturado.



Figura 7. Cultivo de *L. edodes*. A) Micelio B) Cuerpo fructífero

EXTRACCIONES CON METANOL

Las extracciones con metanol (figura 8) se efectuaron en el laboratorio de Química-Biológica (cabecera L-421). Cada proceso de extracción se realizó partiendo de 4 g de peso seco de Shiitake (micelio y cuerpo fructífero) en 200 mL de metanol con un equipo Soxhelt. Cada extracción tuvo una duración de 1:30 h, una vez finalizada se destiló y se concentró a 25 mL por muestra. El material resultante se guardó en frascos color ámbar y se eliminó el disolvente liofilizando.



Figura 8. Extracción de cuerpo fructífero y micelio en metanol en equipo Soxhelt.

CULTIVO CELULAR.

Las células de cáncer de mama MCF7 (figura 9) se cultivaron en medio DMEM/F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFBi), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda. Todas las soluciones que se utilizaron en el cultivo se esterilizaron por filtración con membranas de 0.22 µm. Cuando se obtuvo un 75%-80% de confluencia, las células se despegaron con una solución de tripsina-EDTA, y se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos colocando 100 mil células por pozo (previamente se realizó un conteo de las células en una cámara de Neubauer después de teñirse con azul de tripano).

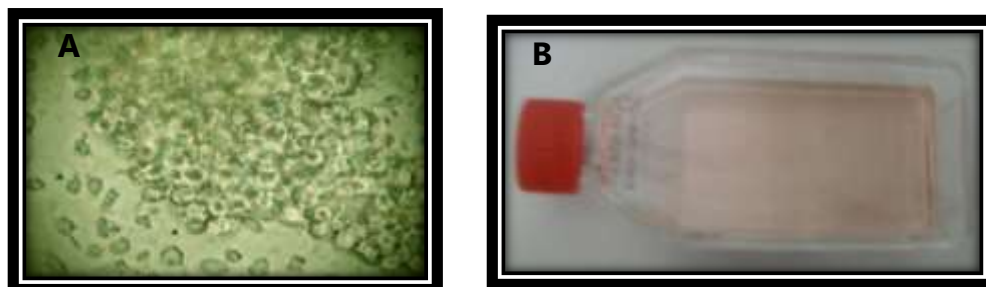


Figura 9. Cultivo de las células de cáncer de mama MCF7. A) Células MCF7 confluentes. B) Frasco de cultivo de las células.

APLICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Con el fin de aplicar los extractos a los cultivos celulares, estos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y se colocaron en medio RPMI-1640. Los extractos se aplicaron a una concentración final de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tanto para micelio como para cuerpo fructífero, una vez que las células presentaron una confluencia del 100 % en cajas de 96 pozos (100 mil células por pozo y previamente eliminado el suero). Se contó con un grupo control al cual no se le aplicó extracto.

CRECIMIENTO CELULAR

La determinación del efecto de los extractos sobre el crecimiento de las células se realizó con el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (McCauley *et al.*, 2013).

Para realizar este ensayo se sembraron 100 mil células por pozo en cajas de 96 pozos y se incubó durante 24 horas. Una vez confluentes, se eliminó el suero y se agregaron los tratamientos como se mencionó anteriormente, contando con un grupo control al cual no se le aplicó extracto, se incubó durante 24 horas. Posteriormente se agregó 10 μL de MTT a cada pozo. Se incubó durante 4 horas a

37°C en obscuridad, se agregó 10 µL de SDS por pozo y se incubó con las mismas condiciones durante 2 horas. Una vez realizado esto se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas Multiskan EX, Thermo.

El porcentaje de inhibición se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[\frac{DO \text{ Células tratadas}}{DO \text{ Células control}} \times 100 \right]$$

CONCENTRACIÓN DE LAS GELATINASAS MMP2 Y MMP9

La zimografía es una técnica electroforética que permite observar el contenido o concentración de enzimas. En el caso de proteasas, la polimerización de la poliacrilamida se realiza en presencia de gelatina soluble. De esta manera el gel resultante contendrá gelatina (colágena desnaturalizada). El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa la gelatina habrá sido degradada (Chen y Platt, 2011).

Para observar la cantidad de gelatinasas MMP2 y MMP9 secretadas por las células MCF7, 24 horas después de la aplicación de los extractos a las células se obtuvieron muestras del medio y se cuantificó la cantidad de proteínas por la técnica de Bradford. Las muestras (1mg de proteína) se separaron por electroforesis en condiciones no reductoras en geles de poliacrilamida-SDS al 10% conteniendo 1 mg/mL de gelatina de piel de porcino. La electroforesis se corrió a 4° C aplicando 15 mA/gel durante dos horas. Posteriormente los geles se lavaron dos veces por 30 minutos a 37° C en Tritón X-100 al 2.5% (v/v) para remover el SDS. La actividad enzimática se reveló incubando durante 48 horas a 37 °C en amortiguador revelador (50 mM Tris HCl pH 7.5 conteniendo 10 mM CaCl₂, 150 mM de NaCl y 0.5% Tritón X-100). Después se tiñó con azul de Coomassie R-250 al 0.5%, las proteínas que degradan gelatina se identificaron como zonas blancas de lisis en un fondo azul.

ACTIVIDAD DE UROQUINASA (PLAU)

PLAU se evaluó midiendo la actividad de la plasmina formada a partir de plasminógeno mediante un ensayo amidolítico empleando como sustrato a D-Val-Leu-Lis-4-nitranilina, el cual es roto por la plasmina en un péptido residual y 4-nitroanilina (p-NA). El sustrato natural de la plasmina es la fibrina. La plasmina corta uniones peptídicas particulares de la fibrina, pero también puede ejercer su acción sobre fragmentos peptídicos que contengan los sitios específicos de corte. Existen reactivos capaces de evidenciar la acción de la enzima denominados sustratos cromogénicos y la actividad enzimática sobre ellos se denomina actividad amidolítica. El sustrato cromogénico contiene p-NA, que al ser liberado tiene color amarillo (absorbe a 405 nm); por lo tanto la actividad de la plasmina es proporcional a la intensidad del color desarrollado y puede cuantificarse (Ellis *et al.*, 1987).

El ensayo se realizó a 37°C en una mezcla de reacción de 200 µL, conteniendo 50 mM Tris pH 7.4, NaCl 110 mM, plasminógeno 10 µg/mL y 0.3 mM del sustrato cromogénico, se utilizaron muestras de células tratadas con los extractos metanólicos de cuerpo fructífero y micelio a las concentraciones antes mencionadas. La absorbancia de pNA fue seguida espectrofotométricamente a 405 nm con el empleo de un lector de microplacas. La actividad de plasmina se calculó empleando el coeficiente de extinción molar para pNA ($\epsilon_{405 \text{ nm}} = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se tomaron alícuotas de los pozos de la placa y se realizaron zimografías de caseína.

ZIMOGRAFÍA EN CASEÍNA

La zimografía en caseína se llevó a cabo para analizar productos derivados tanto del plasminógeno como la plasmina. Las muestras se analizaron por electroforesis en condiciones no reductoras en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, conteniendo 1 mg/mL de α -caseína de bovino. Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces durante 30 min en Tritón X-100 al 2% (v/v) y se incubaron por 24 h a 37°C en amortiguador de glicina 100 mM, EDTA 10 mM (para inhibir MMP) a pH 8.3. Después de teñir con azul de Coomassie R-250, alrededor de 4 horas, se

identificaron las bandas caseinolíticas como zonas claras de lisis contra un fondo azul.

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Los zimogramas fueron captados en un analizador de geles de Alpha Innotech Corporation con un gabinete Multi-Image™ y la zona de actividad enzimática se valoró por densitometría, usando el software del aparato (Alpha-Imager 2000). La cantidad de enzima fue expresada en el valor de densidad integrado proporcionado automáticamente por el mismo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento fue repetido por lo menos tres veces, los datos se representaron con la media y el error estándar. Se realizó una ANOVA para comparar los diferentes grupos experimentales y determinar si presentaban diferencias significativas, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El análisis se llevó a cabo en el programa Graph Pad Prism 5.3 de GraphPad Software.

8. RESULTADOS

PROLIFERACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS MCF7.

Al estudiar el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* sobre el crecimiento de la población de células MCF7 por el ensayo de MTT se observó que ambos extractos a todas las dosis estudiadas inhibieron en aproximadamente un 60% su crecimiento con respecto al grupo control; sin embargo no se observó una diferencia significativa entre las dosis empleadas o el tipo de extracto (figura 10).

CONTENIDO DE LAS GELATINASAS MMP9 Y MMP2

En los zimogramas realizados en geles copolimerizados con gelatina se detectaron bandas correspondientes a las gelatinasas MMP9 y MMP2. Las bandas de MMP2 fueron más intensas que las de MMP9.

El contenido de MMP9 en el medio, disminuyó cerca del 40% a las dosis de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto metanólico miceliar; sin embargo a la dosis más alta (200 $\mu\text{g/mL}$) el efecto inhibitorio es menor y no llegó a ser significativo. Mientras que para la cantidad de MMP2, el extracto metanólico de micelio la disminuyó significativamente a una dosis de 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$, revirtiéndose el efecto a la dosis más alta (figura 11).

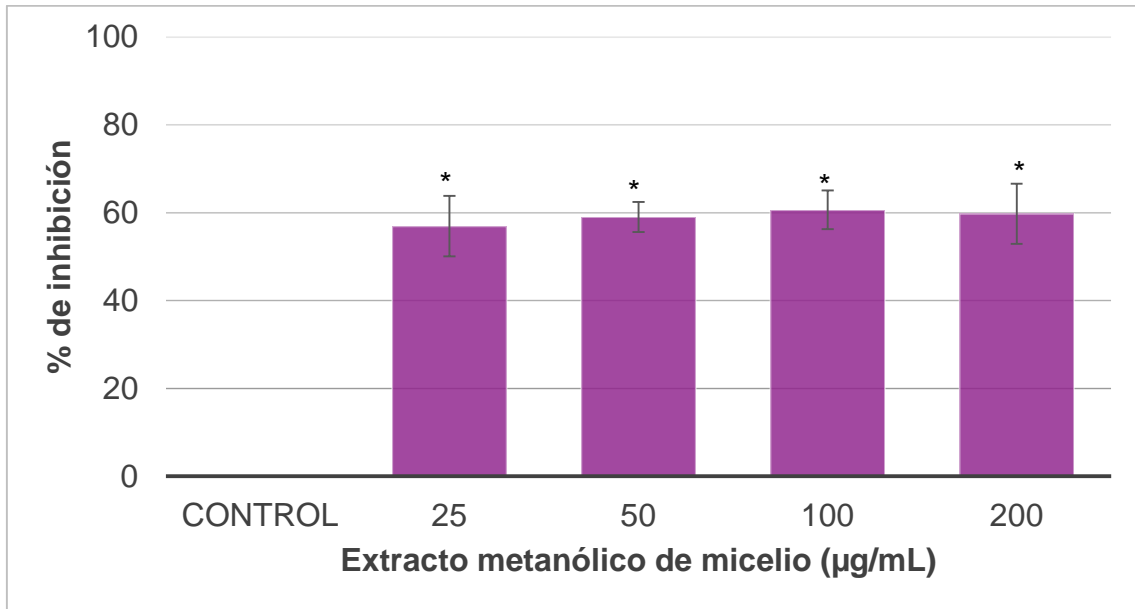
Por otro lado, el extracto de cuerpo fructífero disminuyó en un 40% aproximadamente el contenido de MMP9 y MMP2 en el medio condicionado a todas las dosis estudiadas, siendo más evidente a una dosis de 25 $\mu\text{g/mL}$ para la MMP9 y de 100 $\mu\text{g/mL}$ para la MMP2, aunque no se presentaron diferencias significativas entre las dosis estudiadas, ni entre ambos extractos (figura 12).

ACTIVIDAD DE UROQUINASA (PLAU)

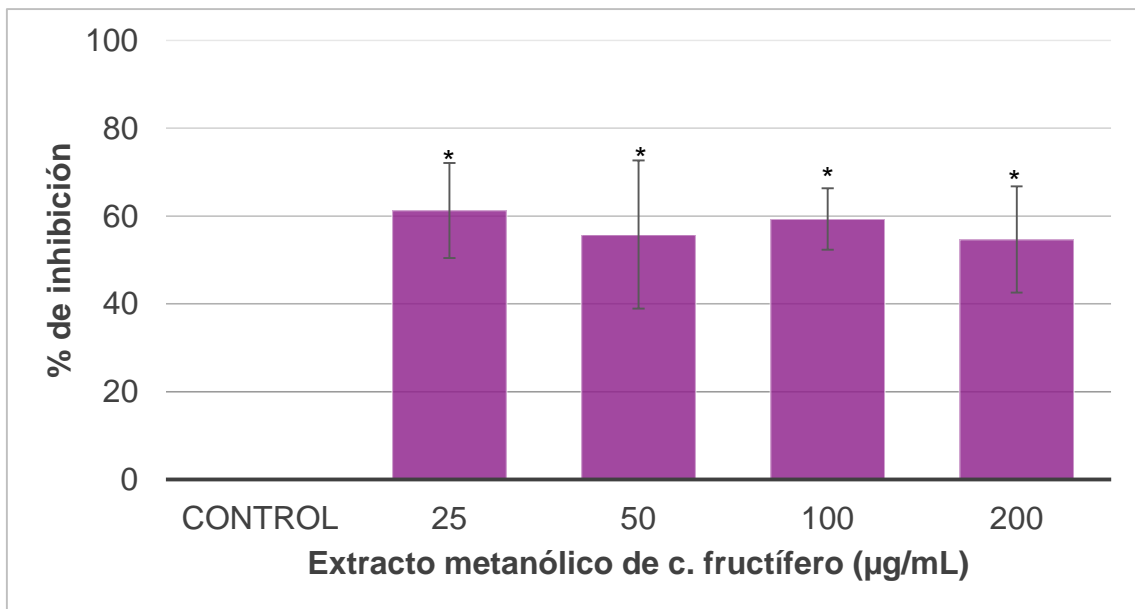
La actividad de uroquinasa se evaluó en un ensayo amidolítico en dos pasos, primero la conversión del plasminógeno a plasmina y después se valoró la cantidad de plasmina formada con un sustrato, esto como una medida de la actividad de la uroquinasa; es decir se cuantificó la cantidad de plasmina formada por tiempo.

Como resultados se encontró que la actividad de plasmina obtenida a partir de plasminógeno y PLAU en el ensayo amidolítico disminuyó significativamente en las células tratadas con todas las dosis de ambos extractos estudiados en comparación a los grupos control, sin presentarse diferencias entre las dosis estudiadas ni entre ambos tipos de extractos (figura 13).

Al estudiar los productos del ensayo amidolítico en zimografías de caseína se observó la presencia de bandas con actividad caseinolitica correspondientes a plasminas de diferente peso molecular. Se encontró que la cantidad de plasmina formada fue menor en los tratamientos con ambos extractos utilizados en comparación con los grupos control, donde se observó la presencia de plasminas de diferentes pesos moleculares y en mayor cantidad (figuras 14 y 15).

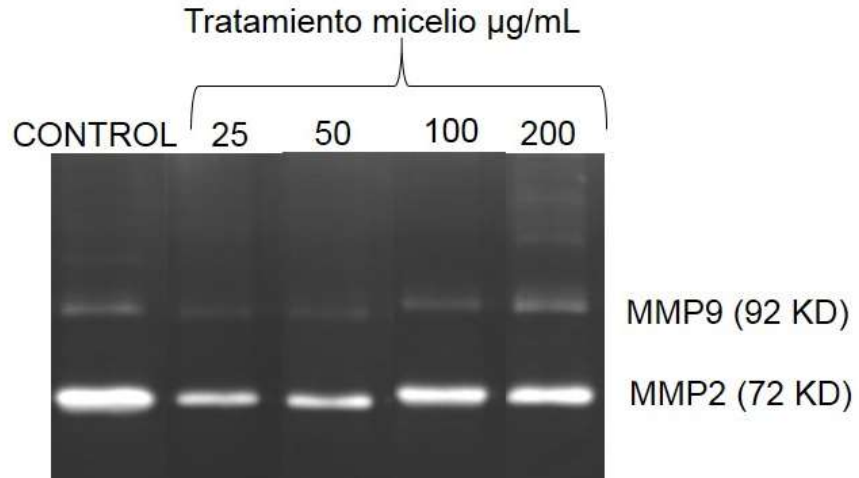


A

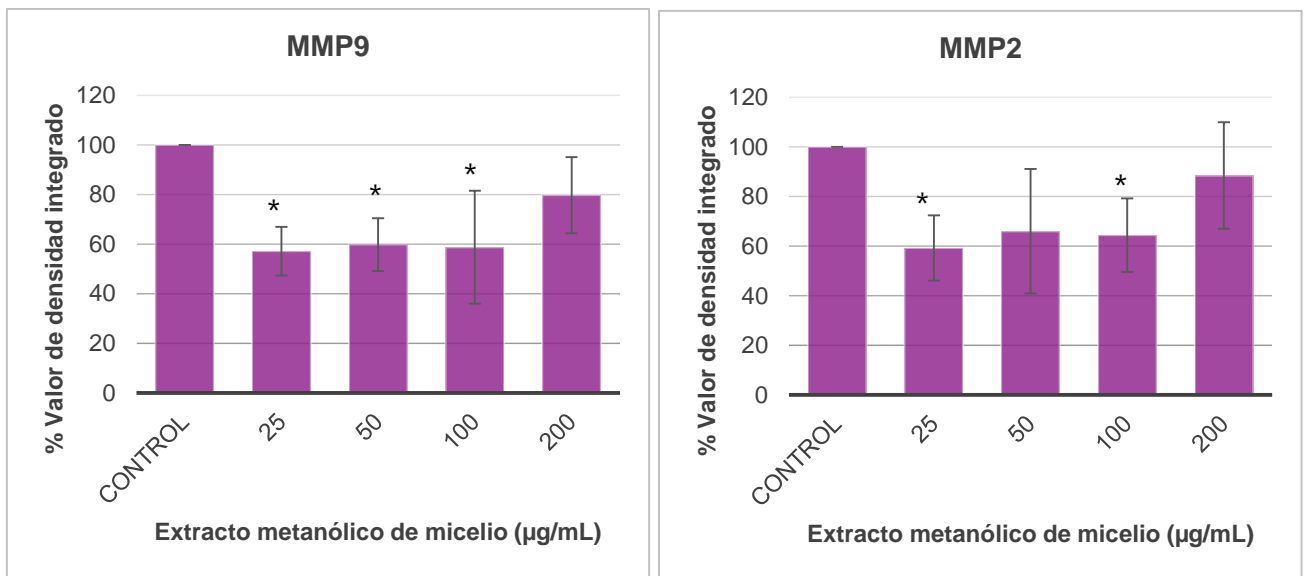


B

Figura 10. Efecto de los extractos metanólicos de micelio (A) y cuerpo fructífero (B) sobre el crecimiento de la población de células MCF7. Los resultados se expresan en relación al grupo control. El crecimiento de la población celular se realizó por el ensayo de MTT (* $P \leq 0.05$).

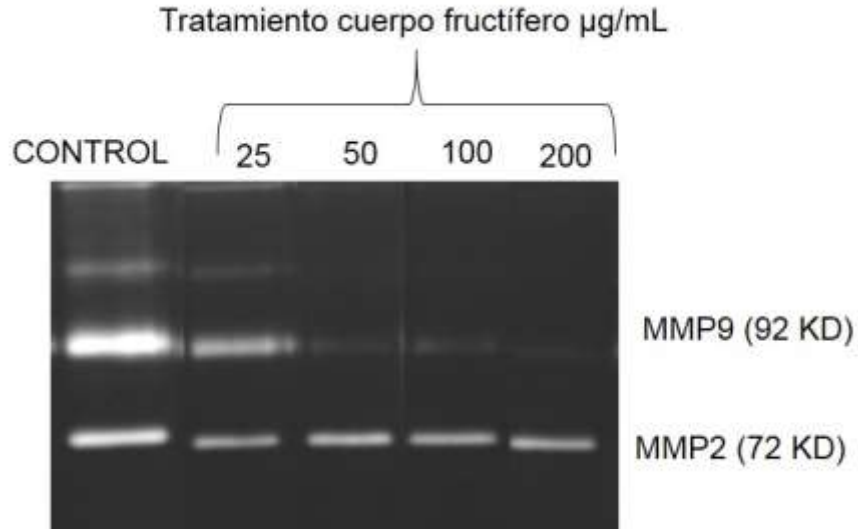


A

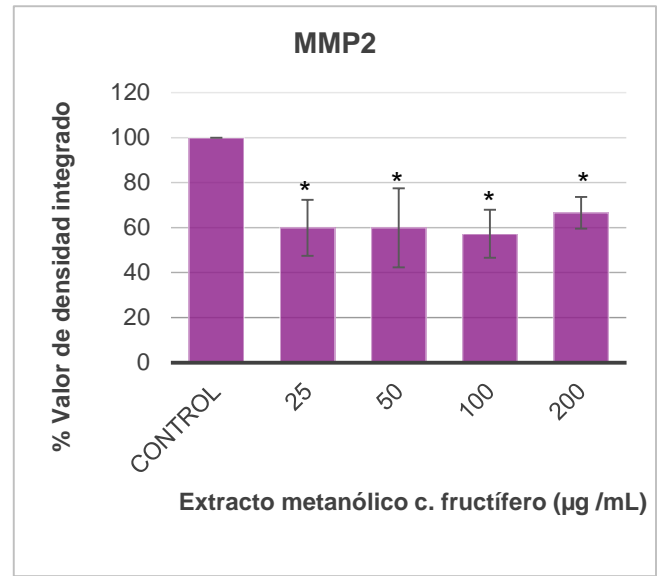
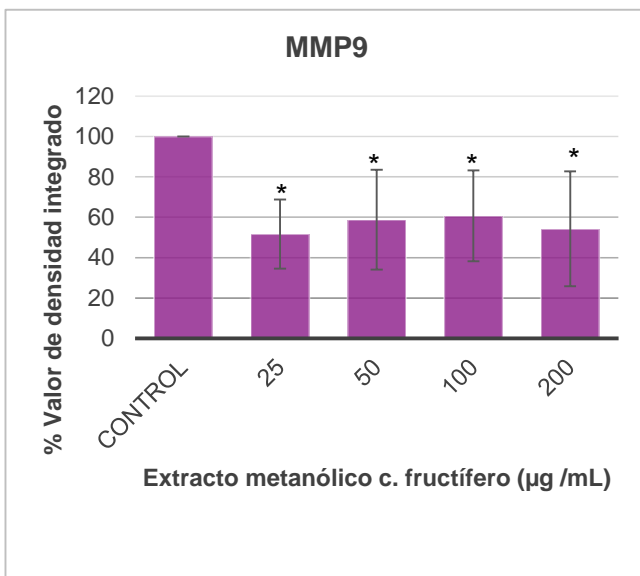


B

Figura 11. Efecto de los extractos metanólicos de micelio sobre el contenido de gelatinasas en el medio condicionado por células MCF7. Se presenta un zimograma de geles copolimerizados con gelatina del medio condicionado por células MCF7 al aplicar diferentes concentraciones de extracto metanólico de micelio de *L. edodes* (A), seguida del análisis densitométrico de las bandas del gel (B) (* $P \leq 0.05$).



A



B

Figura 12. Efecto de los extractos metanólicos de cuerpo fructífero sobre el contenido de gelatinasas en el medio condicionado por células MCF7. Se presenta un zimograma de geles copolimerizados con gelatina del medio condicionado por células MCF7 al aplicar diferentes concentraciones de extracto metanólico de micelio de *L. edodes* (A), seguida del análisis densitométrico de las bandas del gel (B) (* $P \leq 0.05$).

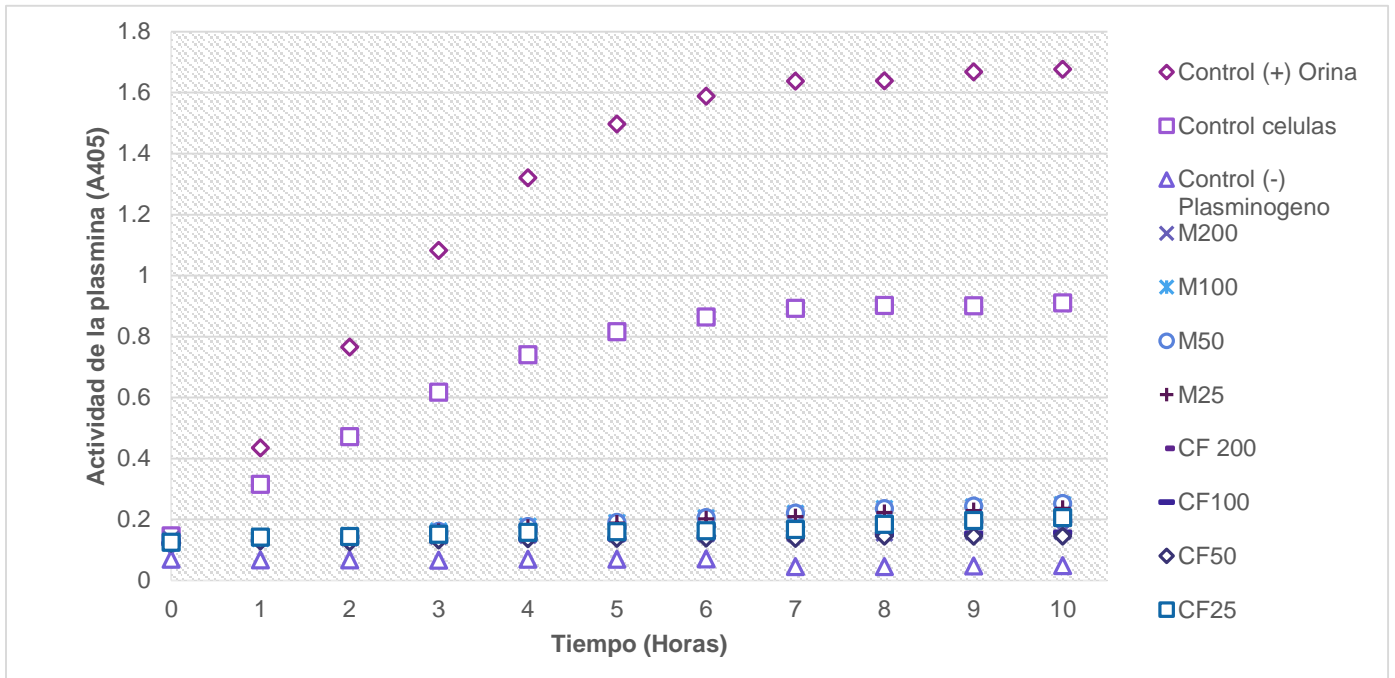
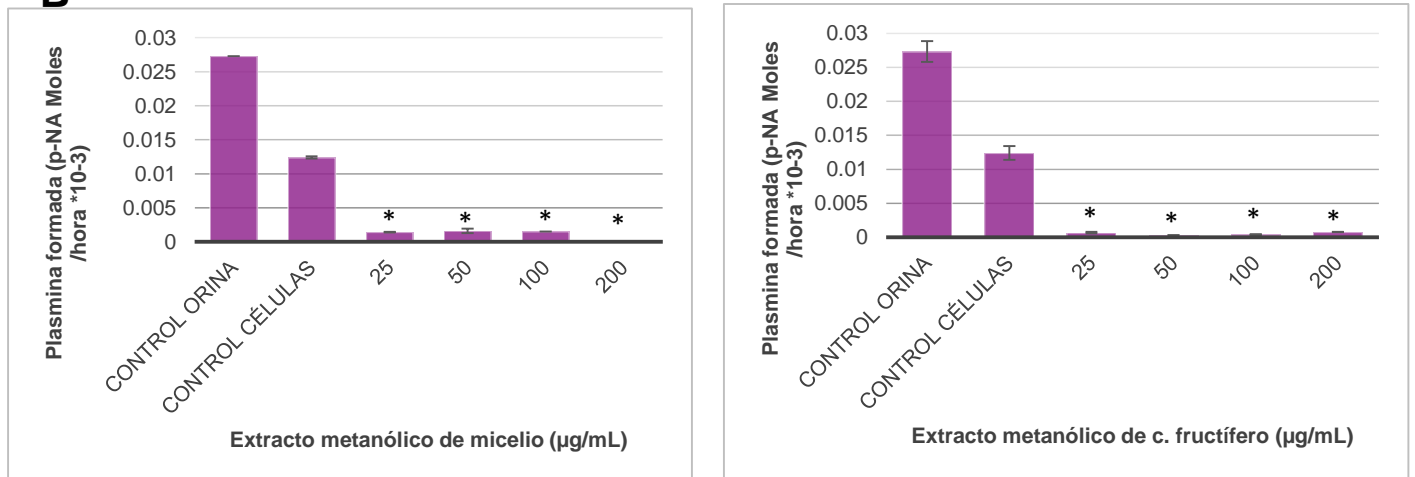
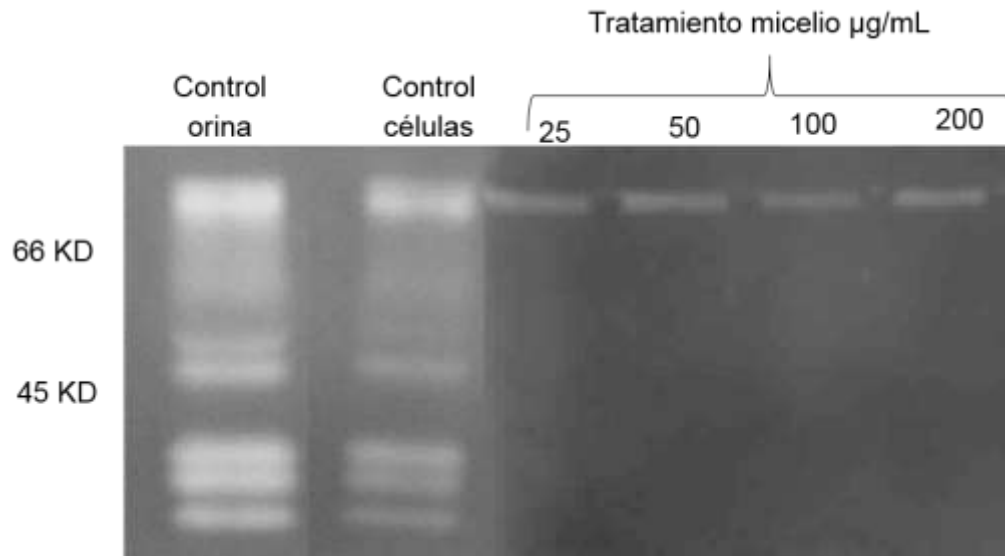
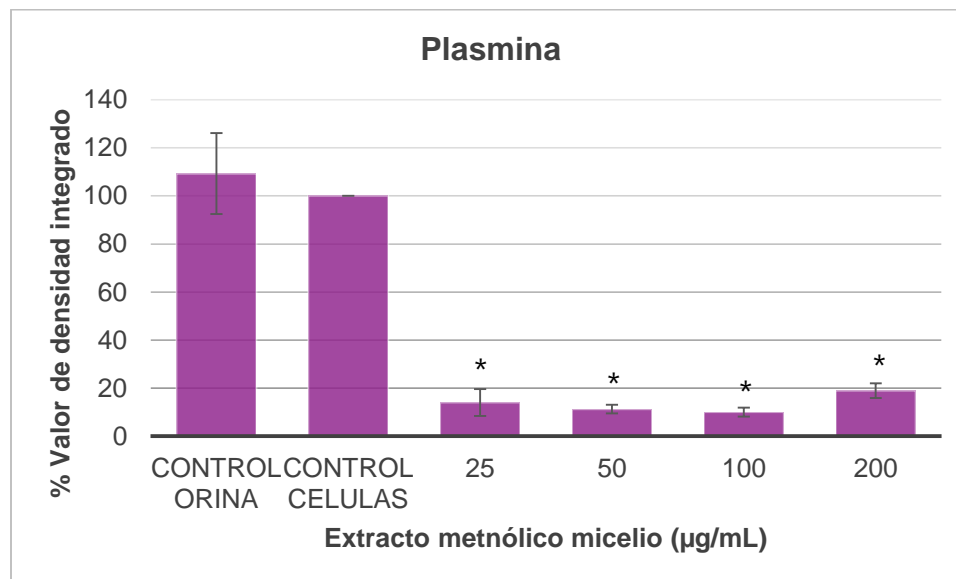
A**B**

Figura 13. Efecto de los extractos metanólicos de “shitake” sobre la actividad del activador del plasminógeno en el medio condicionado por células MCF7. Después de incubar con plasminógeno, se siguió la actividad de plasmina a distintos tiempos mediante el ensayo amidolítico (A) y posteriormente se evaluó las pendientes de las curvas (B). Se presentan las medias de tres experimentos de los controles positivo (orina humana), negativo (plasminógeno sin PLAUI) y células MCF7 sin extracto, y al aplicar 25, 50, 100 y 200 µg/mL de extracto metanólico de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* en las células MCF7 (* P≤0.05).

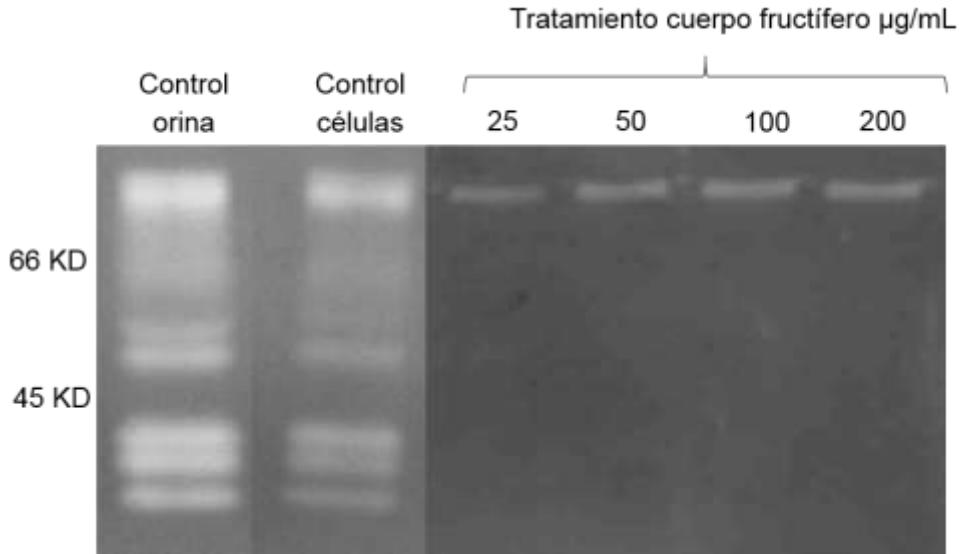


A

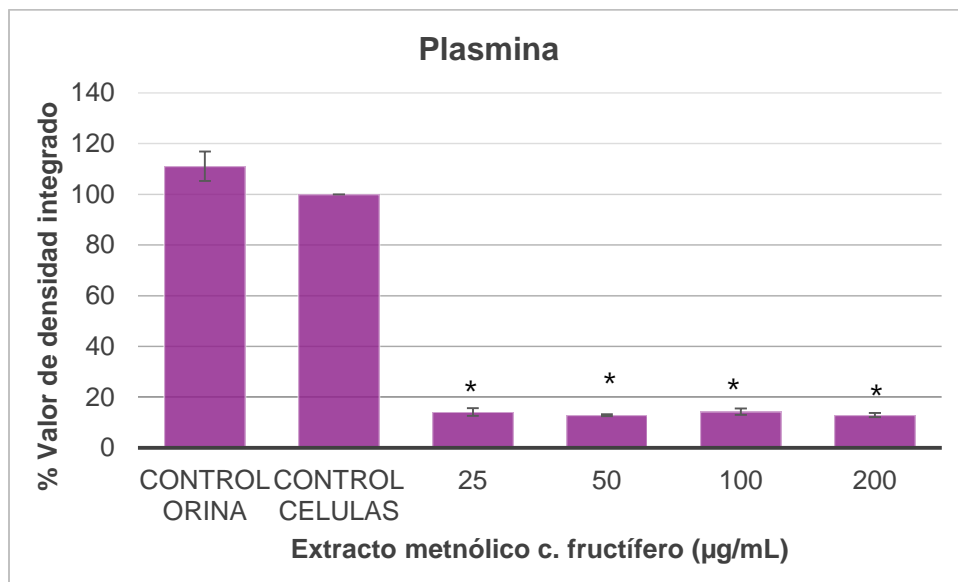


B

Figura 14. Efecto del extracto metanólico de micelio de shitake sobre la formación de plasmina a partir de plasminógeno en el medio condicionado por células MCF7. La plasmina se detectó por zimografía de caseína en la línea celular MCF7 al aplicar diferentes cantidades de extracto metanólico de micelio de *L. edodes* (A), seguida del análisis densitométrico de las bandas del gel (B) (* $P \leq 0.05$).



A



B

Figura 15. Efecto del extracto metanólico de cuerpo fructífero de shitake sobre la formación de plasmina a partir de plasminógeno en el medio condicionado por células MCF7. La plasmina se detectó por zimografía de caseína en la línea celular MCF7 al aplicar diferentes cantidades de extracto metanólico del cuerpo fructífero de *L. edodes* (A), seguida del análisis densitométrico de las bandas del gel (B) (* $P \leq 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado, el cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. En el año 2002 causó la muerte de 6,7 millones de personas y se diagnosticaron en el mundo aproximadamente 10.9 millones de nuevos casos de cáncer, y se estima que en el año 2020 la cifra podría llegar a los 10,9 millones de muertes. Es por esto, que la búsqueda de nuevas drogas antitumorales se ha convertido en una de las principales investigaciones de los últimos tiempos (Bingham *et al.*, 2003).

Muchos estudios realizados sobre diferentes grupos de poblaciones, especialmente en el continente asiático demuestran la directa relación que tiene el consumo de una dieta en base a productos naturales, sobre la reducción del riesgo de adquirir algún tipo de cáncer (Greenwald, 2002). Es así, como la búsqueda de drogas antitumorales más seguras y menos nocivas para el paciente ha llevado al estudio de muchos agentes naturales, entre estos, han sido de gran interés los compuestos extraídos a partir de hongos. Específicamente, los basidiomicetos, por contener polisacáridos con gran actividad antitumoral sobre diferentes cánceres humanos, de acción selectiva sobre células tumorales (Yang *et al.*, 2005), y con ausencia de efectos secundarios severos, además de ser compatibles con los protocolos de la quimioterapia y radioterapia (Kidd, 2000).

En este contexto de búsqueda de nuevos métodos terapéuticos oncológicos, en este trabajo se evaluó el efecto de los extractos metanólicos de cuerpo fructífero y micelio de *L. edodes* sobre el crecimiento de la población celular, el contenido de las gelatinasas MMP9 y MMP2 y la actividad de uroquinasa (PLAU) en la línea celular de cáncer de mama MCF7.

CRECIMIENTO EN LA POBLACIÓN CELULAR

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que el crecimiento de la población de células de la línea MCF7 se inhibe en un 60 % al aplicar tanto el extracto metanólico de micelio, como el del cuerpo fructífero de *L. edodes* a las

concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Si bien, este efecto inhibitorio aún no está completamente dilucidado, existen dos mecanismos probables: un efecto citotóxico induciendo muerte celular o un efecto citostático provocando la detención del ciclo celular (Cui *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2008). Según lo señalado por Vetcher, (2003), las drogas que actúan previo a la fase S, cuando las células se encuentran en estado de reposo (fase G0 y G1) no permitiendo la división celular, son llamadas citostáticas; y si actúan después de este punto provocando el bloqueo de la división celular e induciendo a la muerte celular son llamadas citotóxicas. Lamentablemente nuestros resultados aún no nos permiten determinar con exactitud el mecanismo exacto; sin embargo Israilides y colaboradores en 2008 encontraron que el extracto acuoso tanto de micelio, como de cuerpo fructífero a una concentración de 10 a 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibe la proliferación de las células MCF7 al inducir un efecto citostático y citotóxico, por lo que podríamos esperar un efecto similar con los extractos utilizados en este estudio. De igual manera nuestros resultados coinciden con lo encontrado por Fang y colaboradores en 2006, quienes reportan que los extractos con acetato de etilo de *L. edodes* a una concentración de 50 mg/L disminuye la proliferación celular en un 50 % en células de cáncer de mama MDA-MB-453 y MCF7, la línea celular de epitelio de mama no maligna MCF-10F y las líneas celulares de mieloma RPMI-8226 y IM-9, debido a que *L. edodes* induce la muerte celular por apoptosis al inducir la sobre expresión de la proteína pro apoptótica Bax y a que se da un arresto en el ciclo celular al disminuir la fase de S, la cual se asoció a la regulación de la expresión de bax, p21, ciclina D1 y la cdk4.

GELATINASAS MMP9 Y MMP2

De acuerdo con Jinga y colaboradores (2006) las MMP 2 y 9 están involucradas en el crecimiento y metástasis del cáncer de mama y su sobreexpresión está correlacionada significativamente con tumores más agresivos y de mal pronóstico. Al estudiar el efecto de los extractos metanólicos de micelio y cuerpo fructífero sobre la cantidad de MMP9 y MMP2 secretada por las células de cáncer de mama MCF7 se encontró que el contenido de MMP9 en el medio, disminuyó cerca del 40% a las dosis de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico miceliar; sin embargo a la dosis

más alta (200 µg/mL) el efecto inhibitorio no se presentó, lo mismo sucedió en el caso de la MMP2, donde este extracto disminuyó significativamente a estas enzimas a las dosis de 25 y 100 µg/mL, revirtiéndose el efecto a la dosis más alta; para el caso del extracto de cuerpo fructífero el contenido de ambas enzimas disminuyó cerca del 40 %, sin presentarse una respuesta dosis dependiente. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Sun-Mi y colaboradores en 2000, quienes aplicaron el extracto acuoso de polisacáridos obtenidos de *L. edodes* a una dosis de 10, 20, 40, 80, 100 y 200 mg/mL en las líneas celulares de cáncer HT 1080, B16-F10 y S-180 obteniendo como resultados que la expresión de MMP9 disminuye en relación a la dosis, siendo más evidente a una concentración de 100 mg/mL, pero el efecto se revierte a una dosis de 200 mg/mL; mientras que para MMP2 no se observa una respuesta respecto a la dosis, observándose un mayor efecto a una concentración de 60 mg/mL y de igual manera a las dosis más altas se revierte el efecto.

ACTIVIDAD DE PLAU

Uno de los mecanismos para la regulación de las MMP, es el sistema plasminógeno/plasmina. El plasminógeno es activado por los activadores del plasminógeno, entre ellos PLAU los cuales efectúan una proteólisis parcial de la proteína para convertirla en plasmina activa, quién degrada a la fibrina o activa a otras MMP (Filippov *et al.*, 2005; Tsai, 2006). La degradación de la MEC o activación de MMP mediadas por plasmina es inhibida por PAI-1, el cual es el principal inhibidor de PLAU y PLAT. La interacción PAI-1-PLAU provoca la inhibición de la actividad degradativa del PLAU, por lo tanto no transforma el plasminógeno en plasmina y se inhibe la degradación de MEC, lo que se transforma en un gran número de patologías como son cáncer, diabetes, entre otras (Hayden *et al.*, 2005). En este trabajo los extractos metanólicos de micelio y cuerpo fructífero a todas las dosis estudiadas (25, 50, 100 y 200 µg /mL) disminuyeron la actividad de transformación de plasminógeno a plasmina en el medio condicionado por células de cáncer de mama MCF7, lo que sugiere que los extractos disminuyen la actividad de PLAU en estas células. No se han reportado estudios donde se relacione el uso directo de los extractos de *L. edodes* sobre la expresión de PLAU. Sin embargo se ha reportado

que *Ganoderma lucidum*, un hongo que comparte efectos quimiopreventivos con *L. edodes*, debido a la presencia de polisacáridos en común (Kim *et al.*, 1999), disminuye la proliferación, migración e invasión celular en la línea celular invasiva de cáncer de mama MDA-MB-231, debido a que suprime la secreción de PLAU (Jiang *et al.*, 2011). Lo cual coincide con nuestros resultados donde se observó una disminución de la proliferación celular y de la actividad de PLAU al aplicar los extractos de *L. edodes*.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados y discutidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- a. Se presentó una inhibición del 60% aproximadamente en el crecimiento de la población de células MCF7 al aplicar los extractos de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* a todas las dosis estudiadas, el cual podría deberse a un efecto citotóxico induciendo muerte celular o un efecto citostático provocando la detención del ciclo celular o ambos.
- b. Los extractos metanólicos de micelio y cuerpo fructífero de “Shiitake” disminuyen la concentración de MMP2 y MMP9 secretadas por las células MCF7, sin presentarse una respuesta en relación a la dosis usada.
- c. La actividad de transformación de plasminógeno a plasmina en las células de cáncer de mama MCF7 disminuyó al aplicar los extractos de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* a todas las dosis empleadas, lo que sugiere que los extractos disminuyen la actividad de PLAU en estas células.
- d. Si bien los resultados obtenidos de este estudio indican que los extractos de micelio y cuerpo fructífero de *L. edodes* son capaces de inhibir el crecimiento de la población de células de la línea celular MCF7 y disminuir la secreción de las MMP9 y MMP2, y la actividad de PLAU, es necesario la realización de más ensayos para lograr comprender de mejor manera el mecanismo por el cual estos extractos tienen este efecto sobre las células tumorales, lo que abriría nuevos horizontes como potenciales agentes quimioterapéuticos, coadyuvantes de terapias farmacológicas y agentes como quimiopreventivos.

11. LITERATURA CITADA

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Rafi M., Roberts K., Walter P.** 2008. Molecular Biology of the Cell. Garland Science. 5ta edición. EUA. Pp: 1178.
- American Cancer Society.** 2009. Breast cancer facts and figures 2009-2010. Atlanta: American cancer society, Inc. En: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/f861009final90809pdf>. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2013.
- Arvelo F., Cotte C.** 2006. Metalloproteinases in tumor progression. Invest Clin. 47: 185-205.
- Beaulieu N., Bloom D., Bloom L., Stein R.** 2009. Breakaway: The global burden of cancer- challenges and opportunities. The economist intelligent. En: <http://www.livestrong.org/pdfs/GlobalEconomicImpact>. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2013.
- Bingham S., Day N., Luben R., Ferrari P., Slimani N., Norat T., Clavel-Chapelon F., Kesse E., Nieters A., Boeing H., Tjønneland A., Overvad K., Martinez C., Dorronsoro M.** 2003. Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation in to Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. Lancet. 361:1496- 1501.
- Boyle P., Levin B.** 2013. World cancer report. World Health Organization e International Agency for Research in Cancer. En: <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/index.php>. Fecha de consulta: 14 de noviembre de 2013.
- Carnegie J., Cabaca O.** 1993. Extracellular matrix composition and resilience: two parameters that influence the in vitro migration and morphology of rat inner cell mass-derived cells. Biol Reprod. 148(2):287-299.
- Cascales-Angosto M., Álvarez-Gómez A.** 2010. Metalloproteinases, matriz extracelular y cáncer. An. R. Acad. Nac. Farm.76 (1): 59-84.

- Castellino F., Ploplis V.** 2005. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 93(4):647-654.
- Chang R.** 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr. Rev.* 54(11):S91-S93.
- Chen B., Platt M.** 2011. Multiplex zymography captures stage-specific activity profiles of cathepsins K, L, and S in human breast, lung, and cervical cancer. *J Transl Med.* 14:1-12.
- Coronato S., Laguens G., Di Girolamo V.** 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA.* 72: 495-502.
- Cui F., Li Y., Xu Y., Liu Z., Huang D., Zhang Z., Tao W.** 2007. Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Toxicol In Vitro.* 21: 417-427.
- De Lima P., Delmanto R., Sugui M., Da Eira A., Salvadori D., Speit G., Ribeiro L.** 2001. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. *Mutat Res.* 496: 23–32
- Ellis V., Scully M., Kakkar VV.** 1987. Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study. *J Biol Chem.* 262(31) 14998-15002.
- Fang N., Li Q., Yu S., Zhang J., He L., Ronis M., Badger T.** 2006. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by an ethyl acetate fraction from shiitake mushrooms. *J Altern Complement Med.* 12(2):125-132.
- Filippov S., Koenig G., Chun T., Hotary K., Ota I., Bugge T.** 2005. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med.* 202:663-71.

- Folgueras, A., Pendas A., Sánchez L., López-Otín C.** 2004. Metalloproteinasas in cancer: from new function to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 48: 411-424.
- Fu H., Guo W., Yin H., Wang Z., Rui-dong L.** 2011. Inhibition of *Lentinus edodes* polysaccharides against liver tumour growth. *Int J Phys Sci.* 6(1): 116-120
- Fujii T., Maeda H., Suzuki F., Ishida N.** 1979. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, Ks-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J Antibiot (Tokyo).* 11: 1079-90.
- Fung, Y.** 2006. Evaluación de la actividad anticancerígena e inmunomoduladora del hongo *Lentinula edodes* Berk. Pegler (Shiitake) cultivado sobre residuos agroindustriales colombianos. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Nacional de Colombia. Pp: 115.
- Gialeli C., Theocharis A., Karamanos N.** 2011. Roles of matrix metalloproteinasas in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 278: 16-27
- Greenwald P., Milner J., Anderson D., McDonald S.** 2002. Micronutrients in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21:217-230.
- Hanahan D., Weinberg R.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57–70.
- Hanahan D., Weinberg R.** 2011. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144: 646–674.
- Hayden M., Sowers J., Tyagi S.** 2005. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovasc Diabetol.* 4:9.
- Hobbs, C.** 1996. Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing e culture. 3. ed. Loveland, Interweave Press Inc. EUA. p. 252.

Ikekawa, T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. *Int J Med Mushrooms*.3: 291–298.

Instituto Nacional de Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EUA.
En: [www. cancer.gov/espanol/tipos/seno](http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno). Fecha de consulta: 6 de noviembre de 2013.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. México: INEGI, 2007.

International Agency for Research on Cancer. 2012. En: <http://www.iarc.fr/>.
Fecha de consulta: 21 de noviembre de 2013.

Israilides C., Kletsas D., Arapoglou D., Philippoussis A., Pratsinis H., Ebringerová A., Hríbalová V., Harding S. 2008. In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*. 15: 512–519

Jiang J., Wojnowski R., Jedinak A., Sliva D. 2011. Suppression of proliferation and invasive behavior of human metastatic breast cancer cells by dietary supplement Breast Defend. *Integr Cancer Ther*. 10(2):192-200.

Jiménez E., Berruguilla E., Romero I., Algarra I., Collado A., Garrido F., Garcia A. 2008. The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer*. 8:1-11.

Jinga D., Blidaru A., Condrea I., Ardeleanu C., Dragomir C., Szegli G., Stefanescu M., Matache C. 2006. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med*. 10(2):499-510.

Kadler K. 2004. Matrix loading: assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Tod*. 272(1):1-11.

- Kidd, P.** 2000. The use of mushroom glycans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev.* 5: 4-26.
- Kim H., Kacew S., Lee B.** 1999. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis miller*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis.* 20(8):1637-1640.
- Knaul F., López- Carrillo L., Lazcano-Ponce E., Gómez- Dantes E.** 2009. Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud Pública Mex.* 51 Suppl 2:s138-140.
- Lim D., Tyner A., Park J., Lee J., Choi Y., Park J.** 2005. Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21CIP1/WAF1. *J Cell Physiol.* 205: 107-113.
- López- Carrillo.** 2003. El cáncer mamario: epidemiología y prevención. En: El cáncer en México. Ed. Tamayo. México. El colegio Nacional. Pp: 443-456.
- López-Otín, C. Bond, J.** 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 283: 31433-31437.
- Martínez-Hernández G.** 2011. Efecto de matriz extracelular en la diferenciación del trofoblasto de ratón. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. UNAM. México. Pp: 119.
- McCauley J., Zivanovic A., Skropeta D.** 2013. Bioassays for Anticancer Activities. En: *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Pp: 191-205.
- Meza-Junco J., Montañó-Loza A., Aguayo-González A.** 2006. Bases moleculares del cáncer. *Rev Inv Clín.* 58(1): 56-70
- Mwale F., Tchetina E., Wu C., Poole A.** 2002. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res.* 17 (2):275-83.

- Nagashima Y., Maeda N., Yamamoto S., Yoshino S., Oka M.** 2013. Evaluation of host quality of life and immune function in breast cancer patients treated with combination of adjuvant chemotherapy and oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract. *Onco Targets Ther.* 6:853-9
- Ng M., Yap A.** 2002. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med.* 8(5): 581-589.
- Okuno K., Uno K.** 2011. Efficacy of orally administered *Lentinula edodes* mycelia extract for advanced gastrointestinal cancer patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 12: 1671-1674.
- Parkin D., Bray F., Ferlay J.** 2005. Global cancer statistics 2002. *Cancer J Clin.* 55:74-108.
- Porter P.** 2009. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública Mex.* 51:s141-s146.
- Rajewska J., B. Balasinska.** 2004. Biologically active compounds of edible mushrooms and their beneficial impact on health. *Postepy Hig Med Dosw.* 58: 352-357.
- Silvera-Arenas L., Barrios de Zurbarán C.** 2002. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte.* 16: 9-18.
- Skrzypczak J., Wirstlein P., Mikołajczyk M., Ludwikowski G., Zak T.** 2007. TGF superfamily and MMP2, MMP9, TIMP1 genes expression in the endometrium of women with impaired reproduction. *Folia Histochem Cytobiol.* 45 (1) 143-148.
- Sliva D., Jedinak J., Kawasaki K. Harvey V. Slivova.** 2008. *Phellinus linteus* suppresses growth, angiogenesis and invasive behavior of breast cancer cells through the inhibition of AKT signaling. *Br J Cancer.* 98: 1348-1356.

- Stettler-Stevenson W., Liotta L., Kleiner D.** 1993. Extracellular matrix 6: role of metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7:1434-1441.
- Streuli C.** 1999. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 634-640
- Sugui M., Alves de Lima P., Delmanto R., Da Eira A., Salvadori D., Ribeiro L.** 2003. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food Chem Toxicol.* 41: 555–560
- Sun-Mi L., Min-Suk O., Tae-Won S., Ho-Chol S.** 2000. Study on the antitumor activity and immunomodulatory effect of *Lentinula edodes*. *Korean J of Oriental Med.* 1: 71-80.
- Suzuki N., Takimoto Y., Suzuki R., Arai T., Uebaba K., Nakai M., Strong J., Tokuda H.** 2013. Efficacy of oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract for breast cancer patients undergoing postoperative hormone therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(6):3469-72.
- Tomatelo a pecho.** En: <http://www.tomateloapecho.org.mx/Estadisticas.php>. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2013.
- Tsai H.** 2006. ADAMTS13 and microvascular thrombosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 4:813-825
- Van Damme J., Stray S., Opdenakker G.** 2004. Chemokine protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol.* 14: 201-8.
- Verma R., Hansch C.** 2007. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical biological functions and (Q) SARs. *Bioorg Med Chem.* 15:2223-2268.
- Vetcher D.** 2003. Drogas antimitóticas en Cardiología Intervencionista. El comienzo del éxito en la resolución de la restenosis. *Rev Fed Arg Cardiol.* 32: 406-410.

- Visse R., Nagase H.** 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 92: 827-39.
- Ware L., Bastarache J., Wang L.** 2005. Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury -New therapeutic targets? *Keio J Med.* 54 (3): 142-149.
- Wu C., Wu C., Ho Y.** 2007. Antitumor activity of combination treatment of *Lentinula edodes* mycelium extracts with 5-Fluorouracil against human colon cancer cells xenografted in nude mice. *J Cancer Mol.* 3(1): 15-22.
- Yang X., Sit W., Chan D., Wan J.** 2005. The cell death process of the anticancer agent polysaccharide-peptide (PSP) in human promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Oncol Rep.* 13: 1201-1210, 2005.