



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE TRANSCRIPTOMA Y PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN
LÍNEAS CELULARES TRIPLE NEGATIVAS DE CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON
EL EXTRACTO DEL HONGO *GANODERMA LUCIDUM***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

PEÑA LUNA MÓNICA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD.MX., DICIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de septiembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PEÑA LUNA MÓNICA** con número de cuenta **515015407**, con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE TRANSCRIPTOMA Y PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN LÍNEAS CELULARES TRIPLE NEGATIVAS DE CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON EL EXTRACTO DEL HONGO *Ganoderma lucidum*”**, realizada bajo la dirección del **DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA**:

Presidente: DR. HÉCTOR DE JESÚS MAYANI VIVEROS
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
Suplente: DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ
Suplente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de noviembre de 2016


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM



Por la oportunidad de continuar mis estudios en una institución de alta calidad.

A LOS APOYOS RECIBIDOS DEL CONACYT



Por el apoyo económico que me permitió continuar con mis estudios.
Nº de apoyo: 385726, Nº de becario: 330482.

A MI TUTOR PRINCIPAL Y MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda
Dra. Patricia Piña Sánchez
Dr. Jesús Chimal Monroy

Por su guía y apoyo durante este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los miembros del jurado:

Presidente: Dr. Héctor de Jesús Mayani Viveros

Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón

Secretario: Dra. Patricia Piña Sánchez

Suplente: Dra. Sara Frías Vázquez

Suplente: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá

Emergente: Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN

A mi tutor principal el Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, por permitirme realizar mi tesis de maestría bajo su dirección y por hacer un excelente trabajo en la recaudación de fondos para la elaboración del mismo.

A mi cotutora la Dra. Sandra L. Romero Córdoba, por su guía, dedicación y compromiso en mi formación, trabajo y pensamiento científico.

Al Dr. Daniel Martínez Carrera, por su apoyo, colaboración y por proporcionar el extracto de *Ganoderma lucidum* utilizado durante este trabajo. “Asimismo, por el financiamiento de parte de las investigaciones realizadas, a través del Proyecto “105 Genómica de las Propiedades Funcionales y Medicinales de los Hongos Comestibles de México” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).”

Al Dr. Dennis B. Lubahn, por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio en la Universidad de Missouri.

A mis compañeros de laboratorio: Beto, Claudia, Fredy, Luis, Magda, Rocío, Rosa y Sandra, por todo lo que me enseñaron y por los buenos momentos que pasé con ellos.

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres

Lourdes Luna Amozurrutia

Jaime Peña Vargas

Por su cariño, guía y apoyo invaluable en todos los momentos de mi vida. Por alentarme a perseguir mis sueños.

Este trabajo simboliza mi gratitud por todo lo que me han dado y porque lo que soy, es gracias a ustedes.

ÍNDICE

Índice de figuras	I
Índice de tablas	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Características de la glándula mamaria	5
Generalidades del cáncer	6
Cáncer de mama	7
Epidemiología del cáncer de mama	8
Factores de riesgo para el cáncer de mama	8
Marcadores y clasificadores tumorales	10
Cáncer de mama triple negativo	11
Genómica y tecnologías para el estudio del cáncer	12
MicroARNs	14
Productos de origen natural en cáncer	14
Micoterapia	17
<i>Ganoderma lucidum</i>	19
ANTECEDENTES	21
<i>Ganoderma lucidum</i> en cáncer de mama	21
JUSTIFICACION	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos	24
METODOLOGÍA	25
Extracto de <i>Ganoderma lucidum</i>	25
Cultivo celular	25
Ensayo de viabilidad celular	25
Curva dosis respuesta e IC ₅₀	25
Extracción de ARN total	26
Análisis de expresión génica de ARNm	26
Procesamiento de microarreglos HTA 2.0	27
Análisis bioinformáticos de ARNm	27
Validación de microarreglos HTA 2.0	27
Análisis de vías	28
Análisis de enriquecimiento de grupo de genes	28
Análisis de expresión de miARNs	28
Procesamiento de microarreglos miRNA 3.0	28
Análisis bioinformáticos de miARNs	29
Predicción <i>in silico</i> de posibles blancos para miARNs	29
Curva de tiempo para viabilidad celular	29
Ensayo de proliferación celular	30
Ensayo de migración celular	30
Ensayo de apoptosis celular	30
Análisis estadísticos	31
RESULTADOS	32

El extracto <i>G/1</i> disminuye la viabilidad celular	32
Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) del extracto <i>G/1</i>	32
La expresión diferencial de ARNm distingue a las células tratadas con el extracto <i>G/1</i> como un grupo independiente al vehículo	34
Después de 24 y 48 h de tratamiento con <i>G/1</i> existen genes compartidos y exclusivos para cada tiempo	37
Las vías alteradas por el extracto <i>G/1</i> se acentúan después de 48 h de tratamiento	38
El tratamiento con el extracto <i>G/1</i> impacta en los procesos de reparación de ADN en el modelo celular triple negativo	41
El extracto <i>G/1</i> disminuye la viabilidad celular a través del tiempo	44
El extracto <i>G/1</i> disminuye la proliferación celular	44
El extracto <i>G/1</i> disminuye la migración celular	45
El extracto <i>G/1</i> no impacta en la apoptosis celular tras 48 h de tratamiento	46
La expresión diferencial de miARNs también distingue a las células tratadas con el extracto <i>G/1</i> como un grupo independiente al vehículo	46
Posibles ARNm blanco para los miARNs diferencialmente expresados	48
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	57
LITERATURA CITADA	58
ANEXOS	62
Anexo A – Figuras suplementarias	62
Anexo B – Tablas suplementarias	65
Anexo C – Protocolos	71
Viabilidad celular por MTT	71
Extracción de arn total con trizol	71
Retrotranscripción de ARNm	72
Migración celular con sistema transwell	74
PCR en tiempo real	75
Apoptosis por AnexinaV	76
Anexo D – Publicaciones	78
Capítulo de libro	78
Anexo E – Actividades extra	101
Congreso - Universidad Politécnica de Hong Kong	101
Estancia de investigación – Universidad de Missouri	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria femenina	5
Figura 2. Principales tipos celulares que comprenden el epitelio mamario	6
Figura 3. Evolución del cáncer de mama ductal desde un estadio normal hasta la metástasis	7
Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad en mujeres de 20 años y más por tumor maligno de mama	8
Figura 5. Fotografía de un ejemplar de <i>Ganoderma lucidum</i>	19
Figura 6. Viabilidad celular tras 24 h de tratamiento con el extracto <i>G/1</i> (azul) y vehículo (verde) de la línea de CaMa TN MDA-MB-468	32
Figura 7. Curva dosis-respuesta de la línea de CaMa TN MDA-MB-468 tratada durante 24 h con el extracto <i>G/1</i>	33
Figura 8. Mapa de calor con valores de expresión normalizados escalados a z-score de los genes diferencialmente expresados en la línea de CaMa TN MDA-MB-468 tras 24 h de tratamiento con <i>G. lucidum</i>	35
Figura 9. Mapa de calor con valores de expresión normalizados escalados a z-score de los genes diferencialmente expresados en la línea de CaMa TN MDA-MB-468 tras 48 h de tratamiento con <i>G. lucidum</i>	36
Figura 10. Diagrama de Venn donde se observa la correlación entre los genes diferencialmente expresados con el extracto <i>G/1</i> a 24 y 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468	38
Figura 11. Mapa de calor de las principales vías alteradas obtenidas con los genes diferencialmente expresados con el extracto <i>G/1</i> a 24 y 48 horas de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468	39

Figura 12. Red de las principales vías alteradas con los genes diferencialmente expresados	40
Figura 13. Mapa de calor de las principales vías subreguladas con el extracto <i>G/1</i> tras 24 y 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468	42
Figura 14. Gráficas de enriquecimiento con GSEA para la vía de reparación de ADN a 24 y 48 h tras 24 y 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468	43
Figura 15. Disminución de la viabilidad celular a través del tiempo por el extracto <i>G/1</i> en la línea de CaMa TN MDA-MB-468.....	44
Figura 16. Disminución de la proliferación celular por el extracto <i>G/1</i> tras 96 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468.....	45
Figura 17. Disminución de la migración celular por el extracto <i>G/1</i> tras 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468.....	45
Figura 18. Condición de las células de CaMa TN MDA-MB-468 tras 48 h de exposición.....	46
Figura 19. Mapa de calor con valores de expresión normalizados escalados a z-score de los miARNs diferencialmente expresados tras 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468.....	47
Figura 20. Genes blanco putativos para miARNs diferencialmente expresados a 48h con el extracto <i>G/1</i>	48
Figura 21. Esquema donde se resumen las vías y genes más importantes modulados por el extracto <i>G/1</i> en la línea de CaMa TN MDA-MB-468.	54
Figura S1. Metodología experimental.	62
Figura S2. Volcano plot vehículo vs. control (células no tratadas) tras 24 h de tratamiento.	63
Figura S3. Volcano plot vehículo vs. control (células no tratadas) tras 48 h de tratamiento.	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos aprobados contra el cáncer desde el 2007 derivados de productos naturales.....	15
Tabla 2. miARNs modulados en cáncer por compuestos de origen natural.....	16
Tabla 3. Actividad antitumoral de algunos extractos de hongos.....	18
Tabla 4. Función biológica de los compuestos de <i>Ganoderma lucidum</i>	20
Tabla 5. Resultado de la validación técnica de microarreglos por PCR en tiempo real.	37
Tabla S1. Información de la regresión no lineal para la curva dosis-respuesta tras 24 h de tratamiento con el extracto <i>G11</i>	65
Tabla S2. Lista de genes diferencialmente expresados con el extracto <i>G11</i> en comparación al vehículo tras 24 h de tratamiento.	65
Tabla S3. Lista de genes diferencialmente expresados con el extracto <i>G11</i> en comparación al vehículo tras 48 h de tratamiento.	66

RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) es la principal causa de muerte por cáncer entre mujeres en México y a nivel mundial. El cáncer de mama triple negativo (TN) se caracteriza por la falta de expresión de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2). Debido a la falta de expresión de estas moléculas, las opciones terapéuticas para las pacientes con tumores TN se limitan a la quimioterapia. El CaMa TN es un subtipo agresivo, de mal pronóstico y con tendencia a metástasis temprana, con opciones limitadas de tratamiento. Debido a ello, la investigación en productos naturales que presenten propiedades terapéuticas contra células provenientes de tumores TN, constituye una importante área de desarrollo.

Ganoderma lucidum es un hongo medicinal que se ha utilizado en Asia durante más de 2000 años para tratar diferentes enfermedades. Estudios recientes han demostrado el potencial antineoplásico de su extracto, sobre todo en células de CaMa. Sin embargo, estos efectos no han sido evaluados en cepas de otras regiones geográficas y la mayoría de los mecanismos moleculares y genómicos de su actividad biológica sobre las células cancerosas no se han aclarado completamente. En este proyecto se evaluó el efecto de un extracto hidro-alcohólico de *G. lucidum* (*G11*), sobre la viabilidad de células triple negativas de cáncer de mama (MDA-MB-468), así como en sus perfiles de expresión génica global. Después de 24 h de tratamiento con el extracto se obtuvo una reducción del 50% de la viabilidad celular usando 0,34 mg/ml. Para analizar los mecanismos genómicos implicados en la reducción de la viabilidad celular, se utilizaron microarreglos de expresión, con los cuales se determinó el perfil de expresión de las células tratadas con el extracto *G11* en comparación a los controles tras 24 y 48 h de tratamiento. La identificación de genes diferencialmente expresados se realizó con el programa Transcriptome Analysis Console (TAC) Affymetrix. Mientras que las vías alteradas se obtuvieron con los programas Ingenuity Pathway Análisis (IPA) y Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Los resultados de los arreglos mostraron que las células tratadas con el extracto de *G. lucidum* presentan expresión diferencial de diversos genes, lo que permite separarlas en un grupo independiente a los controles (vehículo y células no tratadas). Este efecto se ve acentuado a 48 h de tratamiento con un mayor número de genes diferencialmente expresados. Por otro lado, el tratamiento con *G11* a 24 y 48 horas presenta genes compartidos y exclusivos para cada tiempo, con un total de 40 genes diferencialmente expresados a 24 h (12 al alza y 28 a la baja) y 89 genes diferencialmente expresados a 48 h (40 al alza y 49 a la baja). El análisis de vías realizado con el

programa IPA, mostró que a 48 h existe un mayor número de vías moduladas por el extracto, entre las que destacan por su inactivación: proliferación, migración, viabilidad y transporte de moléculas entre otras, mientras que vías como respuesta inmune a fagocitos, diferenciación celular y muerte de células cancerígenas se encuentran activadas. El análisis de enriquecimiento de genes realizado con el programa GSEA, mostró una sub-representación de vías de reparación de ADN, replicación, ciclo celular, transcripción y procesos transcripcionales los cuales podrían estar relacionados a la disminución de viabilidad celular y los cambios observados en el fenotipo de la línea. Dentro de las vías de reparación de ADN que se encuentran subrepresentadas, destacan genes como *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PARP1* y un grupo de polimerasas, lo que es un indicio de que el extracto podría ser un sensibilizador para pacientes de CaMa TN que no son susceptibles al tratamiento con fármacos como los inhibidores de PARP y sugiere el potencial del extracto fúngico como un sensibilizador ante este tipo de fármacos.

Los ensayos *in vitro* mostraron una inhibición de la viabilidad celular a través del tiempo, una inhibición de aproximadamente 60% de la proliferación celular tras 96 h de exposición al extracto fúngico, así como una inhibición de aproximadamente 40% de migración celular tras 48 h de tratamiento. El ensayo de apoptosis celular mostró que no existe un impacto tras 48 h de tratamiento.

Los resultados de los arreglos de miARNs mostraron que la expresión diferencial de miARNs también distingue a las células tratadas con el extracto *G11* como un grupo independiente a los controles, con un total de 28 miARNs diferencialmente expresados tras 48 h de tratamiento (5 al alza y 23 a la baja). El análisis de correlación de ARNs mensajeros y miARNs, identificó 5 miARNs sub-expresados, que pueden estar regulando 6 ARNs blanco que se encuentran sobre-expresados. Dentro de los genes blancos regulados destaca *CYP1A*, el cual es un citocromo que entre sus funciones está la degradación de compuestos en especies reactivas capaces de dañar la integridad del ADN y por tanto disminuir la viabilidad celular.

En conclusión el extracto de *G. lucidum* tiene un impacto importante en diferentes procesos a nivel génico que podrían ser los responsables de sus propiedades anticancerígenas, lo cual pone de manifiesto la importancia de estudiar los recursos naturales de nuestro país.

Palabras clave: cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-468, productos naturales, micoterapia, *Ganoderma lucidum*, microarreglos, miARNs, IPA, GSEA.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer death among women in Mexico and worldwide. Triple negative breast cancer (TNBC) is characterized by the lack of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor type 2 (HER-2). Due to the lack of expression of these markers, the therapeutic options for patients with TN tumors are only limited to chemotherapy. TN breast cancer is an aggressive subtype, with bad clinical prognosis, tendency to early metastases and limited options for treatment. Given the above, research focused on natural products showing therapeutic properties against cells from TN tumors represent an important area for development.

Ganoderma lucidum is a medicinal mushroom that has been used in Asia for more than 2000 years to treat different diseases. Recent studies have shown the anti-cancer potential of its extract, especially in breast tumor cell lines. However, these effects have not been evaluated in strains from other geographic regions and the molecular and genomic mechanisms responsible of its biological activity on cancer cells have not been fully elucidated. In this project, we evaluated the effect of a hydroalcoholic extract of *G. lucidum* (*G11*) in cell viability of a triple negative breast cancer cell line (MDA-MB-468), as well as in its global gene expression profiles. After 24 h of treatment with the extract 50% reduction of cell viability using 0.34 mg/ml was obtained. To analyze genomic mechanisms involved in reducing cell viability, expression microarrays of the cells treated with the extract *G11* compared to controls after 24 and 48 h of treatment cells were used. The identification of differentially expressed genes was performed with the Transcriptome Analysis Console (TAC) Affymetrix program. The altered metabolic pathways were obtained with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software.

The results showed that cells treated with *G. lucidum* have differential expression of several genes, clearly separating the treated cells in an independent group compared to control cells (vehicle and untreated cells). This effect is accentuated after 48 h of treatment, with a higher number of differentially expressed genes. Furthermore, treatment with *G11* to 24 and 48 h presents shared and exclusive genes for each time, a total of 40 genes differentially expressed at 24 h (12 upward and 28 downward) and 89 genes differentially expressed 48 h (40 to 49 upward and downward). Pathway analysis conducted with the IPA software showed that 48 h there is a greater number of pathways modulated by the extract, among which stand out for their inactivation: proliferation, migration, viability and transport of molecules among others, while tracks like immune response to phagocytes, cell differentiation and cancer cell death are activated. Gene set enrichment analysis was conducted with GSEA software, showed an underrepresentation of DNA

repair pathways, DNA replication, cell cycle, transcription and post-transcriptional modifications which could be related to decreased cell viability and the changes in the phenotype of the line. Regarding the DNA repair pathways that are under-represented, we identified changes in *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PARP1* and a group of polymerases, which might be an indication that the extract might act as a sensitizer for TN breast tumors that are not susceptible to treatment with drugs such as PARP inhibitors and reveals the potential of mushroom extract as a sensitizer to these drugs.

In vitro assays showed an inhibition of cell viability over time, an inhibition of approximately 60% of cell proliferation after 96 h of exposure to the extract and an inhibition of approximately 40% of cell migration after 48 h of treatment. The test showed that cell apoptosis there is no impact after 48 h of treatment.

Results from the miRNA arrays identified that differential expression of miRNAs can also distinguish the *G/1* treated as an independent group compared to the control cells, with a total of 28 miRNAs differentially expressed after 48 h of treatment (5 to 23 upward and downward). The analysis of target genes for miRNAs showed five under-expressed microRNAs that may be regulating 6 target genes that are overexpressed. Among the highlights regulated target genes *CYP1A1* which is a cytochrome that one of its functions is the degradation of compounds to reactive species capable of damaging DNA integrity and therefore decrease cell viability.

In conclusion *G. lucidum* extract has a major impact on different processes at the gene level that could be responsible for their anticancer properties, which highlights the importance of studying the natural resources of our country.

Key words: breast cancer, triple negative breast cancer, MDA-MB-468, natural products, microtherapy, *Ganoderma lucidum*, microarrays, miRNAs, IPA, GSEA.

INTRODUCCIÓN

CARACTERÍSTICAS DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es un órgano presente en todas las hembras de los mamíferos cuyo objetivo es la producción de leche para la alimentación de la progenie¹. Es un tipo de glándula exocrina sudorípara regulada por el sistema endócrino que en mujeres se vuelve funcional en respuesta a cambios asociados con el parto y la lactancia. En machos se presenta de una forma rudimentaria y no funcional¹. La mama o seno ocupa la región mamaria que se encuentra en la parte lateral superior de la pared anterior del tórax. Debajo de ella se localiza el pectoral mayor que es el músculo de mayor tamaño en el pecho y soporta todos los componentes de la mama².

En el ser humano, el seno de la mujer está compuesto de las siguientes partes (Figura 1)^{3,4}:

- *Lobulillos*: glándulas productoras de leche.
- *Ductos*: microtubos que transportan la leche desde los lobulillos al pezón.
- *Estroma*: tejido adiposo y conectivo que rodea los lobulillos, conductos, vasos sanguíneos y linfáticos.
- *Areola*: parte rosada o café alrededor del pezón que contiene pequeñas glándulas sudoríparas que segregan lubricantes durante la lactancia.
- *Pezón*: área en el centro de la areola en donde sale la leche.

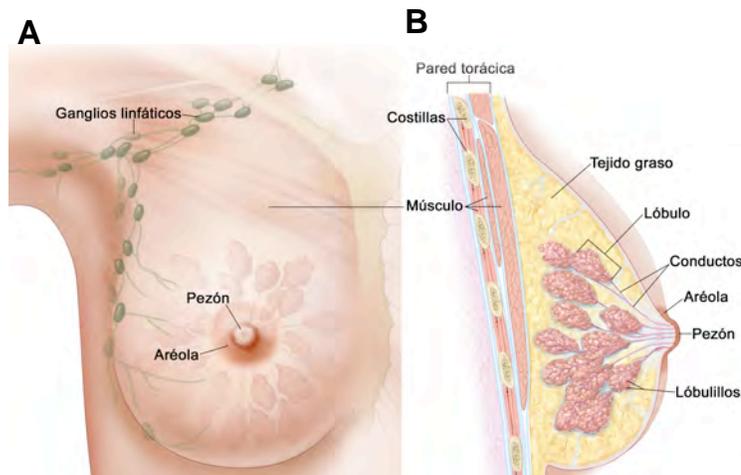


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria femenina. (A) vista frontal (B) vista lateral. Tomado de American Cancer Society^{3,4}.

Además de los ya mencionados, la glándula mamaria tiene arterias y venas que oxigenan los tejidos, nervios que se encargan de proporcionarle sensibilidad, células del sistema inmune que le confieren protección y conductos linfáticos que transportan la linfa. Estos conductos desembocan en los ganglios, los cuales son estructuras nodulares en forma de frijol que filtran la linfa².

Existen tres etapas principales del desarrollo de la glándula mamaria, la embrionaria, la pubertad y la reproductiva. La primera comienza en la sexta semana de embarazo y se completa en el quinto mes. Durante este periodo sólo existe el surco mamario el cual, es una línea que recorre ambos lados del cuerpo del embrión, desde la ingle hasta la axila. En el tercer mes de embarazo, el surco mamario es reemplazado por el primordio mamario el cual es un conjunto de células que se localizan a nivel de la cuarta costilla. En el quinto mes de gestación se generan los canales y ramificaciones de los conductos para la leche. En el séptimo y octavo mes estos conductos se abren a la superficie y forman el pezón². La segunda etapa comienza en la pubertad donde las hormonas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH), producidas por la hipófisis, en conjunto con el estrógeno y la progesterona producidas por los ovarios, estimulan el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria funcional². Finalmente la tercera etapa se da durante el embarazo, en la que otra hormona la prolactina en conjunto con los estrógenos y progesterona, estimulan el crecimiento de la glándula y la proliferación de las células lobulillares y ductales para la producción de leche.

Existen dos principales tipos celulares que componen el epitelio mamario: basal y luminal. El epitelio basal se compone de células mioepiteliales que generan la capa externa de la glándula mientras que el epitelio luminal forma los conductos y los alveolos secretores⁵ (Figura 2).

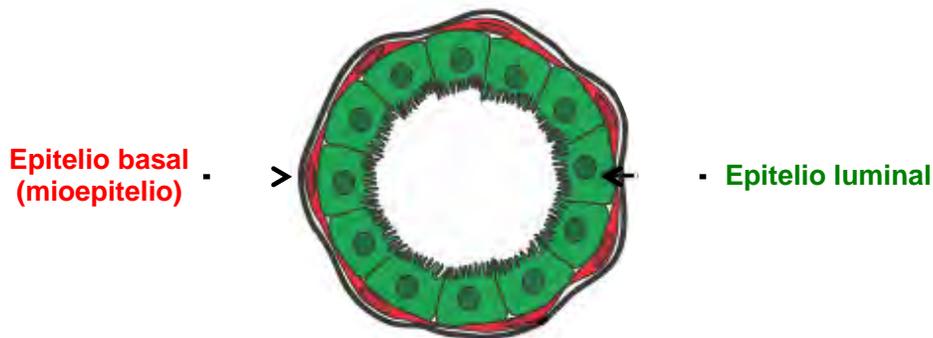


Figura 2. Principales tipos celulares que comprenden el epitelio mamario. Modificado de (Masterson, 2015)⁶

GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí⁷ que se caracterizan por la acumulación de alteraciones en el genoma de las células⁸. Estas alteraciones conllevan a la división descontrolada de las células que pueden formar un tumor⁹. De manera normal, las células crecen y se dividen para formar nuevas células donde el cuerpo las necesite, esto sucede de manera altamente regulada y coordinada. Cuando una célula se vuelve cancerosa, pierde este

proceso ordenado y al dividirse descontroladamente, genera crecimientos celulares llamados tumores¹⁰. La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos los cuales son masas de tejido, mientras que los cánceres de sangre, como las leucemias y los linfomas, por lo general no forman tumores sólidos. Un tumor puede ser maligno o benigno. Los malignos, comúnmente conocidos como cancerígenos, tiene el potencial de viajar a través de la sangre o linfa, invadir tejidos distantes y generan un nuevo tumor lo que es conocido como metástasis¹¹. A diferencia de éstos, los tumores benignos no invaden otros tejidos por lo que en la mayoría de los casos, pueden ser removidos⁷. El cáncer puede originarse en casi cualquier parte del cuerpo⁷ y actualmente se conocen más de 100 tipos distintos dependiendo del tejido en el que se desarrollen¹², siendo los más destacados debido a su alta incidencia el cáncer de pulmón, de próstata, el colorrectal y el cáncer de mama¹³.

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de seno o cáncer de mama (CaMa), es un tumor maligno que se origina en las células de la glándula mamaria³, en otras palabras, es el crecimiento descontrolado de las células del seno¹¹. Esta enfermedad afecta principalmente a las mujeres, pero los hombres también la pueden padecer³. Es una patología heterogénea lo que dificulta su entendimiento biológico y clínico, así como el desarrollo de alternativas terapéuticas específicas^{14,15}. La mayoría de los cánceres de mama se originan en las células que recubren los ductos mamarios (cánceres ductales); otros tipos comienzan en las células que recubren los lobulillos (cánceres lobulillares), mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos. Si las células cancerígenas alcanzan a los ganglios linfáticos, empieza un fenómeno llamado metástasis y hay altas probabilidades de que el cáncer se propague a otros órganos. En la figura 3 se esquematiza la evolución histológica del cáncer de mama ductal.

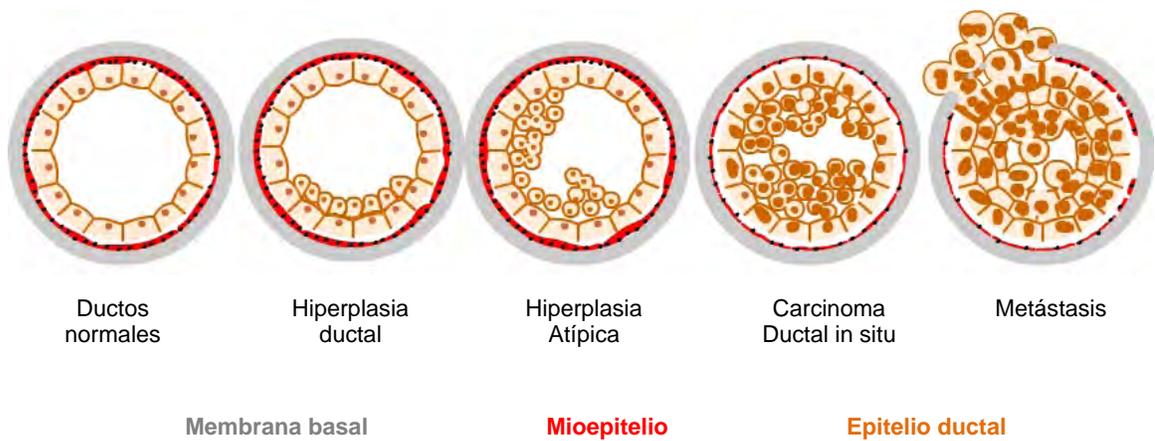


Figura 3. Evolución del cáncer de mama ductal desde un estadio normal hasta la metástasis. Modificado de (RnCeus. Histology of DCIS, 2013)¹⁶.

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

A nivel mundial, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasia entre mujeres¹³. De acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud, en el año 2012 se registraron 1.7 millones de casos nuevos, los cuales representan el 11.9% del total de cánceres en ambos sexos y el 25.1% de cánceres femeninos a nivel mundial¹³. En cuanto a la mortalidad, el CaMa representó el 6.4% de defunciones por neoplasia en ambos sexos y el 14.7% de defunciones por neoplasia entre mujeres¹³.

En México, para el año 2014 la incidencia de CaMa en mujeres mayores de 20 años asciende a 28.75 por cada 100 mil mujeres. En el año 2013, datos del INEGI mostraron que la mortalidad por cáncer de mama fue de 14.35 defunciones por cada 100 mil mujeres (Figura 4), estimando un total de 14 decesos por día, es decir más de una muerte cada dos horas, lo que convierte al cáncer de mama en la principal causa de morbilidad hospitalaria y la segunda causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres de 20 años y más en el país¹⁷.

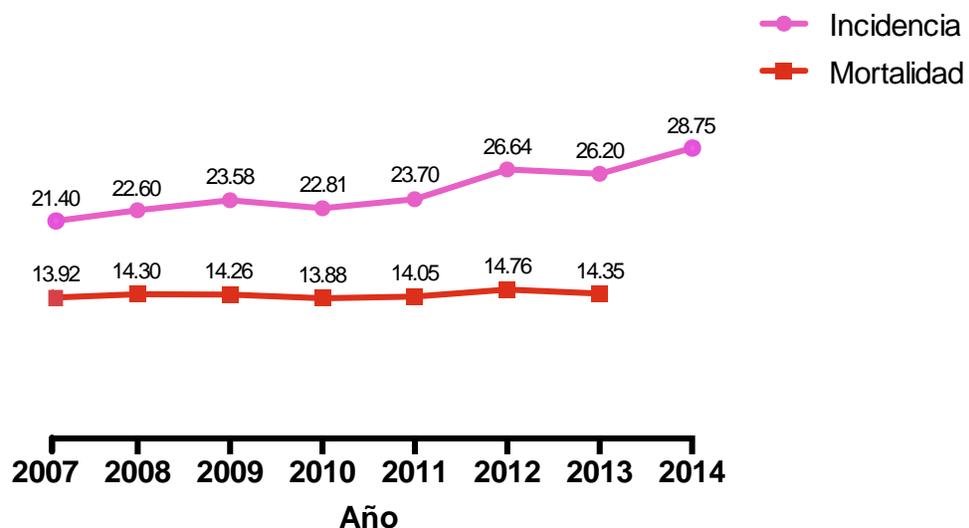


Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad en mujeres de 20 años y más por tumor maligno de mama. Serie anual 2007 a 2013 por cada 100 mil mujeres. Modificado de (INEGI, 2015)¹⁷

FACTORES DE RIESGO PARA EL CÁNCER DE MAMA

Un factor de riesgo es cualquier cosa, condición o hábito que aumente el riesgo de desarrollar cáncer de mama¹⁸. Existen dos principales tipos de factores de riesgo para esta enfermedad, aquellos que pueden controlarse y aquellos que no.

Entre los factores de riesgo para el cáncer de mama que no se pueden controlar se encuentran^{18,19,20}:

- **Género:** si bien los hombres también pueden desarrollar cáncer de mama, el factor más significativo para esta enfermedad es ser mujer, debido al constante cambio y crecimiento de la glándula mamaria por la actividad de hormonas como el estrógeno y la progesterona.
- **Edad:** el aumento en la edad es el segundo factor de riesgo más significativo para desarrollar CaMa. Entre los 30 y 39 años es de 0.44% y después de los 60 años aumenta a 3.5% entre la población general.
- **Genética:** debido a mutaciones en genes específicos, alrededor del 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios. El caso más común, son las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, cuya función es la reparación del ADN.
- **Historial familiar de cáncer de mama:** si algún pariente en primer grado como madre, herma o hija ha tenido cáncer de mama o de ovario especialmente antes de los 50 años, existe un alto riesgo de desarrollar CaMa hereditario.
- **Historial personal de cáncer de mama:** las mujeres que ya fueron diagnosticadas con CaMa tienen mayor riesgo de presentarlo de nuevo.
- **Raza:** las mujeres caucásicas tienen mayor riesgo que las afroamericanas a presentar CaMa, sin embargo las mujeres afroamericanas tienen mayor riesgo de morir a causa de esta enfermedad. En mujeres menores a 45 años con CaMa la raza con mayor prevalencia es la afroamericana. Las mujeres asiáticas, hispanas y nativo americanas presentan el menor riesgo de desarrollar y morir a causa de este cáncer.
- **Radiación en el tórax:** la radiación que se da como tratamiento por presentar otro tipo de cáncer en el tórax o el pecho, aumentan el riesgo de CaMa, sobre todo si dicha radiación se presentó durante la pubertad, etapa durante la cual se desarrolla la glándula mamaria.
- **Exposición a estrógenos endógenos:** la exposición prolongada a estrógenos de manera natural como son el inicio de la menstruación antes de los 12 años, o el término de la misma después de los 55 años aumenta el riesgo de desarrollar CaMa.
- **Embarazo y lactancia:** el embarazo antes de los 30 años y la lactancia por un periodo de 1.5 a 2 años reducen el riesgo de desarrollar CaMa.

Factores de riesgo de cáncer de mama que si se pueden controlar^{18,20}:

- **Peso:** el sobrepeso, sobre todo después de la menopausia debido a la acumulación de estrógeno en la grasa, aumenta el riesgo de CaMa.
- **Dieta:** dietas reducidas en grasa reducen el riesgo de CaMa.
- **Ejercicio:** 45-60 min de ejercicio al día reduce el riesgo de CaMa.
- **Consumo de alcohol:** el consumo elevado de alcohol eleva el riesgo de CaMa debido a la limitada actividad del hígado de controlar el nivel de estrógenos en la sangre.

- **Fumar:** el cigarro incrementa en pequeña proporción el riesgo de CaMa.
- **Exposición a estrógenos exógenos:** periodos prolongados de tiempo consumiendo estrógenos (terapia de remplazo de hormonas, anticonceptivos hormonales, carne o pesticidas con alto contenido de estrógenos).

Como ya se mencionó, existe un gran número de factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama. Es por ello que la ciencia y la medicina han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de marcadores y clasificadores tumorales que sean capaces de diagnosticar la enfermedad de forma temprana y de caracterizarla de mejor manera, brindando tratamientos más personalizados.

MARCADORES Y CLASIFICADORES TUMORALES

Un marcador tumoral es una molécula, sustancia o condición (hormonas, antígenos, proteínas, receptores citoplasmáticos, y recientemente mutaciones, ARNm, miARNs entre otros) que se encuentra o es producida por células tumorales o por células normales en presencia de una condición cancerosa^{21,22}. En otras palabras, es un indicador de la presencia de un tumor. Por lo general el marcador tumoral, es producido por ambos tipos de células, pero se encuentra sobreexpresado en las células cancerígenas. Sin embargo, existen mutaciones que son propias del tumor que no provocan sobreexpresión. Los marcadores tumorales son de gran importancia debido a la relevancia clínica ya que pueden ayudar a clasificar, diagnosticar la enfermedad, planificar y dar seguimiento al tratamiento²³.

Debido a que el CaMa es una patología heterogénea, es de suma importancia clasificar la enfermedad de manera correcta para poder dar un tratamiento y seguimiento adecuado a los pacientes. Las clasificaciones para CaMa son muy diversas, algunas de las más importantes son por: tipo o grado histológico, estadio clínico, subtipo molecular y marcadores inmunohistoquímicos.

La expresión inmunohistoquímica de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), es una de las principales clasificaciones tumorales en cáncer de mama. RE y RP son receptores hormonales que de manera normal participan en el crecimiento de la célula, pero que, en una célula tumoral, se encuentran alterados²⁴. Alrededor del 75% y 65% de los tumores de mama son positivos a ER y PR respectivamente. Otro marcador tumoral que es usado como clasificador de cáncer de mama, es el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano del tipo 2 (HER2). Este receptor promueve el crecimiento de la célula. Se dice que un tumor es HER2 positivo cuando

las células cancerígenas tienen una sobreexpresión de dicho receptor. Alrededor del 25% de los tumores de mama son positivos a HER2²⁴.

La importancia de la clasificación por marcadores inmunohistoquímicos (RE, PR, y HER2) radica en que dependiendo del estatus de positividad de estos marcadores se diseña un esquema terapéutico específico que es el tratamiento de primera línea para las pacientes con CaMa a nivel mundial. La terapia hormonal está dirigida a aquellos tipos de tumor que son positivos a receptores hormonales (ER+ y PR+). El tamoxifeno es un fármaco que modula selectivamente los receptores estrogénicos inhibiendo su expresión²⁵ mientras que los inhibidores de aromatasas reducen los niveles de estrógenos, la hormona ligando para el ER. Trastuzumab y pertuzumab son anticuerpos monoclonal dirigidos contra HER2⁷ los cuales impiden la dimerización del receptor bloqueando su actividad e impidiendo el crecimiento celular²⁶. Sin embargo existen algunos tumores que no presentan receptores hormonales ER, PR ni sobreexpresión de HER-2 y son llamados tumores de cáncer de mama triple negativos.

CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

El cáncer de mama triple negativo (TN) es un subtipo que se caracteriza por la ausencia de los receptores hormonales de estrógenos (ER) y progesterona (PR) y por la ausencia de sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano del tipo 2 (HER2). En otras palabras, es triple negativo a la presencia de dichos marcadores (ER-, PR-, HER2-). Debido a la ausencia de blancos específicos la terapia dirigida convencional no es factible en este tumor, siendo la quimioterapia el único tratamiento sistémico disponible.

Aproximadamente, el 15% de los casos de cáncer de mama invasivo son triple negativos²⁷. Por lo general son carcinomas ductales invasivos con un alto grado histológico²⁸. Se asocian con una menor edad al momento del diagnóstico y a menudo se produce en mujeres jóvenes premenopáusicas hispanas o afroamericanas y con sobrepeso²⁹. Este tipo de tumor es agresivo, de mal pronóstico y muestra una tendencia a la metástasis temprana³⁰. La respuesta a tratamiento es baja y los índices de recurrencia y metástasis para los primeros 5 años después del diagnóstico es alta²⁹, por lo que las pacientes con CaMa TN son el subgrupo con el peor pronóstico³¹.

Actualmente el principal tratamiento para el CaMa TN es la quimioterapia. Algunos de los medicamentos más utilizados son las antraciclinas, taxanos y cisplatino. Las antraciclinas son medicamentos que actúan intercalándose en el ADN e interfiriendo con su replicación; con

frecuencia son utilizadas en el tratamiento adjuvante de etapas tempranas de CaMa; la doxorubicina y la epirubicina son dos ejemplos de estos medicamentos³². Los taxanos son un tipo de terpenos que impiden el crecimiento celular y por lo tanto su proliferación, esto mediante la inestabilidad de los microtúbulos necesarios para la división celular, algunos ejemplos de este tipo de medicamentos son el paclitaxel y el docetaxel. El cisplatino es un quimioterapéutico utilizado como tratamiento para varios tipos de cáncer, su función es intercalarse en el ADN lo que genera un daño que por lo general, activa programas apoptóticos lo que conlleva a la muerte celular.

Existen otras estrategias prometedoras como tratamiento para el CaMa que aún se encuentran en fase clínica para ciertos tipos de cáncer son los inhibidores de PARP. Poli ADP-ribosa (PARP) es una familia de enzimas implicadas en la reparación del daño al ADN. Los medicamentos que inhiben estas enzimas están diseñados como tratamiento en aquellos tumores que tienen mutaciones en las vías de reparación del ADN y por lo tanto no son funcionales, un ejemplo de esto son el cáncer de mama y de ovario que tienen mutación en genes supresores de tumor como *BRCA1* y *BRCA2*³³. La desventaja de estos medicamentos es que no son efectivos en aquellos tumores donde *BRCA1* y *BRCA2* son funcionales, debido a que dichos supresores tumorales actúan como homólogos de PARP y reparan el daño generado en las células cancerígenas.

GENÓMICA Y TECNOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DEL CÁNCER

En años recientes con el avance de la tecnología y la generación de nuevos conocimientos, ha sido posible entender mejor las bases moleculares del cáncer de mama a través del uso de tecnologías de alto rendimiento como los microarreglos o más recientemente, la secuenciación masiva de nueva generación. Estas tecnologías no sólo han impactado en el entendimiento de aspectos de la biología básica de la carcinogénesis mamaria, también han permitido traducir los hallazgos de la investigación básica en pruebas y herramientas con aplicación clínica. Un ejemplo de ello son los perfiles moleculares de ARN mensajero a partir de los cuales, se ha conseguido clasificar a los tumores, predecir el desenlace clínico del paciente y desarrollar nuevos fármacos dirigidos para bloquear la acción específica de genes mutados, como es el caso de los inhibidores de tirosinas cinasas o los anticuerpos dirigidos³⁴.

La genómica es en esencia el uso y aplicación de diversas ciencias (biología molecular, matemáticas, genética, informática, bioquímica, física y estadística entre otras) y tecnologías para el estudio del genoma y transcriptoma. En otras palabras, la genómica estudia la secuencia de

aminoácidos que conforman nuestro ADN así como sus cambios y las posibles consecuencias de las modificaciones del mismo que pueden derivar en enfermedades como el cáncer. Debido a que la expresión génica es fundamental tanto para las células normales como para las tumorales, es de suma importancia definir los perfiles de expresión génica en las diversas células y su posible impacto en el establecimiento de rutas celulares que promueven los programas carcinogénicos.

La clasificación de los tumores a partir de los perfiles moleculares contribuyó en el entendimiento de varios tipos tumorales entre ellos el cáncer de mama. Pacientes con el mismo diagnóstico y tratamiento para CaMa por lo general tenían diferentes desenlaces clínicos, esta diferencia se debía en parte a las limitaciones para la correcta clasificación de la enfermedad. Perou y colaboradores clasificaron al cáncer de mama en 5 subtipos moleculares de acuerdo al perfil de expresión tumoral las cuales son: luminal A, luminal B, HER2 positivo, basal y bajo en claudinas^{14,15,35}. Con esta nueva clasificación se abrió un mundo de conocimiento acerca del cáncer de mama y su heterogeneidad y ayudó a comprender las discrepancias en los desenlaces clínicos de diferentes pacientes con la misma clasificación inmunohistoquímica. Mediante la clasificación por subtipos moleculares y los perfiles de expresión génica también se han podido desarrollar herramientas pronósticas para CaMa como son PAM50, Oncotype DX y MammaPrint las cuales son firmas de genes que permiten definir en estadios tempranos de la enfermedad, el tratamiento clínico así como el riesgo de recaída y muerte³⁶. Específicamente en CaMa TN las clasificaciones moleculares han permitido definir subgrupos más específicos como en el caso de la firma molecular de Lehmann en 2011³⁷ que mediante el análisis de bases de datos clasificó al CaMa TN en 6 diferentes subtipos dependiendo la expresión y ontología de los genes de cada subgrupo, la subclasificación es importante para una mejor identificación de las terapias a base de moléculas. De acuerdo a la subclasificación de Lehman el CaMa TN se divide en: parecido a basal 1 y 2, inmunomodulatorio, mesenquimal, mesenquimal tipo stem y receptor de andrógeno luminal.

Así mismo, conocer el funcionamiento de los reguladores transcripcionales y post-transcripcionales³⁸ ha permitido comprender nuevos mecanismos que participan en el desarrollo y establecimiento del tumor. Un ejemplo de esto son los microARNs, los cuales son importantes reguladores de la expresión génica de los ARN mensajeros a nivel post-transcripcional. De esta forma, hoy en día las pruebas genómicas permiten calcular con una alta confiabilidad el riesgo personalizado a presentar una recaída o metástasis en el futuro, lo que impacta en el tratamiento y la calidad de vida de la paciente³⁹.

MICROARNS

Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs no codificantes de entre 21-25 nucleótidos. Estos reguladores son incorporados en complejos de silenciamiento que se unen a secuencias blanco complementarias en el 3' de las regiones no codificantes del ARNm, lo que puede provocar la inhibición de la expresión del ARNm blanco o su degradación⁴⁰. Los miARNs tienen diferentes funciones como son la regulación del crecimiento, diferenciación, metabolismo y muerte celular, respuesta al estrés y morfogénesis entre muchas otras. Cada miARN puede tener hasta 200 genes blanco y su función es tiempo y tejido específico. En humanos se conocen un total de 2588 miARNs maduros y 1881 precursores^{41,42}.

Al igual que los ARN mensajeros, los miARNs se encuentran desregulados en cáncer y participan en el desarrollo y progresión de dicha patología⁴³. Bajo ciertas condiciones, los miARNs pueden actuar como oncogenes o como genes supresores de tumores, y su desregulación puede alterar características del cáncer como proliferación, migración, invasión, diferenciación, angiogénesis e inestabilidad génica entre otros⁴⁴. Los miARNs pueden ser usados como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer debido a la expresión diferencial que presentan en las células tumorales en comparación a las células normales. Dicho perfil de expresión alterado puede ser usado como un clasificador más preciso para tumores poco diferenciados debido a que la expresión de los miARNs está fuertemente relacionada con el estadio y origen del tumor^{40,45,46}

La caracterización profunda del genoma de los tumores ha impactado en nuestro entendimiento acerca de las bases moleculares de la carcinogénesis como en el caso de los miARNs que funcionan como supresores tumorales u oncogenes dependiendo de los blancos que regulen. El uso de productos naturales para el tratamiento y prevención del cáncer no ha escapado del avance que la genómica ha generado, iniciándose una nueva era del conocimiento donde las propiedades de la naturaleza se conjuntan con los avances tecnológicos para tener una mejor caracterización y aprovechamiento de los productos naturales.

PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL EN CÁNCER

Desde tiempos ancestrales, los seres humanos han utilizado productos naturales (PN) como tratamientos para un sin número de enfermedades y padecimientos, así como agentes protectores de la salud. Estudios antropológicos han sugerido el uso de PN como el polen desde los primeros asentamientos humanos, lo que sugiere el uso de plantas medicinales hace más de 60,000 años⁴⁷.

La búsqueda de nuevos esquemas terapéuticos para los tumores mamarios ha incluido de forma importante a los PN provenientes de plantas, animales, bacterias y hongos. Hoy en día se sabe que la ingesta de productos naturales en la dieta diaria permite, en dosis moderadas, consumir los compuestos activos generando un efecto benéfico y preventivo para diversas enfermedades. Los productos naturales poseen una gran diversidad química lo que los convierte en una potencial fuente para el descubrimiento de moléculas bioactivas capaces de influir en vías relacionadas a procesos oncogénicos⁴⁸.

En la actualidad, el uso de los productos naturales dentro de la terapéutica es controlado por organismos regulatorios de salud como la FDA en EUA, la EMA en Europa y la COFEPRIS en México, quienes han sentado las bases para el uso e investigación de los fármacos derivados de PN comprobando su efecto mediante abordajes experimentales y clínicos. Actualmente más del 50% de los medicamentos aprobados por la FDA derivan de productos naturales⁴⁹. La tabla 1 muestra algunos de los fármacos contra cáncer aprobados entre el 2007 y 2014.

Tabla 1. Fármacos aprobados contra el cáncer desde el 2007 derivados de productos naturales. Modificada de Basmadjian, C. *et al.* (2014)⁵⁰

Nombre (Nombre comercial)	Organismo de origen	Compañía, año de aprobación	Cáncer	Mecanismo de acción
Temsirolimus (Torisel®)	<u>Bacteriano</u> (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) Derivado de rapamicina	Wyeth, 2007	Carcinoma de células renales (RCC)	Inhibición de mTOR
Everolimus (Afinitor®)	<u>Bacteriano</u> (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>) Derivado de rapamicina	Novartis, 2009	Cáncer de riñón avanzado	Inhibición de mTOR
Ixabepilone (Ixempra®)	<u>Bacteriano</u> (<i>Sorangium cellulosum</i>)	Bristol-Myers Squibb, 2007	Cáncer de mama metastásico o local avanzado que no responde a quimio.	Estabilización de microtúbulos
Vinflunine (Javlor®)	<u>Vegetal</u> Vinca del cabo (<i>Catharanthus roseus</i>)	Pierre Fabre, 2009	Cáncer de vejiga	Inhibición de la polimerización de tubulina
Romidepsin (Istodax®)	<u>Bacteriano</u> (<i>Violaceum chromobacterium</i>)	Celgene, 2009	Linfoma cutáneo de células T (CTCL)	Inhibición de las isoformas 1 y 2 de histona desacetilasas
Trabectedin = ecteinascidin 743 (Yondelis®)	<u>Animal</u> Ascidia (<i>Ecteinascidia turbinata</i>)	Zeltia and Johnson and Johnson, 2009	Sarcoma de tejidos blancos Cáncer de ovario	Inducción de daño al ADN

Eribulin mesylate (Halaven®)	<u>Animal</u> Esponja marina (<i>Halichondria okadai</i>)	Eisai Co., 2011	Cáncer de mama metastásico	Inhibición de la dinámica de los microtúbulos
Homoharringtonine, Omacetaxine mepesuccinate (Synribo®)	<u>Vegetal</u> Cefalotejo (<i>Cephalotaxus harringtonia</i>)	Teva, 2012	Leucemia mielógena crónica (CML)	Inhibición de la síntesis de proteínas
Carfilzomib (Kyprolis®)	<u>Microbiano</u> Actinomicetos Derivado de epoxomicina	Onyx, 2012	Mieloma múltiple	Inhibición de proteasoma
Ingenol mebutate (Picato®)	<u>Vegetal</u> (<i>Euphorbia peplus</i>)	LEO Pharma, 2012	Queratosis actínica	Activación de PKC δ

Mediante análisis bioinformáticos y genómicos, se ha demostrado que los productos naturales tienden a regular genes y proteínas con un gran número de interacciones que son esenciales para el organismo⁵¹. Así mismo, estudios genómicos han reportado en modelos *in vitro* e *in vivo* que los tratamientos con productos de origen natural modulan la expresión de miARNs en cáncer (Tabla 2).

Tabla 2. miARNs modulados en cáncer por compuestos de origen natural.

Compuesto natural	Tipo de cáncer	miARNs sobre-expresados	miARNs sub-expresados	Cita
Curcumina	Líneas celular de cáncer pancreático	miR-22, 34a, 24, 181a, 181b, 21, 27a.	miR-199, 510, 196a, 7,15b, 195, 374, 98.	52
I3C, DIM	Cáncer pancreático	miR-200b, 200c, let-7b, let-7d, let-7e, 663, 638, 122, 149.	miR-21, 31, 130a, 156b, 377, 20b, 654, 34c.	53
Isoflavonoides	Cáncer pancreático y pulmón	miR-200b, 200c, let7b, let-7c, let7-d, 663, 146a, 374b.	miR-34c, 376a, 96a, 320, 654, 34c, 196	53,54
Resveratrol, folatos, retinoides y vitamina E.	Diferentes tipo de cáncer	miR-10a, 10b, 9, 145, 30 ^a , 3p, 152, 122a, 125b.	miR-200a, 496, 296, 30e-5p, 362, 339, 29c, 154, 10a.	55

El uso combinado de agentes naturales con efecto sobre la expresión de ARNm y miARNs junto con los quimioterapéuticos convencionales podrían brindar nuevas aproximaciones para el tratamiento del cáncer³⁸.

A pesar del creciente desarrollo de fármacos derivados de productos de origen natural, únicamente el 3% de la investigación que llega a etapas preclínicas y clínicas se enfoca en el estudio de hongos¹⁸. Aunado a ello, México cuenta con una de las mayores riquezas fúngicas del mundo. Con aproximadamente 6 mil especies conocidas, de las 100 mil registradas en el mundo, nuestro país ocupa el quinto lugar en biodiversidad de hongos a nivel mundial¹⁹. Siendo los hongos conocidos por sus efectos medicinales, es importante caracterizar sus propiedades bioquímicas y aprovechar un recurso tan abundante en el país y a la vez tan poco estudiado.

MICOTERAPIA

El ser humano ha utilizado a los hongos desde el Paleolítico y su evolución se ha visto influenciada por dichos organismos⁵⁶. Su uso a través de la historia ha tenido distintos propósitos, algunos ejemplos de esto son: elementos transformadores (alcoholes y productos fermentados), fuente de alimento, sustancias alucinógenas, venenos y agentes medicinales.

La micoterapia se define como el estudio del uso de extractos y compuestos obtenidos a partir de hongos con el fin de utilizarlos como medicinas o agentes que promuevan la salud⁵⁷. Los hongos han sido utilizados a lo largo de la historia por sus propiedades medicinales en civilizaciones como la Inca, Griega, Mesoamericana, Nativo Americana, Hindú, Siberiana y China⁵⁶. De entre todas las culturas, la China destaca por su amplio conocimiento de plantas y hongos medicinales, conocimiento que se remonta hace más de 3,000 años⁵⁸. Los Antiguos Chinos creían que los hongos fortalecían el cuerpo, prevenían enfermedades y por consecuencia, alargaban la vida de aquellos que los consumían. Esta creencia los llevó al estudio minucioso de una gran variedad de plantas y hongos, y por primera vez describieron, sistematizaron y compilaron sus conocimientos en el tratado más antiguo de fitoterapia que se conoce "Pen Tsao King", escrito hacia el año 200 A.C. Debido al basto conocimiento en hongos y sus propiedades medicinales, la cultura China es considerada la cuna de la micoterapia.

A pesar del conocimiento en micoterapia que poseían las culturas antiguas, no fue hasta mediados del siglo pasado que los hongos tomaron un papel importante en la medicina moderna. Dentro del estudio del cáncer, la micoterapia es un campo relativamente nuevo que promete agentes con propiedades anticancerígenas²⁰. La identificación de principios activos en los extractos fúngicos se ha convertido en un tema de gran interés entre la comunidad científica, debido a la creciente evidencia sobre las propiedades oncogénicas de los hongos y al incremento en la incidencia de diversos tipos de cáncer, los cuales tienen tratamientos limitados, importantes

efectos adversos y no cuentan con terapias dirigidas que permitan abatir los efectos a nivel sistémico²¹. Dentro de los compuestos medicinales que se asignan a los hongos terapéuticos, destacan los polisacáridos de las paredes celulares, los cuales se ha demostrado, actúan como modificadores de la respuesta biológica que limitan la carcinogénesis²². La tabla 3 muestra la actividad antitumoral de algunos extractos crudos de hongos reportados por la literatura.

Tabla 3. Actividad antitumoral de algunos extractos de hongos. Modificado de Popovic, V. *et al.* (2013)⁵⁷

Especie de hongo	Extracto	Tipo de cáncer/ línea celular	Mecanismo de acción
<i>Amauroderma rude</i>	Extracto de agua caliente	Líneas celulares de cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> Inducción de apoptosis.
<i>Antrodia camphorata</i>	Extracto de agua fría	Líneas celulares de cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición del crecimiento celular. Inducción de apoptosis a través de la inducción de especies reactivas de oxígeno. Reducción de HER-2/neu. Disrupción de la vía de señalización PI3K/Akt.
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Extracto etanólico	Células de leucemia murina	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición de la proliferación y migración de células WEHI-3. Reducción de la expresión de proteína MMP-9.
<i>Clitocybe alexandr</i>	Extracto etanólico	Cáncer de pulmón	<ul style="list-style-type: none"> Arresto del ciclo celular en fase S.
<i>Hericiium erinaceus</i>	Extracto de etanol 50%	Carcinoma de colón	<ul style="list-style-type: none"> Supresión de la activación de ERK y JNK. Inhibición de metástasis de pulmón <i>in vivo</i>.
<i>Suillus collinitus</i>	Extracto metanólico	Cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> Incremento en la expresión de p53. Inducción de apoptosis.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Extracto disponible comercialmente Reishi- Max GLpTM	Xenógrafos murinos de células de Cáncer de Mama Inflamatorio (IBC)	<ul style="list-style-type: none"> Reducción en la expresión a nivel de genes y proteínas de moléculas importantes en la vía de señalización PI3K / Akt / mTOR y MAPK.

GANODERMA LUCIDUM

Ganoderma lucidum comúnmente conocido como Reishi (Japón), Lingzhi (China) y Youngchi (Corea), es un hongo comestible, coriáceo que presenta un sombrero en forma de riñón, su color abarca una gama de rojizo a marrón oscuro con una capa brillante y en la naturaleza crece como parásito de algunos árboles como el roble. Este hongo ha sido usado durante siglos por diferentes culturas para la cura y tratamiento de distintas enfermedades así como para promover la longevidad. Este hongo es conocido como “Medicina de Reyes” y ha sido descrito en innumerables Farmacopeas Chinas desde hace más de 2,000 años²³.



Figura 5. Fotografía de un ejemplar de *Ganoderma lucidum*. Tomado de MegaSalud, (2015) ⁵⁹

Compuestos bioactivos aislados de este hongo han demostrado en estudios recientes efectos antioxidantes, antihipertensivos, antiinflamatorios, anticancerígenos, hipoglucemiantes, hipolipemiantes y hepatoprotectores lo cual se atribuye a su alto contenido de polisacáridos, triterpenos, alcaloides, enzimas y proteínas^{24,60}. Se sabe que algunos polisacáridos con la estructura de β -D-glucanos ejercen efectos anticancerígenos en células de leucemia. Por otro lado los triterpenos muestran actividad citotóxica en contra de sarcoma y carcinoma de pulmón en células *in vitro*.

Estudios recientes utilizando extractos de *Ganoderma lucidum* muestran supresión de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B que resultan en la subexpresión del activador plasminógeno de urokinasa (uPA) y en su receptor (uPAR) en células de cáncer de mama y próstata²⁵.

Tabla 4. Función biológica de los compuestos de *Ganoderma lucidum*. Modificado de Sliva, D. et al. (2013)⁶⁰

Compuesto	Función
Polisacáridos	
(1→3)-β-D-glucanos	Inhibición del crecimiento de tumor de sarcoma S180 en ratones.
PS-G, polisacáridos unidos a proteínas (95% polisacáridos y 5% péptidos)	Activación de la respuesta inmune. Estimulación de IL-1β, IL-6, TNF-α, and IFN-γ, producción por macrófagos y linfocitos T. Inhibición de apoptosis de neutrófilos. Inducción de fagocitosis de neutrófilos.
G009, aminopolisacáridos	Antioxidante.
Glicoproteínas (con fucosa)	Estimulación de la expresión IL-1, IL-2 e IFN-γ en células del bazo.
GLIS, proteoglicanos	Activación de linfocitos B.
Cerebrósidos	Inhibición de ADN polimerasa.
Triterpenos	
Ácido Ganodérico (A, C)	Inhibición de la proteína farnesil transferasa.
Ácido Ganodérico F	Inhibición de angiogénesis.
Ácido Ganodérico (U, V, W, X, Y)	Citotoxicidad de células de hepatoma.
Lucidimol (A, B), ganodermanondiol, ganoderiol F, ganodermanontriol	Citotoxicidad de células de sarcoma y carcinoma de pulmón.

ANTECEDENTES

GANODERMA LUCIDUM EN CÁNCER DE MAMA

Con el aumento en la incidencia de casos de cáncer de mama en las últimas décadas y la búsqueda de nuevos esquemas terapéuticos para esta neoplasia, se han realizado numerosos estudios del efecto de *G. lucidum* en cáncer de mama. Actualmente se sabe que extractos de este hongo poseen propiedades antineoplásicas, sin embargo los mecanismos moleculares no se encuentran del todo dilucidados.

En 2004 Daniel Sliva y colaboradores⁶¹ demostraron que el extracto acuoso de *G. lucidum*, Reishimax® Pharmanex (Provo, UT) modula el comportamiento metastásico del modelo celular MDA-MB-231 que representa células tumorales altamente invasivas de cáncer de mama triple negativo. Los datos demostraron que en concentraciones de entre 0.3 - 1.2 mg/ml y tras 6 h de tratamiento, el extracto del hongo reduce la migración en forma dependiente de la concentración. Dicho efecto de inhibición también se reportó en células de mama MCF-7, positivas a receptores hormonales, después de 72 h de tratamiento, sin embargo es probable que el fenotipo observado se deba a una inhibición de la proliferación celular. Los resultados también mostraron que *G. lucidum* inhibe la adhesión de las células MDA-MB-231 en forma dependiente de la concentración ya que suprime la formación de los complejos fibronectina- $\alpha_3\beta_1$ -uPA/uPAR y vitronectina- $\alpha_3\beta_3$ -uPA/uPAR. Además de la migración y adhesión el complejo uPA/uPAR es crucial en la invasión celular ya que regula la actividad proteolítica de los componentes de la matriz extra celular. El ensayo de invasión demostró que *G. lucidum* inhibe la invasión celular dependiente de la concentración después de 72 h de tratamiento. Del mismo modo, el hongo es capaz de suprimir la formación de colonias en la línea MDA-MB-231 dependiente de la concentración después de 14 días de tratamiento; la formación de colonias es una característica típica del potencial metastásico de las células *in vitro*. El mismo grupo también demostró que el extracto comercial de *G. lucidum*, inhibe la proliferación celular de la línea MDA-MB-231 a través de la subexpresión de AKT/NF- $\kappa\beta$ ⁶², que resulta en el arresto de las células en la fase G0/G1 del ciclo celular.

En 2013, Ivette Suarez y colaboradores⁶³ demostraron que el extracto de *G. lucidum*, Reishimax® Pharmanex (Provo, UT), regula negativamente la expresión de genes de la vía PI3K/AKT/mTOR lo que genera un efecto antitumoral en la línea triple negativa de cáncer de mama infiltrante SUM-149. El trabajo describe el efecto del extracto del hongo sobre los programas transcripcionales de la vía PI3K/AKT/mTOR evaluado mediante arreglos de RT-PCR. Los datos obtenidos demostraron que el extracto de *G. lucidum* regula significativamente a la baja el 23% de

los genes de la vía (84 en total) con un tasa de cambio de ± 1.4 y valor de significancia menor a 0.05. Entre los genes que se encontraron subexpresados destacan *AKT1*, *CCND1*, *EIF4G1*, *MAPK1*, *HRAS*, *CCNA2* y *CCNB2*, y entre los pocos genes sobreexpresados se encuentran *JUN* y *FOS*. La expresión alterada del gen mTOR por acción del extracto del hongo fue validada a nivel de proteína mediante western blot, encontrando que el tratamiento disminuye la fosforilación de mTOR en la Serina-2481, que promueve la actividad catalítica intrínseca de los complejos mTORC1 y mTORC2. También encontraron que después de 24 h de tratamiento, los niveles de 4E-BP1 unidos a eIF4E incrementaron en la línea SUM-149, la unión de estas proteínas es importante debido a que reprime la traducción y por tanto la síntesis de proteínas. Así mismo descubrieron que disminuyó en 60% el complejo de inicio de la traducción eIF4F en la línea SUM-149, efecto que no se vio en la línea de tejido normal de mama MCF10A, lo que sugiere la selectividad anticancerígena del *Ganoderma lucidum*. En ensayos *in vivo* con ratones SCID inyectados con SUM-149 y tratados diariamente durante 13 semanas con el extracto del hongo *G. lucidum* se encontró una reducción de más del 50% en tamaño y peso de los tumores en comparación al vehículo.

Un estudio realizado en 2015 por Gonul *et. al*⁶⁴ demostró que el extracto de *G. lucidum*, obtenido del oeste de Antolia Turquía, modula la expresión de miARNs en el modelo celular de CaMa MCF-7 (luminal A). Para ello utilizaron el sistema miScript PCR Array (Qiagen) que mide la expresión de 1066 miARNs. Los resultados mostraron que tras 72 h de tratamiento con una concentración 100 μ g/ml del extracto fúngico, de los 1066 miARNs evaluados 10 resultaron significativamente sobreexpresados y 12 significativamente subexpresados. El miARN con una mayor sobreexpresión fue hsa-miR-125 (TC 10.462) y el más subexpresado fue hsa-miR-27a* (TC -4.469). Estudios previos demostraron que hsa-miR-1285 atenúa la proliferación, migración e invasión en células de carcinoma renal, sugiriendo que este efecto anti-proliferativo se debe a la supresión de la transglutaminasa 2⁶⁵.

JUSTIFICACION

En México y en el mundo, el cáncer de mama representa la principal neoplasia maligna y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mayores a 25 años. El cáncer de mama triple negativo es un subtipo que carece de la expresión de marcadores tumorales que permitan la selección de tratamientos dirigidos, por lo que la quimioterapia es el único tratamiento sistémico disponible, lo cual pone en evidencia la necesidad de buscar y evaluar sustancias que presenten un posible potencial terapéutico.

Conocer los mecanismos moleculares por los cuales actúan los componentes del extracto alcohólico del hongo *G. lucidum* permitirá determinar de manera global las rutas y vías celulares moduladas por el extracto y de este modo contribuir en el conocimiento del efecto biológico de *G. lucidum* en células tumorales, para en un futuro, optimizar su posible uso terapéutico. La caracterización genómica de las células tratadas con el extracto fúngico, permitirá evaluar la expresión de transcritos con propiedades supresoras tumorales u oncogénicas, así como la expresión de moduladores post-transcripcionales como los miARNs y su posible efecto sobre los programas tumorales en cáncer de mama triple negativo.

Este proyecto propone comprender, mediante tecnologías genómicas como microarreglos de expresión, los mecanismos y las vías que modula el extracto de *G. lucidum* en la línea celular triple negativa de cáncer de mama MDA-MB-468. El abordaje permitirá dilucidar las rutas afectadas tras la exposición al extracto lo que permitirá tener una idea más amplia de sus propiedades y modo de acción. Con esta investigación se intentará demostrar que los biocompuestos contenidos en el extracto del hongo *G. lucidum* actúan a nivel génico modulando vías transcripcionales, que se ven mayoritariamente afectadas en patologías como el cáncer. Se eligió como modelo de estudio la línea TN de CaMa MDA-MB-468 porque dentro de los triples negativos esta línea representa a tumores con mayor incidencia en la población de pacientes. Según la clasificación de Lehmann es Parecida a Basal 1 además del que presenta el gen BRCA1 en su estado normal, es decir no esta mutado.

Aun cuando se ha descrito la participación de diversos extractos del hongo *Ganoderma lucidum* en rutas celulares tumorales específicas, para nuestro conocimiento, no existen análisis con abordajes genómicos del transcriptoma y los perfiles de expresión de microARNs en células TN de cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Si el extracto *G11* del hongo *Ganoderma lucidum* posee propiedades antineoplásicas, entonces se espera una modificación en los perfiles de expresión de ARN mensajeros y microARNs que impacten procesos oncogénicos de las células triple negativas de cáncer de mama tratadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Analizar el transcriptoma y el perfil de expresión de microARNs en la línea celular triple negativa de cáncer de mama MDA-MB-468 tratada con el extracto del hongo *Ganoderma lucidum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener la curva dosis-respuesta y determinar la IC_{50} del extracto de *G. lucidum* en la línea celular TN MDA-MB-468.
- Obtener el perfil de expresión de ARNm y miARNs de las células tratadas con el extracto mediante microarreglos de expresión génica.
- Identificar el impacto del extracto sobre las células tratadas mediante análisis ontológicos y de enriquecimiento.
- Obtener lo genes blanco para los miARNs diferencialmente expresados.
- Realizar ensayos *in vitro* de algunas vías alteradas por el extracto para su validación fenotípica.

METODOLOGÍA

EXTRACTO DE *GANODERMA LUCIDUM*

El extracto *G11* del hongo *Ganoderma lucidum*, así como el vehículo (tequila blanco) fueron proporcionados en alícuotas líquidas gracias a una colaboración establecida con el Dr. Daniel Martínez Carrera del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla; quien desarrolló los métodos para su obtención bajo la patente MX322035-B, ver “*Mushroom cultivation and harvesting*” y “*Standardized mushroom extracts*” (Meneses ME, et al.)⁶⁶. El extracto *G11* se mantuvo a una concentración de 46.52mg/ml y junto con el vehículo fueron alícuotados y refrigerados a 4° C hasta su uso.

CULTIVO CELULAR

La línea celular humana de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 fue obtenida de la ATCC (Manassas, VA) y genotipificada para su identificación. Las células fueron mantenidas y crecidas en medio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) ambos productos de la marca ATCC (Manassas, VA). Las células fueron mantenidas en incubadoras a 37°C con 5% de CO₂.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular fue determinada mediante el método de sal de tetrazolio (MTT) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ATCC, Manassas, VA) empleando DMSO como solvente. Brevemente, las células MDA-MB-468 (5.0x10³/pozo) fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas durante la noche a 37° C y 5% de CO₂ para su adhesión. Al día siguiente las células fueron tratadas con el extracto *G11* y el vehículo en 9 diferentes concentraciones (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 mg/ml) además del control (0 mg/ml). Todas las condiciones fueron evaluadas por quintuplicado. Tras 24h de exposición las células fueron incubadas con MTT a 37° C y 5% CO₂ durante 4 h. Finalmente, se disolvieron en DMSO para su posterior lectura de absorbancia a 570nm con un Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA). Este procedimiento se realizó en 3 ocasiones independientes (replicados biológicos).

CURVA DOSIS RESPUESTA E IC₅₀

La curva dosis respuesta del extracto *G11* así como su IC₅₀, fueron determinadas mediante el análisis de los datos de absorbancia obtenidos en los ensayo de viabilidad celular (n=15). Brevemente, los datos de absorbancia fueron normalizados mediante la substracción del valor de

la muestra blanco a los datos de absorbancia obtenidos de las muestras expuestas al extracto *G/1* y del vehículo, posteriormente fueron transformados a porcentaje con respecto al control. Con el programa PRISMA® GraphPad⁶⁷ se graficaron las 9 concentraciones probadas (0.025 - 6.4mg/ml) así como el control (0 mg/ml) contra el porcentaje de viabilidad celular respectivo. Se realizó una transformación a logaritmo de las concentraciones y para la curva dosis-respuesta se hizo una regresión no lineal “Dose response – Inhibition, log(inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters), least squares fit”. Para la obtención de la IC₅₀ se construyó la meseta inferior a 0 y la meseta superior al valor de la concentración más baja, 87.14%.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Las células MDA-MB-468 (4.0x10⁴/pozo) fueron sembradas en placas de 24 pozos e incubadas durante la noche a 37° C y 5% de CO₂ para su adhesión. Al día siguiente las células (6 pozos por condición) fueron tratadas con: 0.34mg/ml del extracto fúngico (que corresponde a su IC₅₀), 0.73µl del vehículo (que corresponde al volumen de alcohol necesario para obtener 0.34mg/ml del extracto fúngico), además del control (células no tratadas). Las células se dejaron en incubación por 24 y 48 h. Al término del periodo de incubación se extrajo el ARN total de las células con Trizol Reagent Invitrogen® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recolectaron las células con trizol y se dejaron toda la noche a -4°C. Al día siguiente se recolectó el contenido y se agregó cloroformo frío. Los tubos fueron centrifugados y se recolectó la fase acuosa. Se agregó isopropanol frío además de acetato de sodio y se precipitó el ARN toda la noche a -20°C. A continuación, tras dos lavados de etanol al 70%, se reconstituyó la pastilla de ARN con agua DEPC. La concentración y pureza del ARN total fueron determinadas mediante espectrofotometría con sistema Nanodrop (Nanodrop, ND-1000 AccesoLab, Mex). Las muestras de trabajo fueron diluidas a 100µg/ml y guardadas a -80°C hasta su uso. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE ARNm

El análisis de expresión génica de ARNs mensajeros se realizó con la plataforma GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, Santa Clara CA, USA) el cual evalúa 44,699 transcritos de genes. Se valoraron tres diferentes condiciones de las células de la línea MDA-MB-468: tratadas con el extracto *G/1*, tratadas con el vehículo y las células no tratadas (control), todo a 24 y a 48 h tras exposición. La expresión génica de cada condición se evaluó por triplicado para un total de 18 arreglos.

PROCESAMIENTO DE MICROARREGLOS HTA 2.0

El procesamiento de los microarreglos se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Affymetrix) en la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Brevemente, 100ng de ARN total fueron retrotranscritos a ADNc, transcritos nuevamente ARNc y marcados con biotina. A continuación, el ARNc marcado fue fragmentado entre 30 y 400pb e hibridado al arreglo. Al término, el arreglo fue lavado y teñido con Cy5, el cual se une a la biotina en aquellos fragmentos que hibridaron correctamente. Los arreglos fueron leídos usando el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA, USA) y la información de intensidad de fluorescencia se almacenó para su posterior análisis.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE ARNm

Los perfiles diferenciales de expresión entre las diversas condiciones fueron analizados mediante el software Transcriptome Analysis Console (TAC). A partir de los archivos *.cel, que contiene las intensidades de fluorescencia cruda para cada sonda, se obtuvieron los datos normalizados mediante el algoritmo SST-RMA y cuantiles en la Affymetrix® Expression Console Software⁶⁸. Una vez normalizados los datos, se usó el software Transcriptome Analysis Console (TAC) de Affymetrix®⁶⁹ para obtener la expresión diferencial de los genes mediante un ANOVA en las comparaciones de extracto *G/1* contra vehículo y vehículo contra control a 24 y 48 h de tratamiento. Se consideraron como genes diferencialmente expresados aquellos que tuvieran una tasa de cambio de $-2 < 2$ y un valor $p < 0.05$. Los diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados se realizaron con el programa BioVenn⁷⁰, mientras que la agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados se realizó con el software R en el ambiente de ggplots⁷¹.

VALIDACIÓN DE MICROARREGLOS HTA 2.0

La validación técnica de los microarreglos HTA-2 se realizó con TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City) mediante PCR en tiempo real usando el sistema QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems, USA)™. Para ello se escogieron 4 genes que resultaron diferencialmente expresados en los microarreglos (*HMOX1*, *FOSL1*, *BVES*, *EGR1*) así como 2 controles endógenos (*ACTB* y *GADPH*). Brevemente, se inició la validación a partir de muestras de ARN total independientes procesadas por triplicado para cada condición (ver metodología de extracción total de ARN). Estas fueron retrotranscritas usando la enzima Super Script II (Invitrogen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, modificando la cantidad de la enzima a 0.75µl por reacción debido a la alta eficiencia de la misma. El ADNc fue almacenado a -20°C hasta su uso. Para la PCR en Tiempo Real se utilizó el buffer TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City) siguiendo las instrucciones de acuerdo al fabricante

empleando 0.75µl de sonda. Los resultados fueron evaluados mediante el análisis comparativo Delta Delta Threshold Cycle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) con ayuda de la librería HTqPCR del ambiente R.

ANÁLISIS DE VÍAS

El análisis de las vías alteradas por los genes diferencialmente expresadas se realizó con el programa Ingenuity® Pathway Analysis (IPA). Brevemente, utilizando los datos de tasa de cambio y valor p de los genes diferencialmente expresados con el extracto *G/1* a 24 y 48 h de tratamiento, se corrió un Core Analysis → Diseases and Functions para obtener aquellas vías y redes en las que están involucrados los genes. Los mapas de calor se realizaron en el ambiente R.

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE GRUPO DE GENES

El análisis de enriquecimiento de grupo de genes se llevó a cabo con el programa Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), Broad Institute; implementado en la plataforma GenePattern (<http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/>). Brevemente, se utilizó la matriz normalizada de la expresión de todos los genes y condiciones obtenida con Affymetrix® Expression Console Software. El análisis se realizó comparando las condiciones *G/1* contra vehículo a 24 y 48 h, mediante gene set y Signal2Noise. El análisis se realizó empleando el cluster biological process y morphological function de Gene Ontology. Los mapas de calor se realizaron en el ambiente R.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE miARNs

El análisis de expresión de microARNs se evaluó mediante la plataforma GeneChip® microRNA microarray v3.0 (Affymetrix, Santa Clara CA, USA). Dicho arreglo evalúa de forma conjunta la expresión de 1,733 miARNs humanos maduros. El diseño para este ensayo incluyó tres condiciones: células MDA-MB-468 tratadas con el extracto *G/1*, células tratadas con el vehículo y células no tratadas (control) tras 48 h de exposición. La expresión génica de cada condición se evaluó por triplicado para un total de 9 arreglos.

PROCESAMIENTO DE MICROARREGLOS miRNA 3.0

El procesamiento de los microarreglos para miARNs se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Affymetrix, FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit Manual) en la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Brevemente, 600 ng totales de ARN fueron marcados con el flashtag HSR kit e hibridados al sistema Gene Chip. Los procesos de lavado y teñido se realizaron en la estación de fluidos GeneChip Fluidics Station 450

(Affymetrix, Santa Clara CA, USA). Los arreglos fueron leídos usando el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA, USA).

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE miARNs

Los perfiles diferenciales de expresión de microARNs entre las diversas condiciones fueron analizados mediante el software Transcriptome Analysis Console (TAC). A partir de los archivos *.cel, que contiene las intensidades de fluorescencia cruda para cada sonda, se obtuvieron los datos normalizados mediante el algoritmo RMA-DABG sólo para miARNs humanos en la Affymetrix® Expression Console Software⁶⁸. Una vez normalizados los datos, se usó el software Transcriptome Analysis Console (TAC) de Affymetrix®⁶⁹ para obtener la expresión diferencial de los miARNs mediante un ANOVA en las comparaciones de extracto *G/1* vs vehículo y vehículo vs control a 48 h de tratamiento. Se consideraron genes diferencialmente expresados aquellos que tuvieran una tasa de cambio de $-2 < 2$ y un valor de $p < 0.05$. La agrupación jerárquica de los genes diferencialmente expresados se realizó con el software R⁷¹ en el ambiente de ggplots.

PREDICCIÓN *IN SILICO* DE POSIBLES BLANCOS PARA miARNs

Los genes blanco para los miARNs diferencialmente expresados se obtuvieron mediante un análisis de predicción con los algoritmos TargetScan⁷², miRanda⁷³ y PITA⁷⁴. A continuación, con el módulo MAGIA se realizó un análisis de correlación de Spearman entre la expresión de los blancos predichos y la expresión de los miARNs. Aquellas correlaciones negativas mayores al 30% y con valor de $p < 0.05$ se consideraron como una interacción directa entre el miARN y el gen blanco.

CURVA DE TIEMPO PARA VIABILIDAD CELULAR

La curva de tiempo para viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-468 tratada con el extracto *G/1* y el vehículo fue determinada mediante el método de sal de tetrazolio (MTT) con el kit comercial MTT Cell Proliferation Assay de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ATCC, Manassas, VA) empleando DMSO como solvente. Brevemente, las células MDA-MB-468 (5.0×10^3 /pozo) fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche para su adhesión. Al día siguiente las células (5 pozos por condición) fueron tratadas con el extracto *G/1* (0.34mg/ml), o el vehículo y se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 h. Pasado el tiempo de tratamiento, las células fueron incubadas con MTT durante 4 h, y disueltas en DMSO. Finalmente, se leyó la absorbancia a 570nm con un Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA). El ensayo se realizó por triplicado con un total de 15 evaluaciones.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular fue determinada con el ensayo de Cristal Violeta (Droguería San Isidro, Ciudad de México). Brevemente, las células MDA-MB-468 (5.0×10^3 /pozo) fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche para su adhesión. Al día siguiente las células (5 pozos por condición) fueron tratadas con el extracto *G/1* (0.34mg/ml) o el vehículo durante 96 h. Al término de la incubación las células fueron lavadas con PBS y fijadas con etanol al 70% durante 10 minutos a -20°C. Las células se tiñeron con una solución al 15% de violeta de genciana durante 10 minutos. Pasado el tiempo se enjuagó la placa con agua corriente hasta eliminar los residuos. Se dejó secar por completo y el colorante fue diluido en 100µl de ácido acético al 10%. Se leyó la absorbancia a 570nm en un Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA). El ensayo se realizó por triplicado con un total de 15 evaluaciones.

ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular de la línea MDA-MB-468 tratada con el extracto *G/1* o el vehículo se midió mediante el uso de sistemas Transwell® (Corning, New York). Brevemente, las células MDA-MB-468 (3.0×10^6 /pozo) fueron sembradas en placas de 4 pozos e incubadas a 37° C y 5% de CO₂ durante la noche para su adhesión. Al día siguiente las células (4 pozos por condición) fueron tratadas con el extracto *G/1* (0.34mg/ml) o el vehículo por 48 h. Al término de la incubación las células fueron recolectadas, contadas y re suspendidas en medio libre de suero a una concentración de 100 mil células en 300µl. Posteriormente se colocaron las células en la cámara transwell (3 transwell por condición), en la parte inferior se colocaron 750µl de suero adicionado con 10% de suero fetal bovino. Las células en el transwell se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h, pasando se fijaron las células con 700µl de EtOH 70% durante 1 hora a -20°C. Las células que migraron en el sistema Transwell fueron teñidas con cristal violeta (Droguería San Isidro, Ciudad de México), ver Metodología – Ensayo de Proliferación celular, y se determinaron los valores de absorbancia a 570nm en un Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA). El ensayo se realizó por duplicado con un total de 6 evaluaciones.

ENSAYO DE APOPTOSIS CELULAR

Las células MDA-MB-468 fueron tratadas con el extracto *G/1* o con el vehículo por 48 h. El efecto apoptótico fue analizado mediante citometría celular con el estuche FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis Kit® (LifeTechnologies, Oregon, USA). Brevemente, las células MDA-MB-468 (2.0×10^5 /pozo) fueron sembradas en placas de 6 pozos y dejadas durante la noche a 37° C y 5% de CO₂ para su adhesión. Al día siguiente las células fueron tratadas con el extracto *G/1* (0.34mg/ml) o vehículo y se dejaron en incubación por 48 h. Al termino del tratamiento las células

fueron recolectadas e incubadas con AnnexinV Binding buffer, se agregaron 5µl de FITC (Alexa Fluor® 488 annexinV) y 1µl de la solución diluida de PI por cada 100µl de células en suspensión. Se dejó incubar por 15 minutos en la oscuridad y se agregaron 400µl de 1x Annexin Binding Buffer. Se colocaron las muestras en hielo y se leyó la emisión de fluorescencia a 530 y 574nm en un citómetro de flujo FACS Aria I con 10 000 eventos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos para determinar diferencias significativas (valor p) entre las condiciones analizadas para los ensayos de viabilidad, proliferación, migración y apoptosis celular se realizaron con el programa PRISMA® GraphPad mediante una prueba T paramétrica, no pareada, asumiendo desviación estándar diferente para cada muestra⁶⁷.

RESULTADOS

EL EXTRACTO *G11* DISMINUYE LA VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el efecto del extracto *G11* del hongo *Ganoderma lucidum* sobre la viabilidad celular de la línea TN MDA-MB-468, las células fueron tratadas con 9 diferentes concentraciones (0.025 - 6.4mg/ml) durante 24 h. Los resultados (Figura 6) mostraron que el extracto *G11* (barras azules) reduce la viabilidad de las células MDA-MB-468 en forma dependiente de la concentración del extracto en comparación al vehículo (barras verdes). Es decir, a mayor concentración del extracto fúngico menor viabilidad celular. Desde la concentración más baja probada (0.025 mg/ml) se aprecia una reducción significativa de la viabilidad. En las concentraciones de 1.6, 3.2 y 6.4 mg/ml la viabilidad celular presenta valores cercanos a cero, lo que indica que a partir de 1.6 mg/ml se alcanza una concentración citotóxica, que en este caso es útil para el cálculo de la IC₅₀.

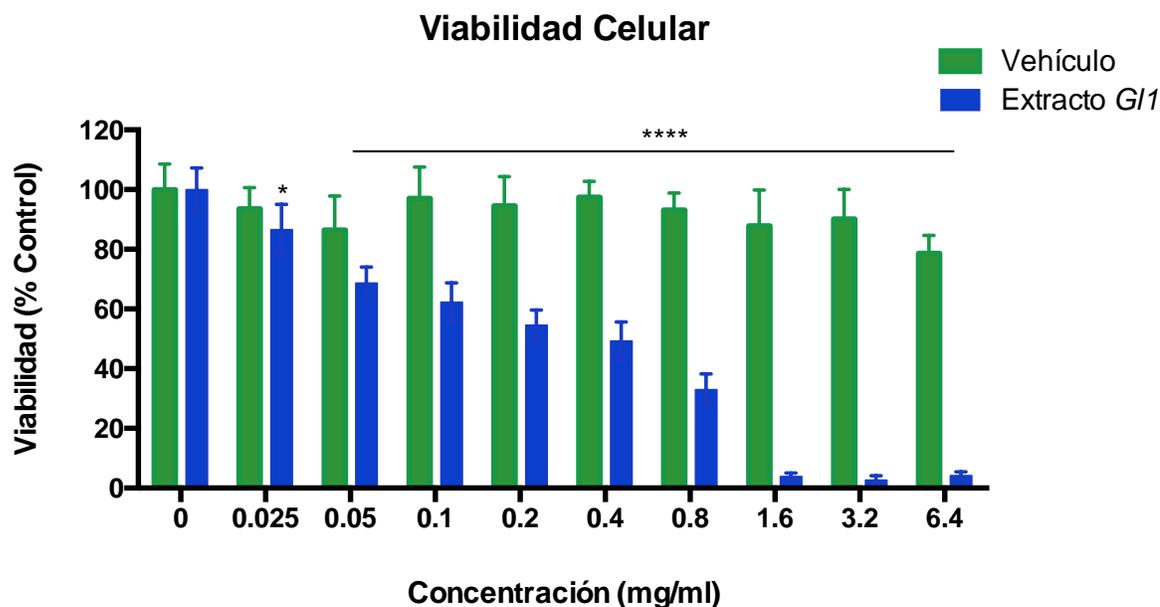


Figura 6. Viabilidad celular tras 24 h de tratamiento con el extracto *G11* (azul) y vehículo (verde) de la línea de CaMa TN MDA-MB-468. En el eje y se muestra el porcentaje de viabilidad celular en referencia al control (0 mg/ml). En el eje x se muestran las 9 diferentes concentraciones probadas del extracto. Cada barra representa el promedio de 5 repetidos en 3 réplicas experimentales independientes (n=15). Cada asterisco representa un orden de significancia. Las barras representan desviación estándar.

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA (IC₅₀) DEL EXTRACTO *G11*

Para definir la IC₅₀ del extracto del hongo *Ganoderma lucidum* en las células de cáncer de mama TN MDA-MB-468 y evaluar su efecto sobre diversos fenotipos celulares se realizó una curva dosis-respuesta. La figura 7 muestra la curva sigmoidea dosis-respuesta para el extracto *G11*. La

gráfica representa la viabilidad relativa de las células MDA-MB-468 (eje y) y el logaritmo de las concentraciones (eje x) del extracto al cual se expusieron las células. Los puntos representan el valor de viabilidad relativa para cada concentración probada mientras que las barras representan la desviación estándar.

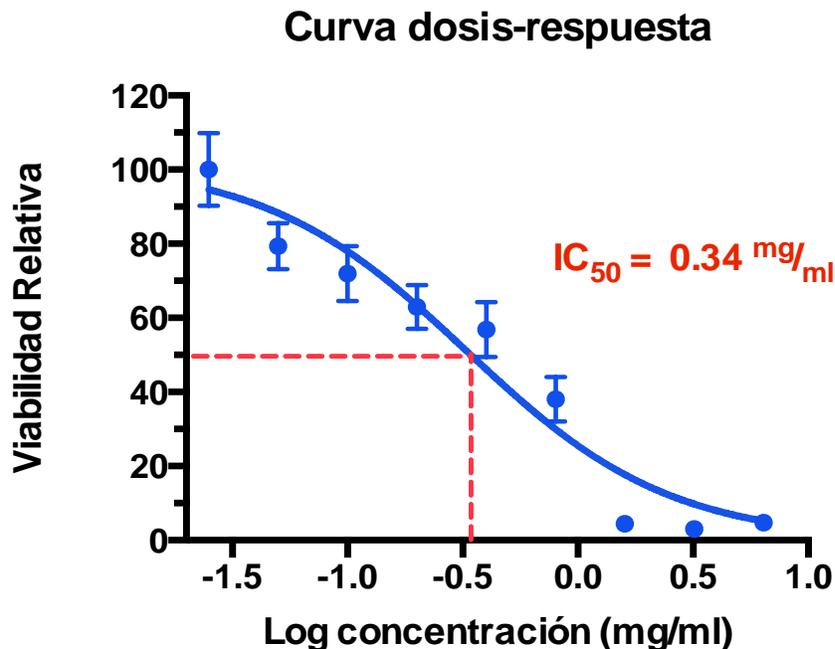


Figura 7. Curva dosis-respuesta de la línea de CaMa TN MDA-MB-468 tratada durante 24 h con el extracto *G11*. En el eje y se muestra el porcentaje de viabilidad celular relativa en referencia a la meseta superior de la curva. En el eje x se muestra el logaritmo de las 9 concentraciones probadas. La línea roja punteada muestra el punto de corte para la IC_{50} del extracto. Cada valor representa el promedio de 5 repetidos en 3 réplicas experimentales independientes ($n=15$). Las barras representan la desviación estándar.

La concentración inhibitoria media (IC_{50}), que representa la concentración en la cual se inhibe el 50% de la viabilidad celular, para el extracto *G11* a 24 h de tratamiento fue de 0.34mg/ml. La curva dosis respuesta tiene una pendiente con valor negativo cercano a uno y un coeficiente de correlación R^2 mayor a 0.92. Dicha concentración se utilizó para los ensayos posteriores. La tabla S1 presenta la información referente a la regresión no lineal, inhibición dosis-respuesta de 4 parámetros con pendiente variable para el extracto *G11*.

Una vez determinada la IC_{50} (0.34mg/ml) del extracto *G11*, se expuso a las células (MDA-MB-468) por 24 y 48 h al extracto fúngico con el fin de extraer su ARN y utilizarlo para evaluar el perfil de expresión génica de las células tratadas en comparación a los controles.

LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ARNm DISTINGUE A LAS CÉLULAS TRATADAS CON EL EXTRACTO *G/1* COMO UN GRUPO INDEPENDIENTE AL VEHÍCULO

A partir de los análisis de microarreglos se obtuvieron los perfiles de expresión diferencial entre el extracto fúngico *G/1* y los controles experimentales. Los resultados no mostraron diferencias significativas a nivel de expresión entre el vehículo y el control (células no tratadas) ni a 24 (Figura S1) ni a 48 h (Figura S2), lo que sugiere que el vehículo empleado no afecta el estado transcripcional de las células tratadas. Los datos de los genes diferencialmente expresados con el extracto *G/1* fueron analizados en comparación al vehículo.

La agrupación jerárquica de los ARNm diferencialmente expresados entre el extracto *G/1* y el vehículo a 24 (Figura 8) y 48 h (Figura 9), representados mediante mapas de calor, muestra una clara separación entre los grupos comparados (extracto *G/1* vs vehículo) basada en las distancias y correlaciones presentes entre ambos. Es decir, los perfiles de expresión génica distinguen la individualidad de cada condición experimental y detectan diferencias significativas generadas por el tratamiento con extracto fúngico. En las figuras 8 y 9 observamos dos grupos, el primero de ellos lo conforma el extracto *G/1* (morado), mientras que el segundo grupo está formado por el vehículo (naranja), lo que habla de una diferencia significativa entre los genes modulados por el extracto en comparación al vehículo. La lista completa de los genes diferencialmente expresados, así como su tasa de cambio y valor p se encuentran en el Anexo-B, tabla S2 para 24 h y tabla S3 para 48 h.

Expresión diferencial ARNm 24 horas

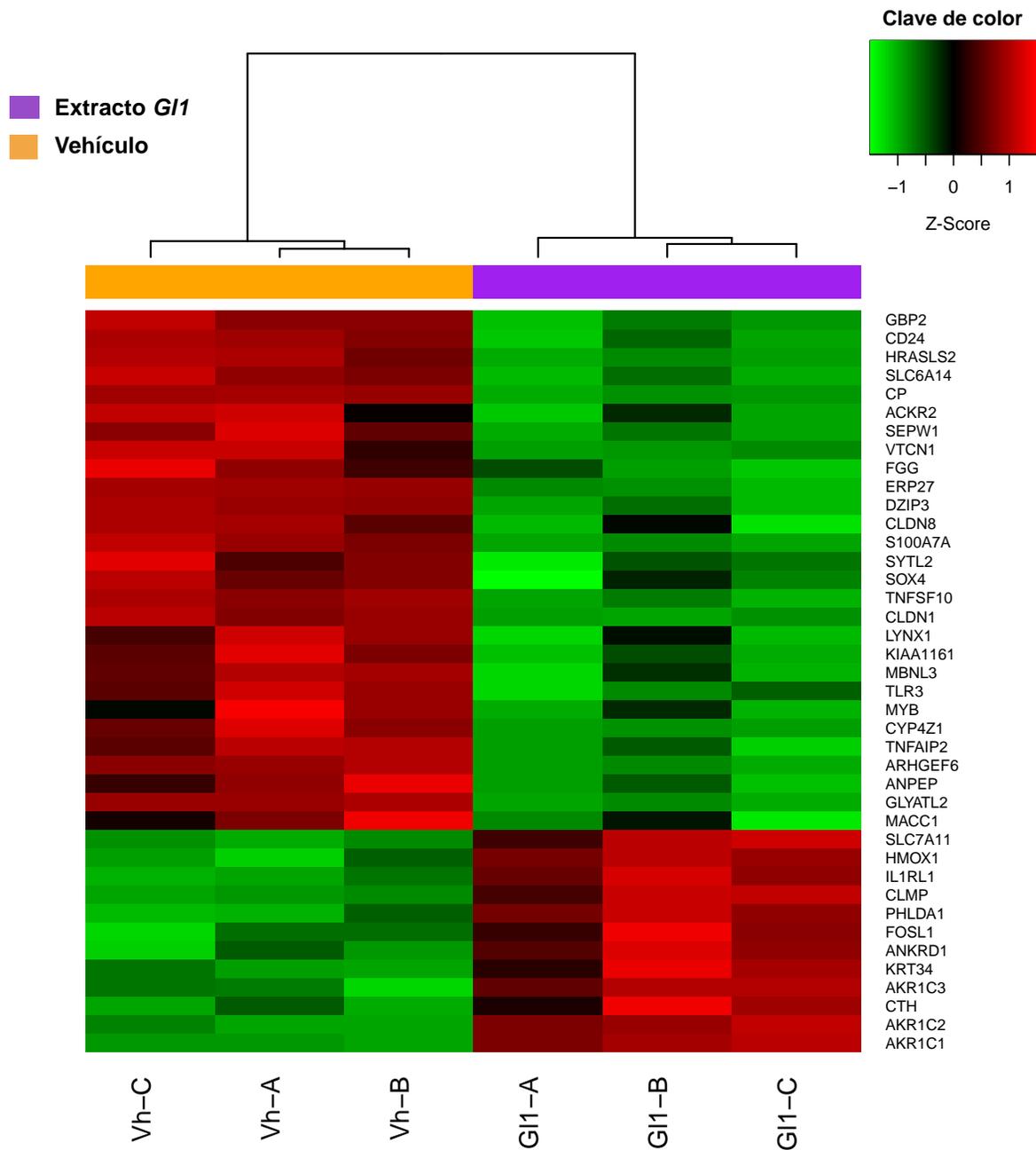


Figura 8. Mapa de calor con valores de expresión normalizados escalados a z-score de los genes diferencialmente expresados en la línea de CaMa TN MDA-MB-468 tras 24 h de tratamiento con *G. lucidum*. Se muestra el extracto *G1* (morado) y el vehículo (naranja). Las columnas representan las muestras (células tratadas con el extracto *G1* o vehículo por triplicado), las filas representan los genes. En rojo se muestran los genes sobreexpresados, en verde los subexpresados y en negro aquellos que no presentaron cambio. En la parte superior se representa el dendrograma de agrupamiento jerárquico de cada una de las muestras. Se presentan los genes con una tasa de cambio $-2 < 2$ y un valor $p < 0.05$.

Expresión diferencial ARNm 48 horas

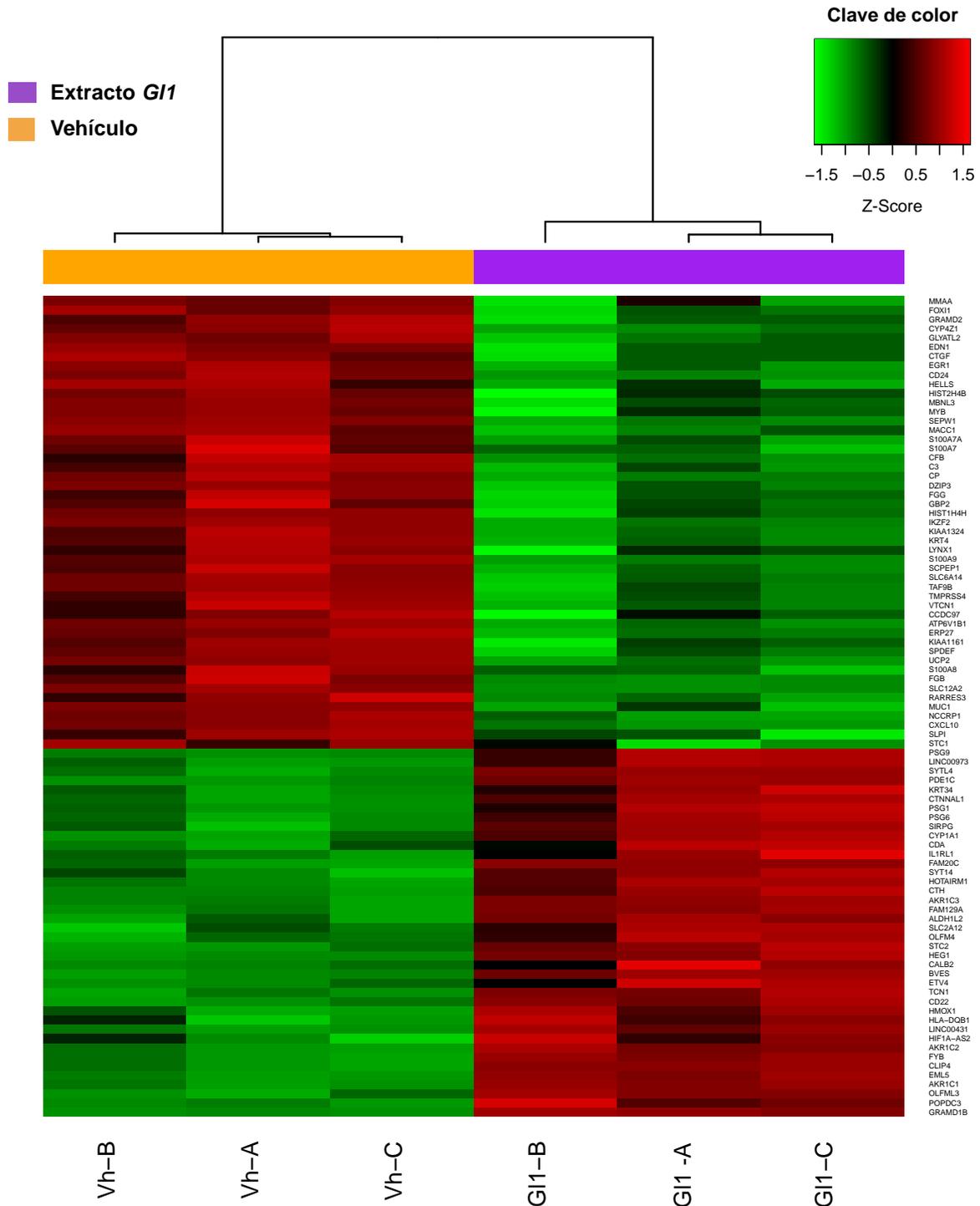


Figura 9. Mapa de calor con valores de expresión normalizados escalados a z-score de los genes diferencialmente expresados en la línea de CaMa TN MDA-MB-468 tras 48 h de tratamiento con *G. lucidum*. Se muestra el extracto *G1* (morado) y el vehículo (naranja). Las columnas representan las muestras (células tratadas con el extracto *G1* o vehículo por triplicado), las filas representan los genes. En rojo se muestran los genes sobreexpresados, en verde los subexpresados y en negro aquellos que no presentaron cambio. En la parte superior se representa el dendrograma de agrupamiento jerárquico de cada una de las muestras. Se muestran los genes

La validación técnica de los arreglos, la cual se realizó mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan mostró que de las 4 sondas probadas (*HMOX1* y *FOSL1* para 24 h y *HMOX1*, *BVES* y *EGR1* para 48 h), sólo el gen *EGR1* a 48 h no se validó ya que no obtuvo un valor $p < 0.05$ y su tasa de cambio que es de -1.11 no está dentro del corte $-2 < 2$ para considerarlo estadísticamente significativo (Tabla S4).

Tabla 5. Resultado de la validación técnica de microarreglos por PCR en tiempo real. La tabla muestra los genes validados por PCR en tiempo real, así como su tasa de cambio y valor p.

Tiempo de tratamiento	Nombre del gen	Técnica	Tasa de cambio (lineal)	Valor p
24 h	HMOX1	Microarreglos	5.21	0.001876
		PCR en tiempo real	10.01	3.23E-11
	FOSL1	Microarreglos	2.22	0.010988
		PCR en tiempo real	8.77	9.39E-12
48 h	HMOX1	Microarreglos	3.17	0.002498
		PCR en tiempo real	7.07	0.018911
	BVES	Microarreglos	2.6	0.001092
		PCR en tiempo real	4.17	0.018316
	EGR1	Microarreglos	-4.44	0.001393
		PCR en tiempo real	-1.11	0.880940

DESPUÉS DE 24 Y 48 H DE TRATAMIENTO CON G/1 EXISTEN GENES COMPARTIDOS Y EXCLUSIVOS PARA CADA TIEMPO

El número total de genes diferencialmente expresados a 24 h fue de 40 genes y a 48 h de 89 genes. De los 40 genes encontrados a 24 h de tratamiento, 12 se encuentran sobreexpresados y 28 subexpresados. De los 89 genes encontrados a 48 h, 40 se encuentran sobreexpresados y 49 subexpresados. En ambos tiempos se comparten un total de 24 genes de los cuales 7 se encuentran sobreexpresados y 17 subexpresados. Para 24 h existen 16 genes específicos de ese tiempo y para 48 h 65 genes. Esta información pone de manifiesto que el tiempo de exposición con el extracto *G/1* es un factor que impacta el perfil de expresión diferencial de las células (Figura 10) y que existen genes cuya regulación ocurre desde tiempos tempranos hasta condiciones que requieren mayor tiempo de exposición. Así mismo podemos observar, que entre mayor es el tiempo de tratamiento existe un mayor número de genes alterados por el extracto.

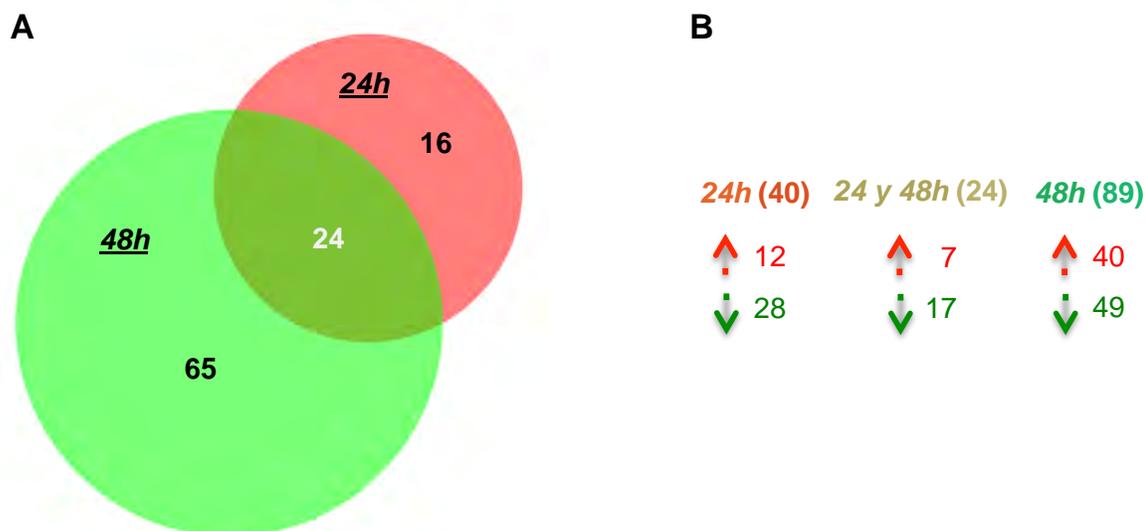


Figura 10. Diagrama de Venn donde se observa la correlación entre los genes diferencialmente expresados con el extracto *G11* a 24 y 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. (A) Diagrama de Venn con la distribución del número de genes dependiendo del tiempo, 24 y 48h de tratamiento. (B) Comparación de número de genes alterados entre 24 y 48 h. Entre paréntesis se encuentra el número total de genes diferencialmente expresados para el tiempo. En rojo se encuentra el número de genes sobreexpresados y en verde el número de genes subexpresados. Se muestran aquellos genes con una tasa de cambio $-2 < 2$ y un valor $p < 0.05$. Se observa que tras 24 y 48 h de tratamiento, existen genes diferencialmente expresados que son compartidos y exclusivos para cada tiempo.

LAS VÍAS ALTERADAS POR EL EXTRACTO *G11* SE ACENTÚAN DESPUÉS DE 48 H DE TRATAMIENTO

Para definir el impacto biológico del extracto sobre los programas celulares se llevó a cabo un análisis de vías con los genes diferencialmente expresados tras 24 y 48 h de tratamiento mediante el programa Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®).

La figura 11, muestra un mapa de calor con los valores de activación de las principales vías alteradas con el extracto. En verde se representan aquellas vías que están hacia la baja (valor de z-score negativo), en morado aquellas que están a la alza (valor de z-score positivo) y en blanco aquellas con un valor de z-score cercano a cero. En la figura se observa que a 48 h existen un mayor número de vías que presentan una activación o inhibición en comparación a 24 h. También se observa que aquellas rutas presentes a 48h tienen un mayor valor de inhibición que a 24 h. Destacan las vías de viabilidad, proliferación y migración celular alteradas por el tratamiento del

extracto las cuales tienen un impacto importante en el establecimiento y desarrollo de la carcinogénesis

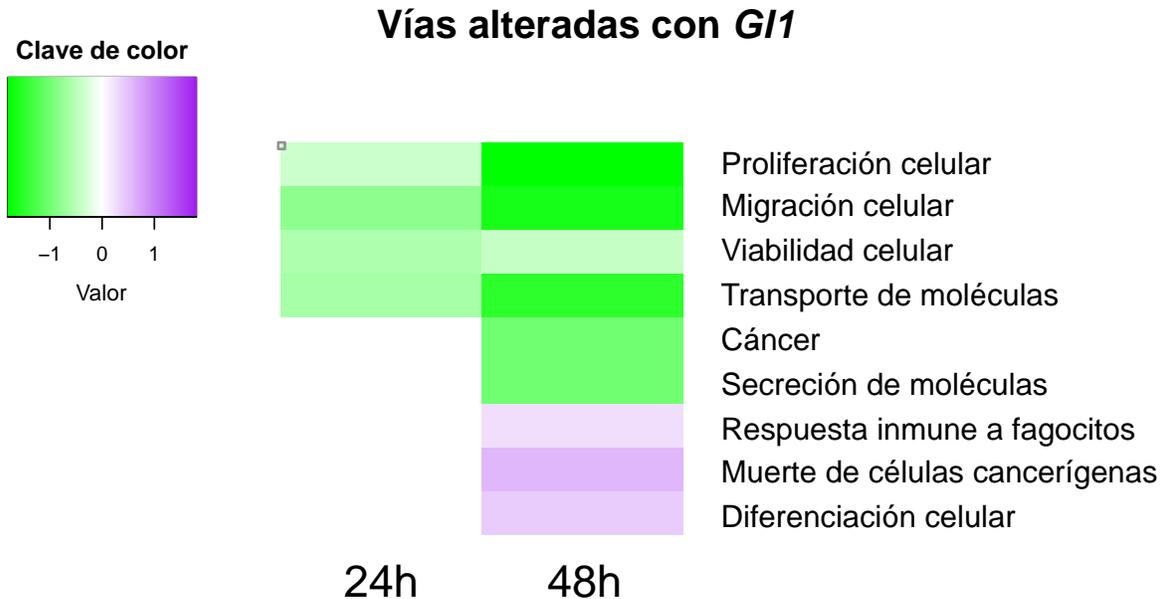


Figura 11. Mapa de calor de las principales vías alteradas obtenidas con los genes diferencialmente expresados con el extracto *G11* a 24 y 48 horas de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. Las filas representan las vías alteradas y las columnas los tiempos de tratamiento. En morado se muestran las vías que se encuentran activadas, en verde las inactivadas y en blanco aquellas que no presentan un cambio con respecto al vehículo. Se gráfica el valor z-score obtenido con el programa IPA. Se observa que las vías alteradas por el extracto *G11* se acentúan después de 48 h de tratamiento.

Una vez obtenidas las vías alteradas con los genes diferencialmente expresados, se obtuvieron las redes de los genes que están involucrados en dichas vías. La figura 12 muestra 3 ejemplos de las redes más representativas que se encuentran disminuidas tanto a 24 como a 48 h tras el tratamiento con el extracto *G11*. En las redes se puede observar que varios genes son compartidos por las vías, además de que tras 48 h de tratamiento, el número de genes involucrado en la disminución de la actividad de la vía se incrementa en comparación a 24 h.

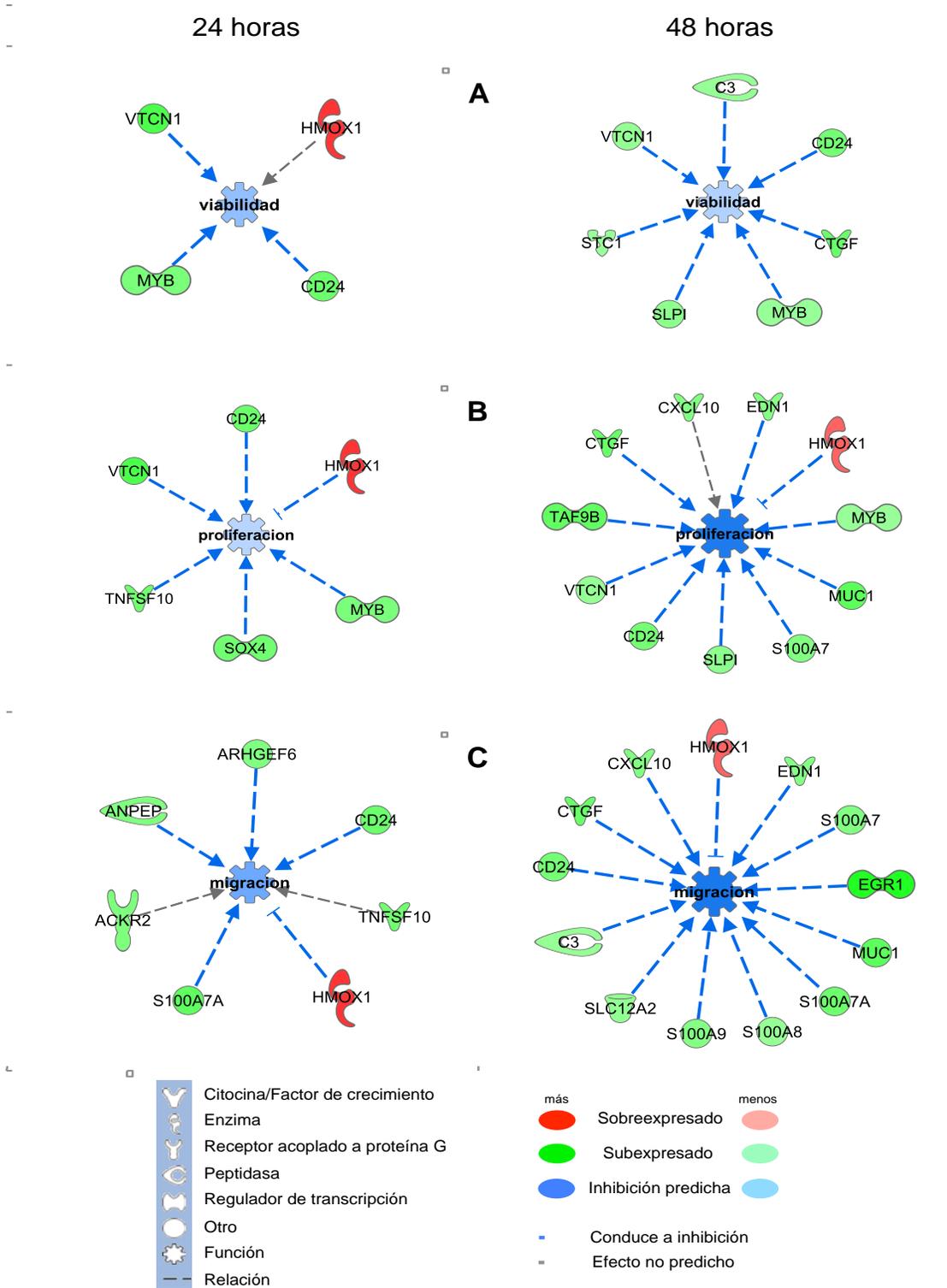


Figura 12. Red de las principales vías alteradas con los genes diferencialmente expresados. Se muestran: (A) viabilidad, (B) proliferación y (C) migración celular tras 24 y 48 h de tratamiento con el extracto de *G11*. Se observa que la disminución de la actividad de las vías está dada por la subexpresión de ciertos genes, efecto que se acentúa tras 48 h de tratamiento con *G11*.

EI TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO *G11* IMPACTA EN LOS PROCESOS DE REPARACIÓN DE ADN EN EL MODELO CELULAR TRIPLE NEGATIVO

Como otra estrategia para definir los procesos que se ven alterados por los biocompuestos contenidos en el extracto *G11*, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes basado en la distribución de la expresión génica en cada condición experimental con el programa Gene Set Enrichment Analysis (GSEA®). En la figura 13 se aprecia que el tiempo de exposición al tratamiento es un factor determinante para la modulación de las vías. Así mismo se aprecia que existen vías que se ven subreguladas únicamente a 24 h como son: reparación por escisión de nucleótidos; vías enriquecidas únicamente a 48 h como: reparación de ADN de doble cadena, inicio de replicación y división celular entre otros; mientras que otras vías como: reparación de ADN, actividad de ADN polimerasa y mitosis aparecen en ambos tiempos pero con un diferente score de enriquecimiento. De las vías subreguladas destacan aquellas que están relacionadas a la reparación de ADN y al procesamiento de ARN como posibles mecanismos de la disminución en la viabilidad celular.

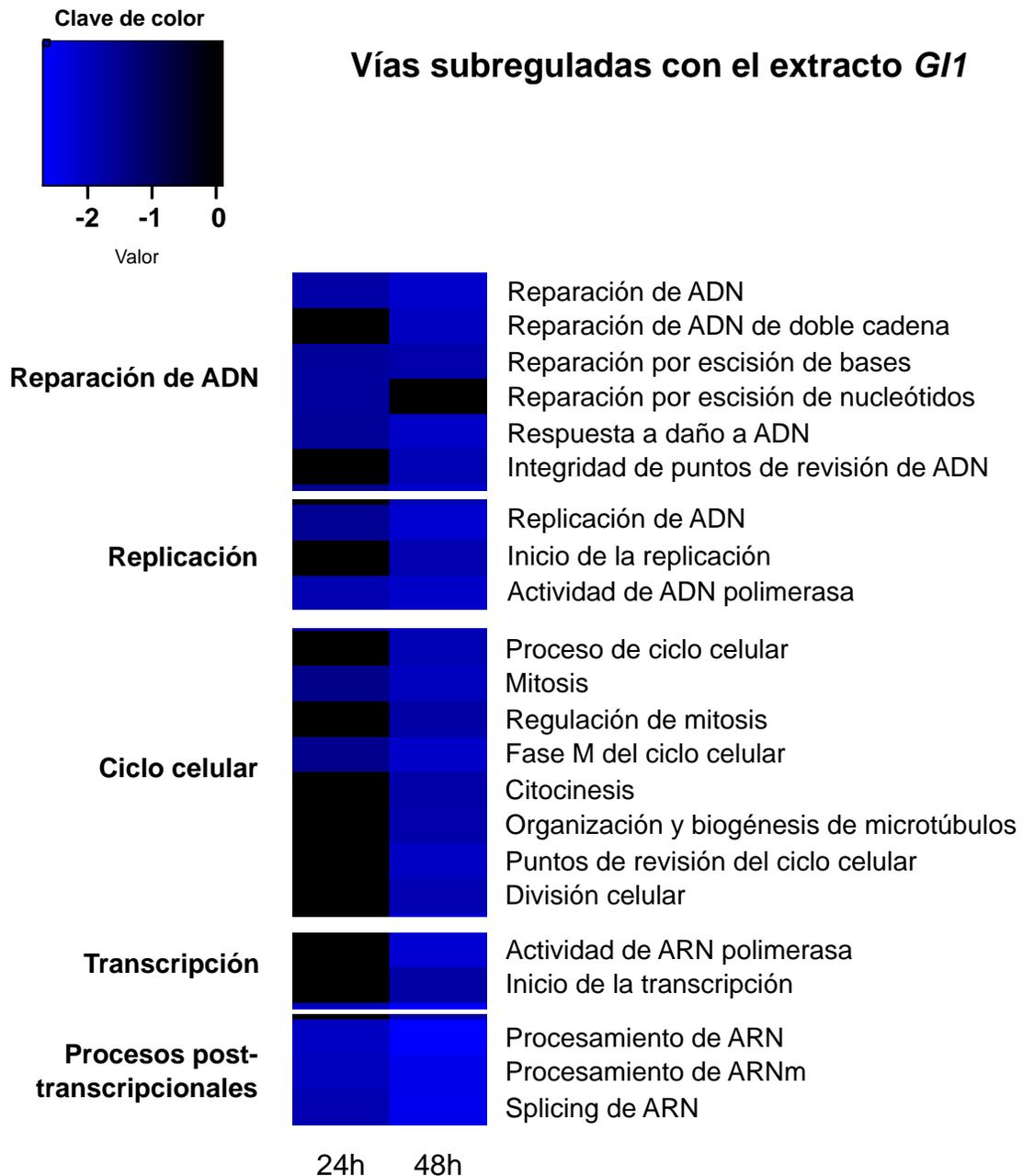
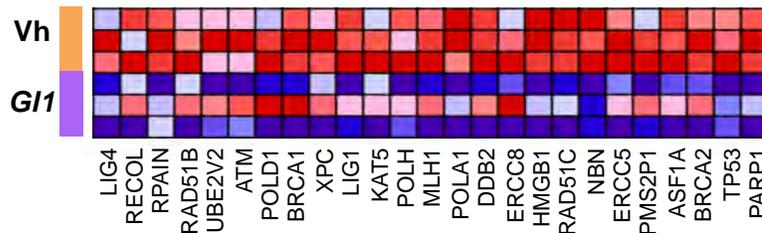


Figura 13. Mapa de calor de las principales vías subreguladas con el extracto *G11* tras 24 y 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. Las filas representan las vías y las columnas los tiempos de tratamiento. En azul se muestran las vías que se encuentran subreguladas y en negro aquellas que no presentan un cambio con respecto al vehículo. Se gráfica el valor enriquecimiento obtenido con el programa GSEA. Se observa que tras 48 h de tratamiento, existen un mayor valor de subregulación en las vías que a 48h.

La figura 14 muestra las gráficas de enriquecimiento de reparación de ADN a 24 y 48 h tras el tratamiento con el extracto de *G. lucidum*, obtenidas con el programa GSEA.

A



B

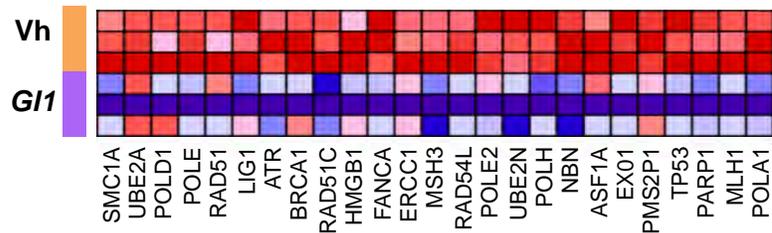


Figura 14. Gráficas de enriquecimiento con GSEA para la vía de reparación de ADN a 24 y 48 h tras 24 y 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. Se muestra la gráfica de reparación de ADN a 24 (A) y 48 h (B). La línea verde representa el enriquecimiento, cada línea negra (código de barras) representa un gen. El mapa de calor muestra la intensidad de fluorescencia de los 25 genes más subregulados de la vía. Las columnas representan un gen diferente y las filas representan las muestras extracto *G11* (morado) y vehículo (naranja) por triplicado. En rojo aparecen los valores sobreexpresados y en azul los subexpresados. Se observa una mayor subrepresentación de la vía tras 48 h de tratamiento en comparación a 24 h.

EL EXTRACTO *G/1* DISMINUYE LA VIABILIDAD CELULAR A TRAVÉS DEL TIEMPO

Para evaluar el efecto del extracto *G/1* del hongo *Ganoderma lucidum* sobre la viabilidad celular a través del tiempo en la línea TN MDA-MB-468, las células fueron tratadas con la IC_{50} (0.34 mg/ml), durante 0, 24, 48, 72 y 96 h. Como se muestra en la figura 15, el extracto *G/1* disminuye la viabilidad de las células MDA-MB-468 en forma dependiente del tiempo. En la figura se observa que a las 24 h de tratamiento ya se nota una disminución significativa de la viabilidad en comparación al vehículo. En los tiempos subsecuentes se mantiene una viabilidad muy similar a la obtenida en 24 h. Mientras que el vehículo presenta un aumento con respecto a las células tratadas con el extracto fúngico.

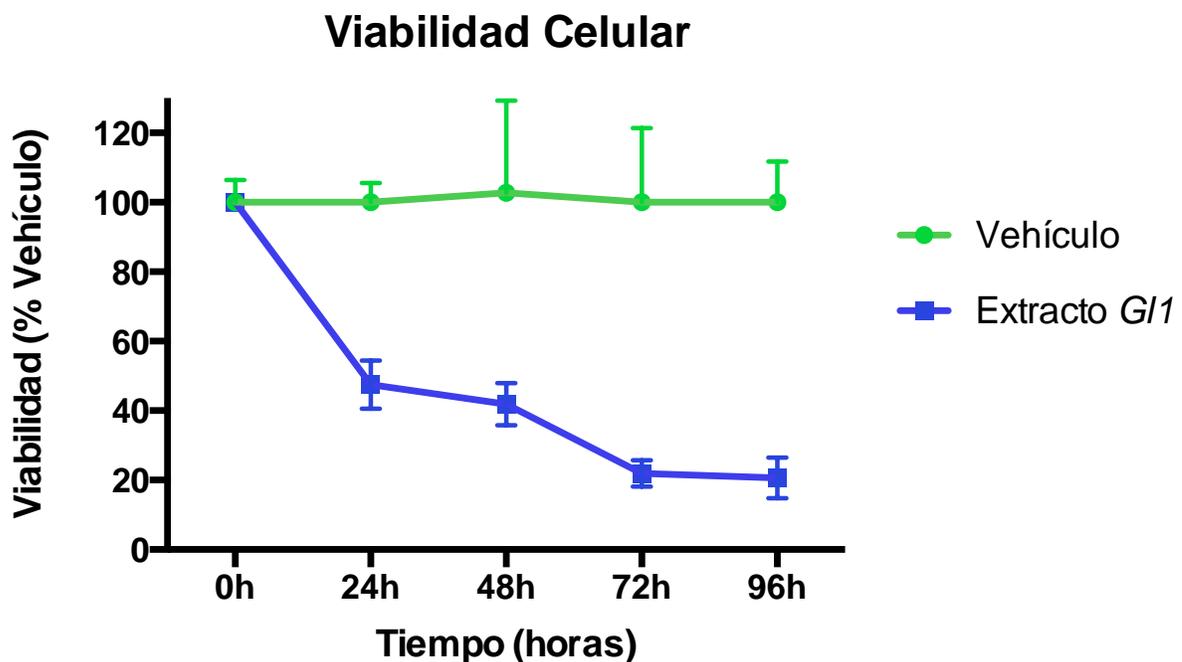


Figura 15. Disminución de la viabilidad celular a través del tiempo por el extracto *G/1* en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. Se muestran los resultados de viabilidad del extracto *G/1* (azul) y del vehículo (verde). En el eje x se muestra la tasa de cambio de la viabilidad celular con respecto al tiempo 0. En el eje y se muestra el tiempo de tratamiento en h. Cada valor representa el promedio de 5 repetidos en 3 réplicas experimentales independientes (n=15). Las barras representan la desviación estándar.

EL EXTRACTO *G/1* DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El efecto del extracto *G/1* sobre la proliferación celular en la línea MDA-MB-468 tras 96 h de tratamiento muestra una inhibición de aproximadamente el 60% en comparación al vehículo (Figura 16).

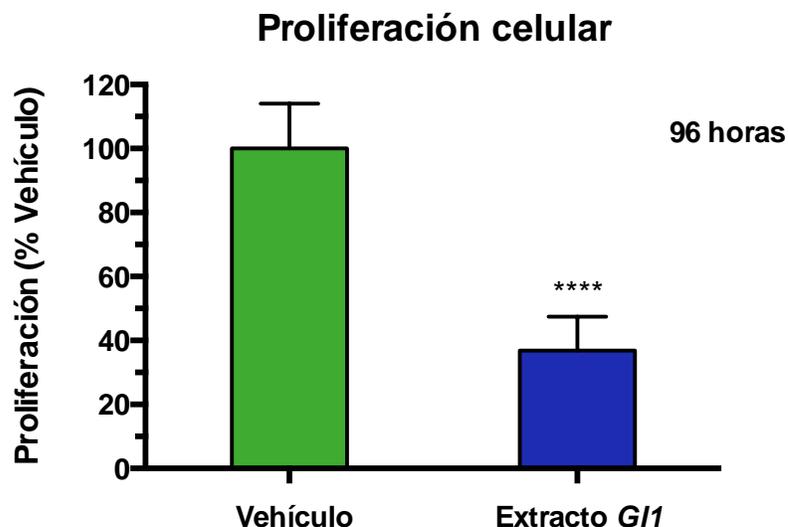


Figura 16. Disminución de la proliferación celular por el extracto G11 tras 96 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. En el eje y se muestra el porcentaje de proliferación en relación al vehículo. En el eje x se muestran los resultados del vehículo (verde) y el extracto G11 (azul). Cada barra representa el promedio de 5 repetidos en 3 réplicas experimentales independientes (n=15). Cada asterisco representa un orden de significancia. Las barras representan la desviación estándar.

EL EXTRACTO G11 DISMINUYE LA MIGRACIÓN CELULAR

El efecto del extracto G11 sobre la migración celular de la línea MDA-MB-468 se midió mediante sistema transwell. Los resultados mostraron que, tras 48 h de tratamiento, el extracto G11 inhibe en aproximadamente 40% la migración celular en comparación al vehículo (Figura 17).

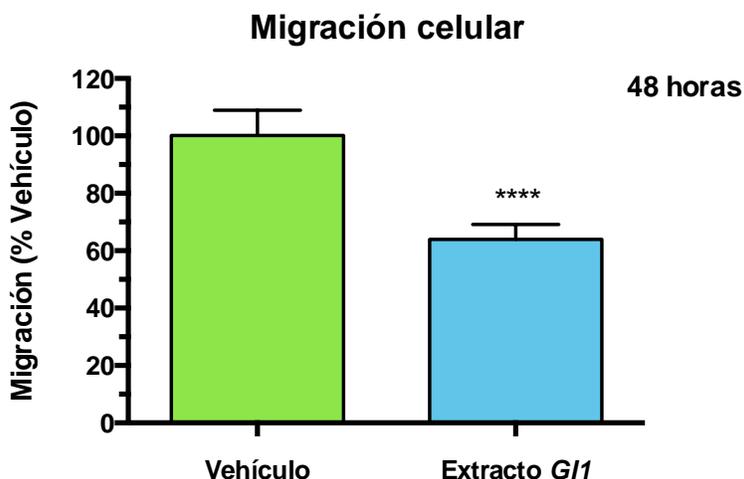


Figura 17. Disminución de la migración celular por el extracto G11 tras 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. En el eje y se muestra el porcentaje de migración en relación al vehículo. En el eje x se muestran los resultados del vehículo (verde) y el extracto G11 (azul). Cada barra representa el promedio de 3 repetidos en 2 réplicas experimentales independientes (n=6). Cada asterisco representa un orden de significancia. Las barras representan la desviación estándar.

EL EXTRACTO *G11* NO IMPACTA EN LA APOPTOSIS CELULAR TRAS 48 H DE TRATAMIENTO

Para determinar si el extracto *G11* tienen un impacto sobre la apoptosis celular de la línea TN MDA-MB-468, las células fueron expuestas por 48 h al extracto o al vehículo, así como a los controles positivo (células apoptóticas) y negativo (células no apoptóticas). La figura 18 muestra que el extracto *G11* no modifica de manera significativa el porcentaje de células apoptóticas con respecto al vehículo, es decir no se detectó ningún cambio importante en la apoptosis celular en este tiempo.

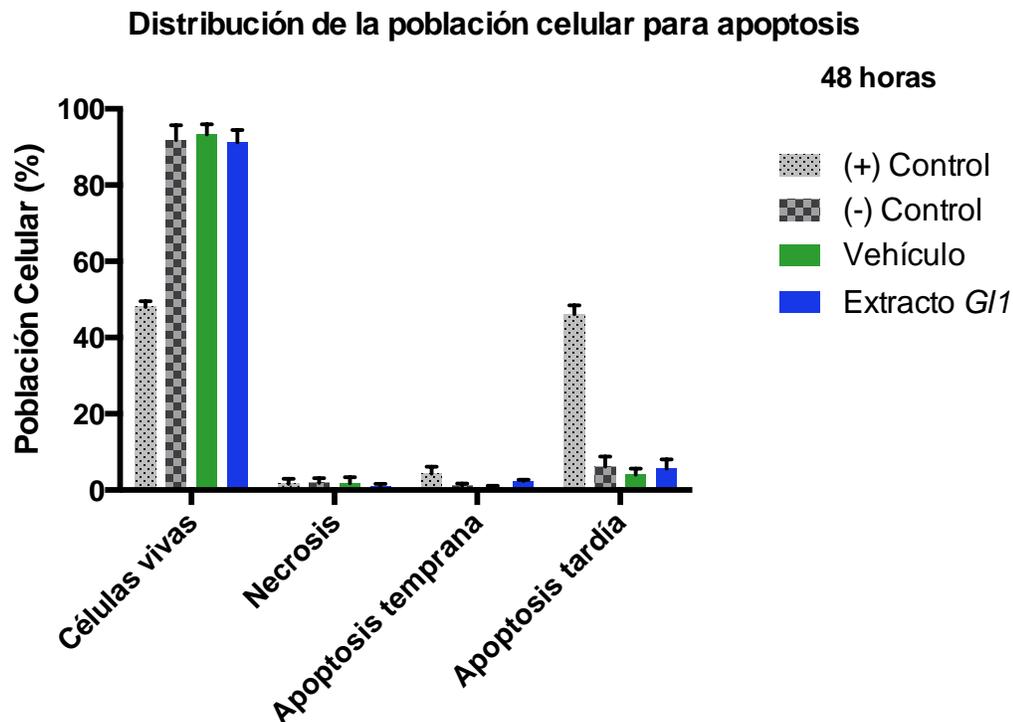


Figura 18. Distribución de la población celular para apoptosis analizada con citómetro de flujo de las células tratadas de CaMa TN MDA-MB-468 tras 48 h de exposición al extracto *G11*. Se muestran los resultados para el extracto *G11* (azul marino), vehículo (verde) así como con los controles positivo (células tratadas con DMSO para favorecer la muerte celular) y negativo (células no tratadas). En el eje x se encuentra la condición de cada célula después del ensayo de apoptosis. En el eje y se muestra el porcentaje de población en cada condición. Cada valor representa el promedio de 2 repetidos en 3 réplicas experimentales independientes (n=6). Las barras representan la desviación estándar. No existen cambios significativos en el número de células apoptóticas entre las células tratadas con el extracto *G11* y el vehículo.

LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE miARNs TAMBIÉN DISTINGUE A LAS CÉLULAS TRATADAS CON EL EXTRACTO *G11* COMO UN GRUPO INDEPENDIENTE AL VEHÍCULO

A través de la expresión diferencial de miARNs detectamos aquellos transcritos que son capaces de agrupar de forma independiente cada condición experimental. Se obtuvieron un total de 28 miARNs diferencialmente expresados de los cuales 5 se encuentran sobreexpresados y 23

subexpresados en comparación al vehículo con un valor de significancia $p < 0.05$ y una tasa de cambio $-2 < 2$. En el mapa de calor (Figura 19) se observa, que al igual que con los ARNm, se distinguen dos grupos principales de miARNs de acuerdo a la expresión diferencial. En un grupo se encuentran las células tratadas con el vehículo y en el otro las células tratadas con el extracto *G11*.

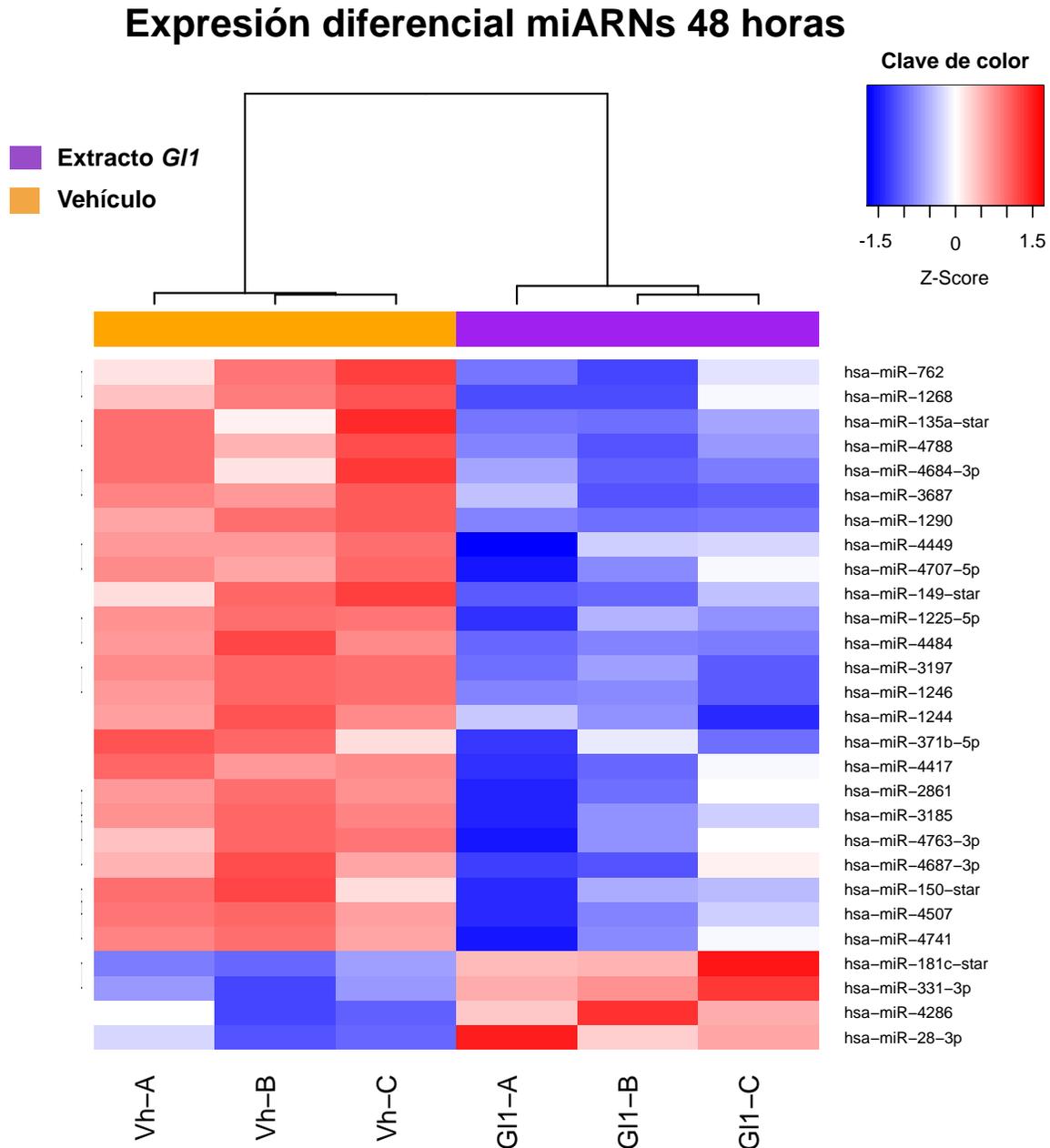


Figura 19. Mapa de calor con valores de expresión normalizados escalados a z-score de los miARNs diferencialmente expresados tras 48 h de tratamiento en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. Se muestra el extracto *G11* (morado) y el vehículo (naranja). Las columnas representan las muestras (células tratadas con el extracto *G11* o vehículo por triplicado), las filas representan los genes. En rojo se muestran los genes sobreexpresados, en verde los subexpresados y en negro aquellos que no presentaron cambio. En la parte superior se representa el dendrograma de

agrupamiento jerárquico de cada una de las muestras. Se muestran los miARNs con una tasa de cambio $-2 < 2$ y un valor $p < 0.05$.

Los 5 miARNs con mayor sobreexpresión son: hsa-miR-1290, hsa-miR-1246, hsa-miR-3197, hsa-miR-4484, hsa-miR-371b-5p. Los 2 miARNs con menor subexpresión son: hsa-miR-4687-3p y hsa-miR-4286. La lista completa de miARNs diferencialmente expresados con sus valores de tasa de cambio y valor p se encuentra en la tabla S4.

POSIBLES ARNm BLANCO PARA LOS miARNs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

Con el fin de definir cómo los miARNs diferencialmente expresados podrían regular los programas de expresión génica observados, se realizó un análisis de predicción *in silico* para definir los posibles blancos transcripcionales de los miARNs y un análisis de correlación de forma integrativa entre la expresión de los miARNs y su posibles blancos. La figura 20 muestra la relación de los miARNs diferencialmente expresados con sus genes blanco que también están diferencialmente expresados. Todos los miARNs mostrados tienen una correlación con su gen blanco mayor al 85%. La lista completa de miARNs con sus genes blanco, valores de correlación y valores q se encuentran en la tabla S5.

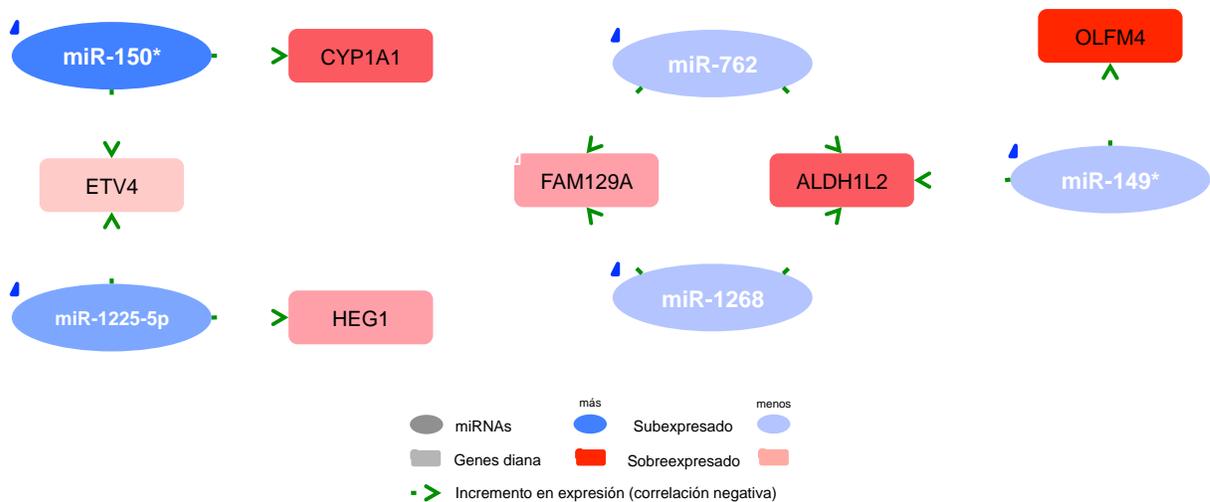


Figura 20. Posibles ARNm blanco para miARNs diferencialmente expresados a 48h con el extracto G11. Los círculos representan los miARNs y los rectángulos sus blancos putativos. El rojo representa sobreexpresión y el azul subexpresión. Las flechas verdes indican una correlación negativa, en este caso incremento de expresión.

DISCUSIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí que se caracterizan por la proliferación descontrolada de células que pueden diseminarse e invadir localmente o a distancia otros tejidos del cuerpo⁷. De particular relevancia es el cáncer de mama (CaMa) que representa la neoplasia más común en mujeres y la segunda más frecuente en población general^{10,17,75}. El cáncer de mama se ha reconocido como una patología heterogénea dentro de la que se encuentra el subtipo triple negativo (TN) que se caracteriza por la ausencia de expresión del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2)^{76,77}. Debido a la falta de expresión de estas moléculas el abordaje terapéutico es limitado pues no existen terapias dirigidas y el único tratamiento sistémico disponible actualmente es la quimioterapia. El CaMa TN es un subtipo agresivo, de mal pronóstico y con tendencia a metástasis temprana²⁶⁻²⁹, debido a ello la búsqueda de nuevos esquemas terapéuticos para este tipo tumoral, ha retomado un creciente interés en la investigación en productos naturales que presenten propiedades terapéuticas como opciones potenciales para la identificación de nuevas moléculas con potencial farmacológico^{48,51,78}. *Ganoderma lucidum* es un hongo comestible que se ha utilizado en Asia durante más de 2000 años para tratar diferentes enfermedades. Estudios recientes han demostrado el potencial antineoplásico de su extracto, sobre todo en células de CaMa. La disminución de características carcinogénicas a través de la modulación de vías alteradas en cáncer, tales como viabilidad, proliferación, migración, adhesión, invasión, ciclo celular y apoptosis han sido algunas de las propiedades que han demostrado tener los extractos de *G. lucidum* en células cancerígenas^{60-63,79,80}. Comprender los mecanismos moleculares por los cuáles este extracto fúngico es capaz de modificar el comportamiento biológico de las células neoplásicas, representa un paso importante en la búsqueda de potenciales efectos terapéuticos útiles.

En el presente trabajo se analizó el perfil de expresión de ARNs mensajeros y microARNs de la línea celular TN de cáncer de mama MDA-MB-468 tratada con el extracto *GI1* del hongo *Ganoderma lucidum* mediante arreglos de expresión. Los resultados *in vitro* de este trabajo mostraron que el extracto fúngico disminuye significativamente la viabilidad, proliferación y migración celular de la línea MDA-MB-468. A través de los datos de expresión de las células expuestas al extracto, se detectaron diversas alteraciones en la tasa de expresión de genes relacionados a rutas celulares asociadas a cáncer que podrían explicar los cambios en el fenotipo observado en los ensayos *in vitro*.

Dentro de los genes diferencialmente expresados en las células expuestas al extracto de *G. lucidum* durante 24 y 48 h destacan *AKR1C1*, *AKR1C2* y *AKR1C3* los cuales se encuentran sobreexpresados y participan activamente en la regulación de la proliferación celular. Estos genes pertenecen a la familia de aldo-ceto reductasas, y codifican enzimas cuya función es catalizar la conversión de aldehídos y acetonas a sus correspondientes alcoholes utilizando NADH y NADPH como cofactores⁸¹. Participan en el metabolismo de la progesterona, la cual juega un papel importante en el desarrollo normal de la glándula mamaria y en la aparición del cáncer. De forma independiente al receptor de progesterona, el cual se encuentra abatido en los tumores de mama triple negativo, el metabolismo de la progesterona puede ser un regulador importante del crecimiento celular. De acuerdo a Lewis et al.⁸², la progesterona es degradada a sus metabolitos 20 α -dihidroprogesterona (20 α -DHP) por *AKR1C1* y a 3 α -hidroxiprogesterona (3 α -HP) por *AKR1C2*. Estos metabolitos promueven la supresión de la proliferación y la adhesión celular. Tanto 20 α -DHP como 3 α -HP se unen a receptores de membrana específicos independientes de receptores hormonales lo que representa un buen modelo de inhibición de proliferación para los subtipos de CaMa negativos a receptor de progesterona. En cáncer de mama la expresión de *AKR1C1/C2* se encuentran disminuida en comparación al tejido normal lo que resulta no sólo en el aumento de 5 α -reductasa (5 α R) y progesterona sino también en la progresión del tumor⁸³. La sobreexpresión de estos genes nos da un posible indicio de los mecanismos a través de los cuales el extracto disminuye la proliferación celular.

La subexpresión de *MACC1*, un regulador clave del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) mejor conocido como MET, puede también contribuir a modular el crecimiento, motilidad e invasión celular, así como la transición epitelio-mesénquima, angiogénesis, y metástasis en diferentes neoplasias⁸⁴. En cáncer de mama, al igual que en cáncer de colon, la sobreexpresión de *MACC1* está asociada a la progresión del tumor y a una menor supervivencia. Yongbo Huang et al.⁸⁵ descubrieron que los niveles de *MACC1* se asocian significativamente a los estadios clínicos de la clasificación TNM (sistema que contempla el tamaño del tumor, extensión de diseminación y presencia de metástasis) y no está asociado a factores como la edad, el estatus de RE, RP o HER2 por lo que puede ser usado como un marcador independiente de progresión y pronóstico en cáncer de mama. Por lo anterior se concluye que la subexpresión del protooncogén MET generada por el tratamiento con *G/1* podría contribuir a inhibir la proliferación, migración, e invasión de las células MDA-MB-468.

La actividad del extracto *G/1* modula a la baja la expresión del gen *SLC6A14*, el cual codifica para un miembro de la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio y

cloro⁸⁶. Este transportador, que se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama, se encarga de transportar 18 de los 20 aminoácidos proteínogénicos y su bloqueo farmacológico origina una falta de aminoácidos necesarios para la traducción^{87,88}. La ausencia de estos bloques necesarios para la síntesis de proteínas conlleva a una disminución en la proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*. Si bien el mayor efecto de su subexpresión se observa en aquellos cánceres de mama que son positivos a receptor de estrógenos, algunos estudios sugieren que este fenómeno también puede darse en subtipos negativos a RE⁸⁹. Lo anteriormente mencionado concuerda con nuestros resultados derivados del análisis de enriquecimiento de conjunto de genes que muestra a vías como inicio de la transcripción o actividad de la ARN polimerasa a la baja.

La actividad del extracto sobre el transcriptoma de la célula neoplásica es amplia, influyendo también en la sobreexpresión de *HMOX1*, que codifica para la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1). La expresión de HO-1 inhibe la formación de especies reactivas de oxígeno, citosinas inflamatorias, estrés oxidativo mediado por irradiación UV y altos niveles de glucosa lo que genera un efecto protector contra inflamación y cáncer entre otros^{90,91}. Lin y colaboradores⁹² demostraron que la inducción de HO-1 suprime la capacidad invasiva del cáncer de mama, la cual es mediada a través del bloqueo de la activación de ERK/AP-1 por CO, un producto de HO-1.

El metabolismo celular por lo general es descrito en términos de las reacciones bioquímicas que comparten una red metabólica. Hoy en día los abordajes genómicos han proporcionado información completa sobre los genes, sus productos y la forma en la cual participan en dicho metabolismo. Más allá de los genes las verdaderas unidades funcionales de los sistemas metabólicos son las interacciones génicas en lo que se denominan vías⁹³. Por esto, es de vital importancia conocer como estas vías son alteradas en presencia del extracto de *G. lucidum*. De las vías alteradas obtenidas con los genes diferencialmente expresados destacan las vías de viabilidad, proliferación, migración e invasión. Algunos de los genes involucrados en estas vías que se encuentran subexpresados por el extracto *G11* y que podrían explicar el establecimiento de programas antitumorales son: *HMOX1*, *VTCN1*, *MYB*, *CD24*, *SOX4*, *CTG4*, *MUC1*, *EGR1* y *EDN1*. Entre estos genes se encuentran algunos factores de transcripción como es el caso de *SOX4* que se sabe induce la transición epitelio-mesénquima lo que potencia la migración e invasión celular a través de la activación de TGF- β y la cooperación con el oncogén RAS contribuyendo a la progresión del cáncer⁹⁴⁻⁹⁷. De esta forma su subexpresión generada por el tratamiento con el extracto *G11* podría estar relacionada con la disminución en la motilidad celular. Por otro lado, *MYB* es un protooncogén que aumenta la invasión y metástasis de CaMa a través de la activación de la vía Wnt/ β -catenina/Axin2, esta vía activa a la ciclina D1 la cual es necesaria para la progresión del

ciclo celular en la fase G1/S. Por lo tanto, la subexpresión de *MYB*, causada por el tratamiento con el extracto fúngico, podría estar reduciendo la cantidad de ciclina D1 necesaria para la síntesis de ADN y la posterior división celular. Estudios realizados por el Dr. Sliva y colaboradores^{61,62} han demostrado que el extracto de *G. lucidum* es capaz de inhibir a nivel proteínico la ciclina D1 y su contraparte *cdk4*, lo que ocasiona una inhibición en la proliferación de las células de CaMa MCF-7 (luminal A) y la MDA-MB-231 (Basal, TN).

MUC1 es otro de los genes diferencialmente subexpresados en la condición expuesta al extracto *G11* que puede estar involucrado en la disminución del fenotipo neoplásico de las células MDA-MB-468. En CaMa *MUC1* interactúa con *EGFR*, *ERBB2* y contribuye a la activación de las vías PI3K/AKT, MAPK, Wnt/ β -catenina las cuales están asociadas a la activación de factores de transcripción como STAT y NF- κ β ^{98,99}. La subexpresión de *MUC1* podría impactar negativamente en el funcionamiento de estas vías disminuyendo las cascadas de señalización necesarias para la activación de la división celular.

La sobrevivencia de un individuo en un estado saludable depende de la estabilidad genómica a nivel celular proporcionada no sólo por la exactitud de los mecanismos de replicación, sino también por la capacidad de reparación frente a diversos tipos de daño que posee la maquinaria celular. La pérdida de la estabilidad genómica debido a daños en el ADN puede conducir a mutaciones, muerte celular o a alguna patología, por lo tanto el mantenimiento de la integridad del ADN es vital para la viabilidad de cualquier tipo celular¹⁰⁰. Las células poseen complejos mecanismos que vigilan la integridad del ADN, activando mecanismos de reparación cuando se detectan errores durante la replicación. La integridad del ADN celular es en parte mantenida por los mecanismos de respuesta a daño a ADN (RDA) que son los encargados de revisar y reparar cualquier anomalía que pueda interrumpir el correcto desarrollo celular¹⁰¹. *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* y *PARP* son algunos de los genes supresores tumorales claves en la reparación y mantenimiento de la integridad del ADN. Desde hace varias décadas y junto con los nuevos conocimientos proporcionados por los estudios genómicos de diversos tumores, se ha reportado que mutaciones en estos genes pueden alterar o inhibir su funcionamiento generando un fenotipo cancerígeno, de esta forma el mal funcionamiento de los mecanismo de RDA contribuyen de forma importante en el establecimiento del tumor. Si bien en una célula normal lo ideal es que los mecanismos de RDA se encuentren funcionando correctamente para prevenir cualquier daño, en el contexto del cáncer, particularmente bajo un abordaje terapéutico, se busca inhibirlos con el fin de que la célula neoplásica pierda viabilidad y muera. Actualmente existen diversos agentes quimioterapéuticos cuya forma de acción es la inhibición de mecanismos de RDA, un ejemplo de esto son los

inhibidores de PARP, los cuales han surgido como una nueva opción de tratamiento para los tumores triple negativo y se encuentran en fases de estudio para su uso clínico.

La enzima (ADP-Ribosa) polimerasa (PARP-1) es una proteína que se encarga de la reparación de roturas en ADN de una hebra y está involucrada en varios procesos celulares como son: diferenciación, proliferación y la transformación del tumor¹⁰². Los inhibidores de PARP son un grupo de fármacos encargados de bloquear la actividad de reparación de esta enzima, al hacerlo la célula es incapaz de mantener la integridad del ADN lo que lleva a la pérdida de viabilidad y a la activación de programas apoptóticos^{103,104}. La actividad de estos fármacos depende de la pérdida de otro tipo de mecanismo de RDA, particularmente, procesos de reparación de rompimientos de doble cadena como son *BRCA1* y *BRCA2*. Este tipo de mecanismos capaces de conducir a la pérdida de viabilidad celular o a la apoptosis son de vital importancia sobre todo en tumores de cáncer de mama triple negativo los cuales, como ya se ha mencionado, representan un reto clínico debido a la falta de blancos específicos para las terapias dirigidas actuales. Por esto es de gran interés descubrir nuevas moléculas que puedan proporcionar nuevas opciones con blancos únicos de acción.

Reforzando estos mecanismos de acción, a través de nuestros análisis de enriquecimientos en la condición tratada con el extracto *G11* del hongo *G. lucidum*, definimos que hay una subrepresentación en vías de reparación de ADN como son: la reparación de ADN de doble cadena, reparación por escisión de bases (REB), reparación por escisión de nucleótidos (REN), respuesta a daño a ADN e integridad de puntos de revisión de ADN. Dentro de la vía de reparación de ADN destaca la pérdida de expresión de genes como *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PARP1* y una gran variedad de polimerasas de ADN como *POLA1*, *POLH*, *POLD1*, *POLI*, *POLE*, *POLE2*, *POLG*. *BRCA1* y *BRCA2* son dos genes supresores de tumores encargados de regular la proliferación, ciclo celular, reparación y mantenimiento de la integridad del ADN. Se sabe que mutaciones en *BRCA1* aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama en el contexto de un síndrome hereditario. Sin embargo, en un escenario donde ya está establecido el cáncer, las células neoplásicas que presentan *BRCA1* o *BRCA2* funcional, mantienen un sistema de reparación homólogo a PARP, lo que les permite sobrevivir reparando los daños generados por alteraciones propias del tumor y bajo la actividad de fármacos como los inhibidores de PARP, resistir a la terapia y escapar de la muerte celular. La línea celular MDA-MB-468 con la que se probó el extracto *G11* en este proyecto, presenta *BRCA1* y *BRCA2* funcional (silvestre), por lo tanto el hecho de que el extracto de *G. lucidum* sea capaz de disminuir los niveles de dichos genes sugiere que el extracto podría actuar como un posible tratamiento coadyuvante a la quimioterapia en aquellos

casos donde los inhibidores de PARP no estén indicados debido a que no hay mutaciones que inhiban la función en *BRCA1/2*.

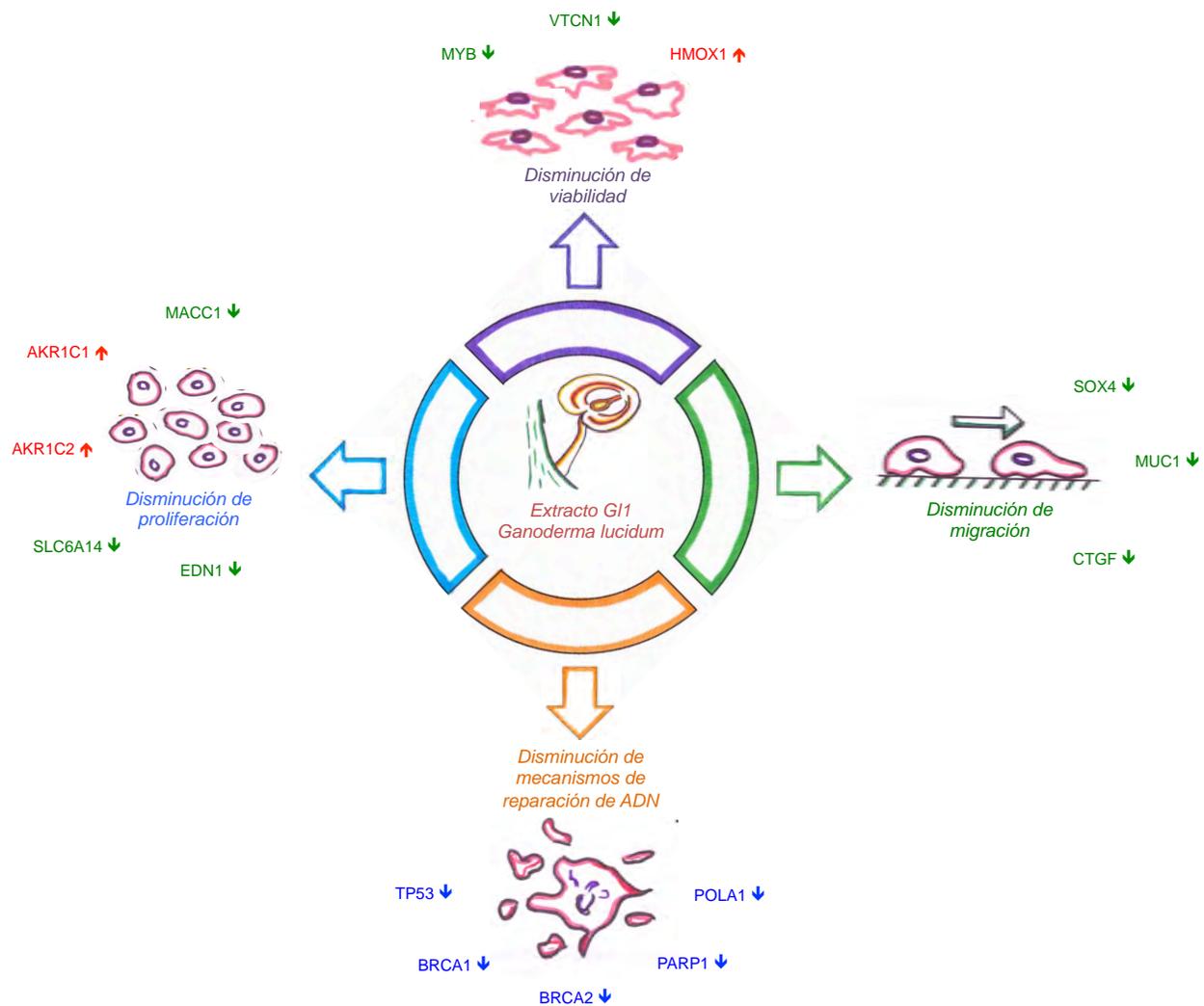


Figura 21. Esquema donde se resumen las vías y genes más importantes modulados por el extracto G11 en la línea de CaMa TN MDA-MB-468. Se muestran 4 de las vías cuya actividad, se ve disminuida por el extracto G11: proliferación, viabilidad, migración y mecanismos de reparación de ADN. En rojo se muestran aquellos genes sobreexpresados por el extracto que participan en la disminución de la actividad de la vía y en verde aquellos genes subexpresados que participan en la misma función.

Los microARNs (miARNs) son otros transcritos, cuya importancia radica en el hecho de que actúan como reguladores post-transcripcionales, de esta forma su regulación permite acceder a otro nivel de control celular de la expresión génica. Los miARNs son pequeños ARNs no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional y que están estrechamente involucrados en el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer⁴⁰. Nuestros resultados mostraron una clara distinción entre el perfil de expresión de los miARNs de las células

tratadas con el extracto *G/1* en comparación a las tratadas con el vehículo, de esta forma concluimos que el extracto *G/1* también modifica la expresión de miARNs.

Entre los miARNs subexpresados se encuentra miR-150*, el cual ha sido descrito en la literatura como un promotor del establecimiento de cáncer de mama y cervical^{105,106}. Dentro de los potenciales genes blanco del miR-150* que también presentaron una expresión significativa al alza con el extracto de *G. lucidum* se encuentran *CYP1A1* y *ETV4*, de este modo proponemos un circuito de regulación a través del miARN de estos genes establecido por el extracto. El gen *CYP1A1* codifica para un miembro de la familia de citocromos P450 que participa en la degradación de xenobióticos y de algunos sustratos endógenos¹⁰⁷. En cáncer de mama *CYP1A1* tiene una función polémica; sin embargo existe evidencia que señala que algunos fitoquímicos pertenecientes a los flavonoides, encontrados en diversas clases de productos naturales, son sustratos para la enzima *CYP1A1*¹⁰⁷. Estudios realizados tras la activación de *CYP1A1* en líneas de cáncer de mama, han demostrado que esta enzima tiene la capacidad de metabolizar los flavonoides y convertirlos en especies reactivas capaces de dañar la integridad del ADN a través de la formación de aductos y del rompimiento de la doble cadena¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Varios estudios han caracterizado a los flavonoides dentro de las biomoléculas contenidas en los extractos de *G. lucidum*^{111,112}. Esto representa otro mecanismo que respalda que el extracto de *G. lucidum* disminuye los mecanismos de reparación de daño a ADN y por lo tanto disminuye la viabilidad de las células tratadas.

CONCLUSIONES

Con el avance de la tecnología en el área genómica y bioinformática se han podido analizar de manera más exhaustiva los cambios a nivel génico que sufren las células tumorales. Utilizar esta tecnología para comprender los mecanismos mediante los cuales extractos naturales como el de *Ganoderma lucidum*, disminuyen el fenotipo neoplásico, ayudará en el entendimiento general de la carcinogénesis así como en el descubrimiento de posibles coadyuvantes para la enfermedad. Es importante remarcar, que este estudio se llevó a cabo con el extracto de una cepa nativa mexicana de *Ganoderma lucidum*, lo cual pone de manifiesto la importancia de la investigación de los recursos naturales de nuestro país.

Este trabajo permitió conocer el perfil de expresión de ARN y miARN de las células TN de CaMa MDA-MB-468 tratadas con el extracto de *G. lucidum*, así como su impacto en vías clave que se encuentran alteradas en una condición neoplásica. Los resultados de expresión distinguen claramente a las muestras tratadas con el extracto fúngico en un grupo diferente al de las muestras tratadas con el vehículo. Dicha diferencia en el perfil de expresión puede ser la responsable del cambio fenotípico que se observó en los ensayos *in vitro* como son la disminución de la viabilidad, proliferación y migración celular. También se demuestra que existe una alteración en miARNs que están estrechamente relacionados a la alteración de sus genes blanco. Lo cual pone de manifiesto que los biocompuestos de *G. lucidum* actúan a diferentes niveles del procesamiento del ADN.

Con este análisis también se encontraron otras posibles rutas por las cuales *G. lucidum* disminuye el fenotipo neoplásico y que no se encuentran reportadas previamente en la literatura como son la reparación a daño de ADN, la replicación de ADN, procesos de ciclo celular, transcripción y procesos post-transcripcionales los cuales se encuentran inhibidos con el extracto en comparación al vehículo. Con la disminución de los mecanismos de reparación de daño a ADN en las células tratadas con el extracto *G/1*, se abre una nueva brecha de posibilidades terapéuticas, sobre todo para las pacientes de cáncer de mama triple negativo que no son susceptibles al tratamiento con fármacos como los inhibidores de PARP y revela el potencial del extracto fúngico como un sensibilizador ante este tipo de fármacos.

PERSPECTIVAS

Con los resultados generados en este trabajo, surgen nuevas preguntas y abordajes en el estudio de las propiedades antineoplásicas del extracto de *Ganoderma lucidum*. Es por ello que como perspectivas se propone:

Realizar un ensayo de TUNEL para evaluar el daño a ADN, de modo que se puedan confirmar los datos obtenidos *in silico*. Con este experimento se espera observar que, tras un estímulo de daño externo, las células tratadas con el extracto fúngico presenten un mayor daño a ADN en comparación a las células tratadas con el vehículo.

Realizar un ensayo donde se compare la sensibilidad de la línea TN MDA-MB-468 a inhibidores de PARP entre células tratadas y no tratadas con el extracto, esto con el fin de responder la pregunta de si realmente el extracto fúngico actúa como un posible sensibilizador ante este tipo de fármacos.

Realizar ensayos *in vitro* de viabilidad, proliferación, migración apoptosis y TUNEL en líneas TN de cáncer de mama de otros subtipos que presenten mutación intrínseca a BRCA para comparar la efectividad del extracto.

Mostrar el efecto del extracto *G/1* en líneas celulares derivadas de otros subtipos de cáncer de mama.

Finalmente realizar ensayos *in vitro* de viabilidad y proliferación celular en una línea de tejido normal de mama, con el fin de determinar si el efecto del extracto es selectivo para células cancerígenas.

Como parte de este proyecto se está realizando un artículo en colaboración con el Dr. Daniel Martínez Carrera del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla.

LITERATURA CITADA

1. EBO (Encyclopedia Britannica Online). Mammary gland. *School and Library Subscribers* (2014). Available at: <http://www.britannica.com/science/mammary-gland>. (Accessed: 20th June 2002)
2. César, T. S. in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (ed. Intergovernmental Panel on Climate Change) **1**, 1–30 (Cambridge University Press, 2015).
3. ACS (American Cancer Society). What is breast cancer? (2014). Available at: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>. (Accessed: 1st January 2015)
4. CCS (Canadian Cancer Society). Anatomy and physiology of the breast. (2016). Available at: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/anatomy-and-physiology/?region=on>. (Accessed: 1st January 2016)
5. Macias, H. & Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 533–557 (2013).
6. Masterson, K. Building human breast tissue, cell by cell. *Medical Press* (2015). Available at: <http://medicalxpress.com/news/2015-09-human-breast-tissue-cell.html>. (Accessed: 1st September 2016)
7. NCI (National Cancer Institute). What is cancer? *Cancer.gov* (2015). Available at: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>. (Accessed: 6th November 2015)
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
9. WHO (World Health Organization). Cancer. *Media Center* (2015). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
10. JHM (Johns Hopkins). General information about breast cancer. (2016). Available at: http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/conditions/breast_health/general_information_about_breast_cancer_85,P00142/. (Accessed: 20th June 2001)
11. BCO (Breast Cancer Organization). What is breast cancer? *Breastcancer.org* (2015). Available at: http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc.
12. ACS (American Cancer Society). What is cancer? *Cancer Basics* (2015). Available at: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>. (Accessed: 11th February 2015)
13. WHO (World Health Organization). *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. (2012).
14. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–23 (2003).
15. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–74 (2001).
16. RnCeus. Histology of DCIS. (2013). Available at: <http://www.rnceus.com/dcis/sub.html>. (Accessed: 1st June 2016)
17. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el cáncer. **14** (2015).
18. BCO (Breast Cancer Organization). Breast Cancer Risk Factors. *Breastcancer.org* (2016). Available at: http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/risk/factors. (Accessed: 20th June 2002)
19. CRUK (Cancer Research UK). Breast cancer risk factors. *cancerresearchuk.org* (2015). Available at: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/risk-factors>. (Accessed: 1st February 2016)
20. ACS (American Cancer Society). What are the risk factors for breast cancer? *Cancer.gov* (2014). Available at: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>. (Accessed: 1st February 2016)
21. Sharma, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **30**, 1 (2009).
22. Diamandis, P. Eleftherios Frischie, A. H. in *Tumor Markers: Physiology, Pathology, Technology and Clinical Applications* (2002).
23. NCI (National Cancer Institute). Diccionario de Cáncer: Marcador Tumoral. (2016). Available at: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=46636>. (Accessed: 20th June 2003)
24. ACS (American Cancer Society). How is breast cancer classified? *Cancer.gov* (2015). Available at: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-classifying>.
25. BCO (Breast Cancer Organization). Tamoxifeno. *Breastcancer.org* (2014). Available at: <http://www.breastcancer.org/es/tratamiento/hormonoterapia/msre/tamoxifeno>.

26. ACS (American Cancer Society). Terapia dirigida para el cáncer de seno. *Cancer.gov* (2014). Available at: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-terapia-dirigida>. (Accessed: 20th June 2003)
27. Dent, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4429–4434 (2007).
28. Palma, G. *et al.* Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget* **6**, 26560–26574 (2015).
29. Rakha, E. a. *et al.* Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* **109**, 25–32 (2007).
30. Hudis, C. A. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* **16 Suppl 1**, 1–11 (2011).
31. Hugh, J. *et al.* Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1168–76 (2009).
32. Turner, N., Biganzoli, L. & Di Leo, A. Continued value of adjuvant anthracyclines as treatment for early breast cancer. *Lancet. Oncol.* **16**, e362-9 (2015).
33. Livraghi, L. & Garber, J. E. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Med.* **13**, 188 (2015).
34. Arteaga, C. L. Progress in Breast Cancer: Overview. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6353–6359 (2013).
35. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
36. Glueck, Monterro, A. & Kittane, M. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark. Cancer* **61** (2013). doi:10.4137/BIC.S9455
37. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
38. Li, Y., Kong, D., Wang, Z. & Sarkar, F. H. Regulation of microRNAs by natural agents: An emerging field in chemoprevention and chemotherapy research. *Pharm Res* **27**, 1027–1041 (2010).
39. Hidalgo-Miranda, A. & Jiménez-Sánchez, G. Genomic basis for breast cancer: advances in personalized medicine. *Salud Publica Mex.* **51 Suppl 2**, s197–s207 (2009).
40. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347–355 (2012).
41. MiRBase. Browse miRBase by species. Available at: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>. (Accessed: 1st January 2016)
42. Griffiths-Jones, S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* **32**, 109D–111 (2004).
43. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–9 (2002).
44. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **1**, 15004 (2016).
45. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
46. Rosenfeld, N. *et al.* MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol.* **26**, 462–469 (2008).
47. Solecki RS. A Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science (80-)*. **190**, 880–881 (1975).
48. Monks, N. R. *et al.* Natural Products Genomics: A novel approach for the discovery of anti-cancer therapeutics. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **64**, 217–225 (2011).
49. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311–335 (2012).
50. Basmadjian, C. *et al.* Cancer wars: natural products strike back. *Front. Chem.* **2**, 20 (2014).
51. Dančik, V., Seiler, K. P., Young, D. W., Schreiber, S. L. & Clemons, P. A. Distinct Biological Network Properties between the Targets of Natural Products and Disease Genes. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9259–9261 (2010).
52. Sun, M. *et al.* Curcumin (diferuloylmethane) alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 464–473 (2008).
53. Li, Y. *et al.* Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **69**, 6704–6712 (2009).
54. Melkamu, T., Zhang, X., Tan, J., Zeng, Y. & Kassie, F. Alteration of microRNA expression in vinyl carbamate-induced mouse lung tumors and modulation by the chemopreventive agent indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* **31**, 252–258 (2010).
55. Davis, C. D. & Ross, S. A. Evidence for dietary regulation of microRNA expression in cancer cells. *Nutr. Rev.* **66**, 477–82 (2008).
56. Stamets, P. *Growing gourmet and medical mushrooms*. Ten Speed Press (1993).
57. Popović, V., Živković, J., Davidović, S., Stevanović, M. & Stojković, D. Mycotherapy of cancer: an

- update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action. *Curr. Top. Med. Chem.* **13**, 2791–806 (2013).
58. Hobbs, C. *Medicinal Mushrooms for cellular defense, immunity and longevity*. (1998).
 59. MegaSalud. *Ganoderma lucidum*. (2016).
 60. Sliva, D. *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. *Integr. Cancer Ther.* **2**, 358–64 (2003).
 61. Slivova, V., Valachovicova, T., Jiang, J. & Sliva, D. *Ganoderma lucidum* inhibits invasiveness of breast cancer cell. *J. Cancer Integr. Med.* **2**, 8 (2004).
 62. Jiang, J., Slivova, V., Harvey, K., Valachovicova, T. & Sliva, D. *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-kappaB signaling. *Nutr. Cancer* **49**, 209–216 (2004).
 63. Suarez-Arroyo, I. J. *et al.* Anti-Tumor Effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in Inflammatory Breast Cancer in In Vivo and In Vitro Models. *PLoS One* **8**, (2013).
 64. Gonul, O. *et al.* Effects of *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) Extracts on the miRNA Profile and Telomerase Activity of the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Int. J. Med. Mushrooms* **17**, 231–9 (2015).
 65. Hidaka, H. *et al.* Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma. *Oncotarget* **3**, 44–57 (2012).
 66. Meneses, M. E. *et al.* Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice. *PLoS One* **11**, e0159631 (2016).
 67. GraphPad Software. Prueba T paramétrica, no pareada, asumiendo desviación estándar diferente para cada muestra. (2015).
 68. Thermo Fisher Scientific Inc. Affymetrix Expression Console. (2016).
 69. Affymetrix. Transcriptome Analysis Console (TAC) Software. (2016).
 70. Hulsen, T. BioVenn. (2016).
 71. Team, R. D. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2008). doi:3-900051-07-0
 72. Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. & Segal, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* **39**, 1278–1284 (2007).
 73. Enright, A. J. *et al.* MicroRNA targets in *Drosophila*. (2003).
 74. Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. & Segal, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* **39**, 1278–1284 (2007).
 75. GLOBOCAN/World Health Organization. Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *Cancer Fact Sheets* (2012). Available at: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>. (Accessed: 8th February 2015)
 76. Bentzon, N., Düring, M., Rasmussen, B. B., Mouridsen, H. & Kroman, N. Prognostic effect of estrogen receptor status across age in primary breast cancer. *Int. J. cancer* **122**, 1089–94 (2008).
 77. Dunnwald, L. K., Rossing, M. A. & Li, C. I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **9**, R6 (2007).
 78. Fouladbakhsh, J. M., Balneaves, L. & Jenuwine, E. Understanding CAM Natural Health Products: Implications of Use Among Cancer Patients and Survivors. *J. Adv. Pract. Oncol.* **4**, 289–306 (2013).
 79. Hu, H., Ahn, N.-S., Yang, X., Lee, Y.-S. & Kang, K.-S. *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int. J. Cancer* **102**, 250–253 (2002).
 80. Jiang, J., Slivova, V. & Sliva, D. *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Int. J. Oncol.* **29**, 695–703 (2006).
 81. NCBI (National Center for Biotechnology Information). *AKR1C1 aldo-keto reductase family 1 member C1 [Homo sapiens (human)]*. (2016).
 82. Lewis, M. J., Wiebe, J. P. & Heathcote, J. G. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. **12**, 1–12 (2004).
 83. Ji, Q. *et al.* Selective Loss of AKR1C1 and AKR1C2 in Breast Cancer and Their Potential Effect on Progesterone Signaling. 7610–7617 (2004).
 84. NCBI (National Center for Biotechnology Information). *MACC1 MACC1, MET transcriptional regulator [Homo sapiens (human)]*. (2016).
 85. Huang, Y. *et al.* Overexpression of MACC1 and Its significance in human Breast Cancer Progression. *Cell Biosci.* 1–12 (2013).
 86. NCBI (National Center for Biotechnology Information). *SLC6A14 solute carrier family 6 member 14 [Homo sapiens (human)]*. (2016).
 87. Babu, E. *et al.* Deletion of the amino acid transporter Slc6a14 suppresses tumour growth in spontaneous mouse models of breast cancer. *Biochem. J.* **469**, 17–23 (2015).

88. Karunakaran, S. *et al.* SLC6A14 (ATB0,+) Protein, a Highly Concentrative and Broad Specific Amino Acid Transporter, Is a Novel and Effective Drug Target for Treatment of Estrogen Receptor-positive Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* **286**, 31830–31838 (2011).
89. Bhutia, Y. D., Babu, E., Prasad, P. D. & Ganapathy, V. The amino acid transporter SLC6A14 in cancer and its potential use in chemotherapy. *Asian J. Pharm. Sci.* **9**, 293–303 (2014).
90. Castilho, Á. F. *et al.* Heme Oxygenase-1 Protects Retinal Endothelial Cells against High Glucose- and Oxidative/Nitrosative Stress-Induced Toxicity. *PLoS One* **7**, e42428 (2012).
91. Loboda, A. *et al.* Heme Oxygenase-1 and the Vascular Bed: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1767–1812 (2008).
92. Lin, C.-W., Shen, S.-C., Hou, W.-C., Yang, L.-Y. & Chen, Y.-C. Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1195–206 (2008).
93. Schilling, C. H., Letscher, D. & Palsson, B. O. Theory for the Systemic Definition of Metabolic Pathways and their use in Interpreting Metabolic Function from a Pathway-Oriented Perspective. *J. Theor. Biol.* **203**, 229–248 (2000).
94. NCBI (National Center for Biotechnology Information). *SOX4 SRY-box 4 [Homo sapiens (human)]*. (2016).
95. Parvani, J. G. & Schiemann, W. P. Sox4, EMT programs, and the metastatic progression of breast cancers: mastering the masters of EMT. *Breast Cancer Res.* **15**, R72 (2013).
96. Zhang, J. *et al.* SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.* **72**, 4597–608 (2012).
97. Shi, S. *et al.* Upregulated Expression of SOX4 Is Associated with Tumor Growth and Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma. *Dis. Markers* **2015**, 1–11 (2015).
98. Kufe, D. W. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* **32**, 1073–81 (2013).
99. Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A. & McKenzie, I. F. MUC1 and breast cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1**, 98–103 (1999).
100. Bruce, A., Julian, L., Dennis, B. & Keith, R. *Molecular Biology of the Cell.* (1994).
101. Marteijn, J. a, Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 465–481 (2014).
102. NCBI (National Center for Biotechnology Information). *PARP1 poly(ADP-ribose) polymerase 1 [Homo sapiens (human)]*. (2016).
103. Hassa, P. O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. & Hottiger, M. O. The Enzymatic and DNA Binding Activity of PARP-1 Are Not Required for NF- B Coactivator Function. *J. Biol. Chem.* **276**, 45588–45597 (2001).
104. Rabenau, K. & Hofstatter, E. DNA Damage Repair and the Emerging Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibition in Cancer Therapeutics. *Clin. Ther.* **38**, 1577–1588 (2016).
105. Huang, S. *et al.* miR-150 Promotes Human Breast Cancer Growth and Malignant Behavior by Targeting the Pro-Apoptotic Purinergic P2X7 Receptor. *PLoS One* **8**, e80707 (2013).
106. Li, J. *et al.* microRNA-150 promotes cervical cancer cell growth and survival by targeting FOXO4. *BMC Mol. Biol.* **16**, 24 (2015).
107. Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M. & Spandidos, D. A. Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* **9**, 187 (2009).
108. Chua, M. S. *et al.* Role of Cyp1A1 in modulation of antitumor properties of the novel agent 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203, NSC 674495) in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 5196–203 (2000).
109. Brantley, E. *et al.* Fluorinated 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazoles induce CYP1A1 expression, become metabolized, and bind to macromolecules in sensitive human cancer cells. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1392–401 (2004).
110. Meng, L. *et al.* Activation of aminoflavone (NSC 686288) by a sulfotransferase is required for the antiproliferative effect of the drug and for induction of histone gamma-H2AX. *Cancer Res.* **66**, 9656–64 (2006).
111. Cilerdžić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Stanojković, T. & Glamočlija, J. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *J. Ethnopharmacol.* **155**, 312–9 (2014).
112. Fakoya, S., Adegbehingbe, K. T. & Ogundiimu, A. A. Biopharmaceutical Assessment of Active Components of *Deadaleopsis confragosa* and *Ganoderma lucidum*. *Open J. Med. Microbiol.* **3**, 135–138 (2013).

ANEXOS

ANEXO A – FIGURAS SUPLEMENTARIAS

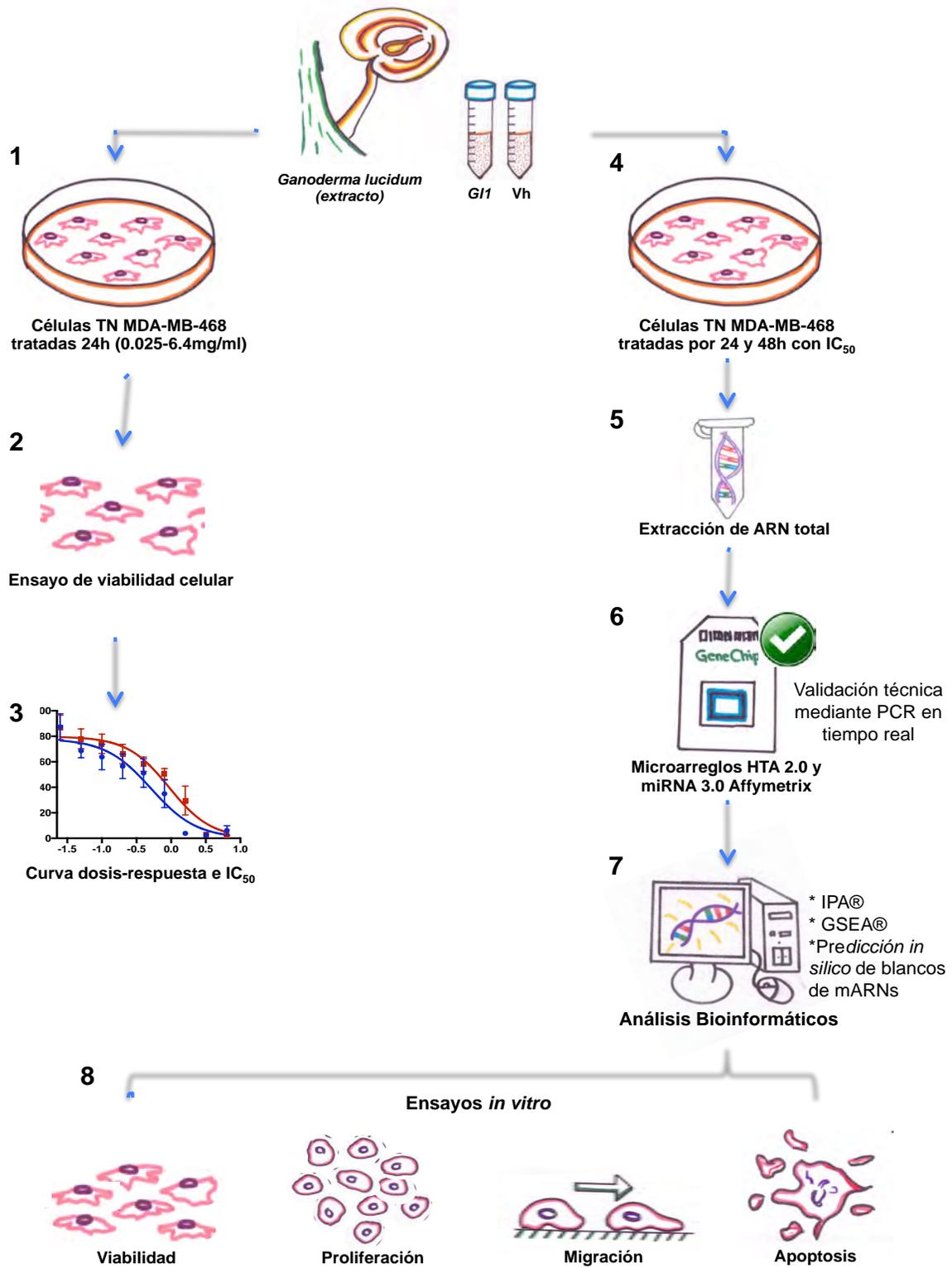


Figura S1. Metodología experimental. Se muestra un diagrama de la metodología seguida para realizar el proyecto.

Volcano Plot HTA 2.0 Vehículo vs. Control 24 horas

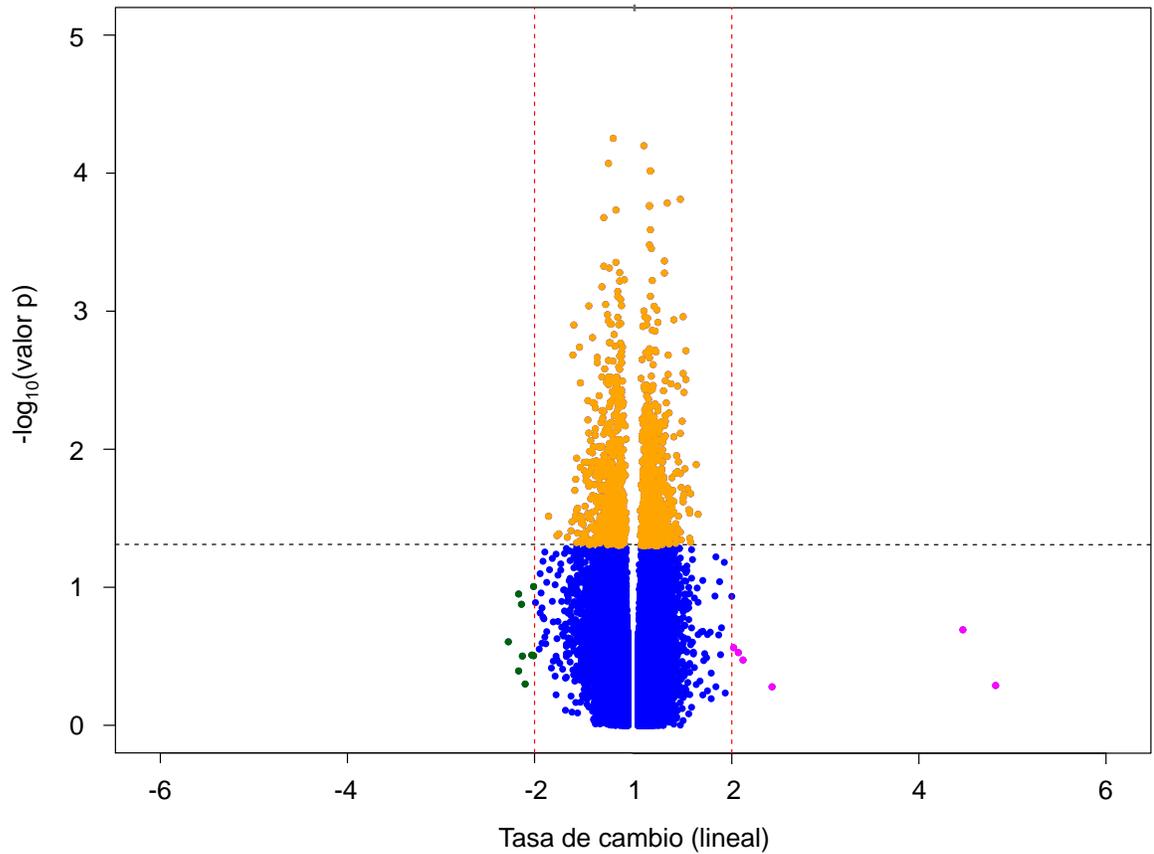


Figura S2. Volcano plot vehículo vs. control (células no tratadas) tras 24 h de tratamiento. Las líneas verdes delimitan la tasa de cambio $-2 < 2$, la línea rosa delimita el valor $p < 0.05$. No existen diferencias significativas entre los genes de las células tratadas con el vehículo y las células no tratadas (control). No existen genes diferencialmente expresados que sean significativos entre el vehículo y el control.

Volcano Plot HTA 2.0 Vehículo vs. Control 48 horas

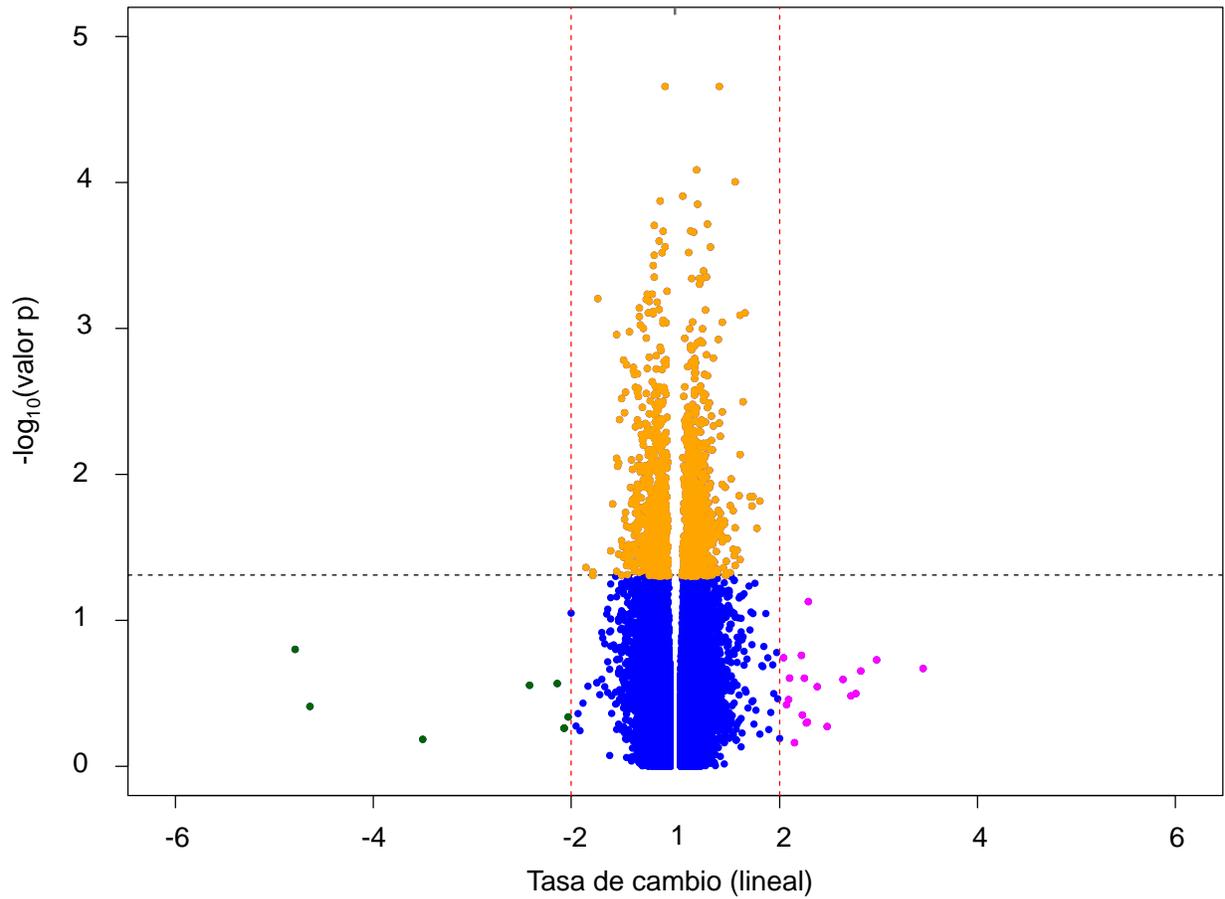


Figura S3. Volcano plot vehículo vs. control (células no tratadas) tras 48 h de tratamiento. Las líneas verdes delimitan la tasa de cambio $-2 < 2$, la línea rosa delimita el valor $p < 0.05$. No existen diferencias significativas entre los genes de las células tratadas con el vehículo y las células no tratadas (control). No existen genes diferencialmente expresados que sean significativos entre el vehículo y el control.

ANEXO B – TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Información de la regresión no lineal para la curva dosis-respuesta tras 24 h de tratamiento con el extracto *G11*.

	Concepto	Valor
Valores de ajuste	IC ₅₀	0.3429
	Log(IC ₅₀)	-0.4648
	Pendiente	-1.011
Error estándar	Log(IC ₅₀)	0.0221
	Pendiente	0.0482
Intervalos de confianza 95%	IC ₅₀	0.3103 - 0.3789
	Log(IC ₅₀)	-0.5083 – 0.4214
	Pendiente	-1.106 – 0.9168
Ajuste	R ²	0.9213
	Grados de libertad	133

Tabla S2. Lista de genes diferencialmente expresados con el extracto *G11* en comparación al vehículo tras 24 h de tratamiento. La tabla esta ordenada descendientemente tasa de cambio y contiene un total de 40 genes, se muestran los valores de tasa de cambio y valor p para cada gen.

Nombre del gen	Descripción	Tasa de cambio (lineal)	Valor p
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	5.21	0.001876
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	4.26	0.001303
SLC7A11	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	3.5	0.004241
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2	2.77	0.001042
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	2.66	0.000316
RNU6-408P	RNA, U6 small nuclear 408, pseudogene	2.61	0.029675
KRT34	keratin 34; keratin, type I cuticular Ha4-like	2.6	0.007552
CLMP	CXADR-like membrane protein	2.38	0.001403
FOSL1	FOS-like antigen 1	2.22	0.010988
CTH	cystathionine gamma-lyase; cystathionase	2.2	0.014423
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	2.15	0.001763
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	2.14	0.004237
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	2.01	0.004718
ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	-2.01	0.000215
KIAA1161	KIAA1161	-2.01	0.007115
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase	-2.02	0.013397

DZIP3	DAZ interacting zinc finger protein 3; DAZ interacting protein 3, zinc finger	-2.03	0.000187
ACKR2	atypical chemokine receptor 2	-2.05	0.02737
HMG2P25	high mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 25	-2.05	0.003238
HRASLS2	HRAS-like suppressor 2	-2.06	0.000179
CYP4Z1	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1	-2.07	0.001011
RNU1-12P	RNA, U1 small nuclear 12, pseudogene	-2.08	0.00276
RNU1-13P	RNA, U1 small nuclear 13, pseudogene	-2.08	0.00276
MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog	-2.09	0.042773
ERP27	endoplasmic reticulum protein 27	-2.14	0.000156
TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	-2.16	0.004323
TLR3	toll-like receptor 3	-2.18	0.002947
FMO6P	flavin containing monooxygenase 6 pseudogene	-2.21	0.000306
SYTL2	synaptotagmin-like 2	-2.21	0.009125
SEPW1	selenoprotein W, 1	-2.26	0.001858
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	-2.26	0.018776
FGG	fibrinogen gamma chain	-2.27	0.007075
MBNL3	muscleblind-like splicing regulator 3	-2.27	0.01048
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	-2.28	0.000896
CLDN8	claudin 8	-2.3	0.017661
MACC1	metastasis associated in colon cancer 1	-2.3	0.046643
CD24	CD24 molecule	-2.33	0.002454
CLDN1	claudin 1	-2.48	0.000015
HMG2P18	high mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 18	-2.51	0.009351
S100A7A	S100 calcium binding protein A7A	-2.53	0.000095
LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	-2.56	0.017989
VTCN1	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	-2.82	0.003039
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	-2.85	0.000251
GLYATL2	glycine-N-acyltransferase-like 2	-2.96	0.000043
CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	-3.11	0.000002
SLC6A14	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14	-3.27	0.000789
CPHL1P	ceruloplasmin and hephaestin-like 1 pseudogene	-3.55	0.012999

Tabla S3. Lista de genes diferencialmente expresados con el extracto G11 en comparación al vehículo tras 48 h de tratamiento. La tabla esta ordenada descendientemente tasa de cambio y contiene un total de 89 genes, se muestran los valores de tasa de cambio y valor p para cada gen.

Nombre del gen	Descripción	Tasa de cambio (lineal)	Valor P
FYB	FYN binding protein; FYN binding protein (FYB-120/130)	4.16	0.000091
OLFM4	olfactomedin 4	3.87	0.014244
LINC00973	long intergenic non-protein coding RNA 973; novel transcript	3.61	0.003535

LINC00431	long intergenic non-protein coding RNA 431; putative novel transcript	3.51	0.000296
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2	3.25	0.000635
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	3.17	0.002498
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	3.16	0.018866
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	2.82	0.00035
PSG1	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1	2.82	0.01107
SYTL4	synaptotagmin-like 4	2.78	0.001003
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	2.76	0.002508
BVES	blood vessel epicardial substance	2.6	0.001092
CTNNAL1	catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	2.6	0.002134
EML5	echinoderm microtubule associated protein like 5	2.59	0.000058
CTH	cystathionine gamma-lyase; cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	2.57	0.002904
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3	2.55	0.000234
PSG9	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 9	2.53	0.005751
CLIP4	CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4	2.48	0.00035
FAM20C	family with sequence similarity 20, member C	2.44	0.000544
HIF1A-AS2	HIF1A antisense RNA 2	2.39	0.017717
PSG6	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6	2.34	0.004858
KRT34	keratin 34; keratin, type I cuticular Ha4-like	2.33	0.013505
CD22	CD22 molecule	2.28	0.000352
ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	2.27	0.003774
POPDC3	popeye domain containing 3	2.25	0.000126
OLFML3	olfactomedin-like 3	2.22	0.000273
SYT14	synaptotagmin XIV	2.22	0.00324
SIRPG	signal-regulatory protein gamma	2.21	0.00239
SLC2A12	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12	2.19	0.013697
FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	2.18	0.000565
PDE1C	phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	2.17	0.000098
CDA	cytidine deaminase	2.11	0.036432
HEG1	heart development protein with EGF-like domains 1; HEG homolog 1 (zebrafish)	2.07	0.0007
STC2	stanniocalcin 2	2.05	0.001058
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	2.05	0.000346
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	2.04	4.56E-07
SFTA1P	surfactant associated 1, pseudogene; novel transcript	2.04	0.014246
CALB2	calbindin 2	2.03	0.014731
ETV4	ets variant 4	2.01	0.022529
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	2.01	0.014891
HOTAIRM1	HOXA transcript antisense RNA, myeloid-specific 1	2.01	0.017329
STC1	stanniocalcin 1	-2.03	0.003436
GRAMD2	GRAM domain containing 2	-2.04	0.007827
MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog	-2.04	0.022664
HIST2H4B	histone cluster 2, H4b	-2.05	0.023341

FOXI1	forkhead box I1	-2.06	0.004606
C3	complement component 3	-2.08	0.003568
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)	-2.08	0.000014
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-2.08	0.007602
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	-2.09	0.010823
RNA5SP46 5	RNA, 5S ribosomal pseudogene 465	-2.09	0.004853
HELLS	helicase, lymphoid-specific	-2.1	0.013073
CCDC97	coiled-coil domain containing 97	-2.11	0.03418
VTCN1	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	-2.11	0.010562
CFB	complement factor B	-2.13	0.004453
LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	-2.13	0.029297
SLC12A2	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter), member 2	-2.17	0.000406
NCCRP1	non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 homolog (zebrafish)	-2.21	0.000018
ERP27	endoplasmic reticulum protein 27	-2.24	0.001984
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	-2.25	0.005916
DZIP3	DAZ interacting zinc finger protein 3; DAZ interacting protein 3, zinc finger	-2.27	0.00099
FGB	fibrinogen beta chain	-2.28	0.001891
TMPRSS4	transmembrane protease, serine 4	-2.3	0.003114
KIAA1161	KIAA1161	-2.32	0.00972
MMAA	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblA type	-2.33	0.02635
EDN1	endothelin 1	-2.41	0.005162
MBNL3	muscleblind-like splicing regulator 3	-2.41	0.00534
S100A9	S100 calcium binding protein A9	-2.42	0.003205
HIST1H4H	histone cluster 1, H4h	-2.44	0.005265
KRT4	keratin 4	-2.46	0.00159
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2.48	0.000656
S100A7	S100 calcium binding protein A7	-2.48	0.006141
ATP6V1B1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1	-2.53	0.000336
CYP4Z1	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1	-2.54	0.000563
KIAA1324	KIAA1324	-2.57	0.001418
SPDEF	SAM pointed domain containing ETS transcription factor	-2.59	0.006841
MACC1	metastasis associated in colon cancer 1	-2.69	0.003189
CD24	CD24 molecule	-2.73	0.000893
SEPW1	selenoprotein W, 1	-2.75	0.00017
SCPEP1	serine carboxypeptidase 1	-2.85	0.003136
S100A7A	S100 calcium binding protein A7A	-2.9	0.002504
CTGF	connective tissue growth factor	-2.98	0.006085
TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	-3.14	0.002702
MUC1	mucin 1, cell surface associated	-3.22	0.00268
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	-3.29	0.000312
RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	-3.35	0.003805

SLC6A14	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14	-3.65	0.002044
GLYATL2	glycine-N-acyltransferase-like 2	-3.74	0.002072
CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	-4.02	0.000352
FGG	fibrinogen gamma chain	-4.28	0.007687
EGR1	early growth response 1	-4.44	0.001393

Tabla S4. Lista de miARNs diferencialmente expresados con el extracto *G11* en comparación al vehículo tras 48 h de tratamiento. La tabla esta ordenada por tasa de cambio y contiene un total de 28 miARNs, se muestran sus valores de tasa de cambio y valor p.

<i>miARNs</i>	<i>Tasa de cambio (lineal)</i>	<i>ANOVA Valor p</i>
hsa-miR-1290	-87.23	0.00031
hsa-miR-1246	-48.02	0.00018
hsa-miR-3197	-6.29	0.00019
hsa-miR-4484	-4.39	0.00058
hsa-miR-371b-5p	-3.71	0.02090
hsa-miR-3687	-3.60	0.00163
hsa-miR-150-star	-3.27	0.02117
hsa-miR-4788	-3.18	0.00142
hsa-miR-1225-5p	-2.94	0.00287
hsa-miR-4417	-2.81	0.01651
hsa-miR-4741	-2.44	0.02701
hsa-miR-135a-star	-2.42	0.01398
hsa-miR-4507	-2.35	0.00891
hsa-miR-4763-3p	-2.24	0.03827
hsa-miR-2861	-2.23	0.02669
hsa-miR-149-star	-2.20	0.01491
hsa-miR-1244	-2.17	0.00696
hsa-miR-3185	-2.14	0.01133
hsa-miR-4449	-2.13	0.03001
hsa-miR-4707-5p	-2.09	0.02843
hsa-miR-1268	-2.06	0.02488
hsa-miR-4684-3p	-2.05	0.00802
hsa-miR-762	-2.02	0.02641
hsa-miR-331-3p	2.01	0.00624
hsa-miR-28-3p	2.07	0.02396
hsa-miR-181c-star	2.41	0.01235
hsa-miR-4687-3p	4.00	0.04163
hsa-miR-4286	4.26	0.04082

Tabla S5. Lista de genes blanco diferencialmente expresados para miARNs tras 48h de tratamiento con el extracto G11. Se muestra el miARN, su gen blanco, el valor de correlación y el valor q.

<i>miARNs</i>	<i>Gen Blanco</i>	<i>Correlación</i>	<i>Valor q</i>
hsa-mir-1268	FAM129A	-0.933	0.0213
hsa-mir-1268	ALDH1L2	-0.933	0.0213
hsa-mir-149*	OLFM4	-0.917	0.0213
hsa-mir-149*	ALDH1L2	-0.917	0.0213
hsa-mir-150*	ETV4	-0.917	0.0213
hsa-mir-762	ALDH1L2	-0.900	0.0283
hsa-mir-1225-5p	ETV4	-0.900	0.0283
hsa-mir-1225-5p	HEG1	-0.895	0.0288
hsa-mir-762	FAM129A	-0.883	0.0334
hsa-mir-150*	CYP1A1	-0.883	0.0334
hsa-mir-150*	CALB2	-0.879	0.0347

ANEXO C – PROTOCOLOS

VIABILIDAD CELULAR POR MTT

Reactivos:

- Kit MTT Cell Proliferation Assay (ATCC®)
- DMSO 100%
- Medio DMEM + 10% FBS
- Extracto G11 y vehículo

Día 1 - Siembra

1. Considerar la distribución de la placa para las concentraciones que se van a probar.
2. Sembrar 5.0×10^3 células/pozo en placas de 96 pozos con 100µl de medio DMEM más 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) por pozo.
3. Incubar las células toda la noche a 37°C y 5% CO₂.

Día 2 – Tratamiento

4. Preparar las 9 diferentes concentraciones (0.025-6.4mg/ml) del extracto G11 y el vehículo que se van a probar.
 - 4.1 Hacer los cálculos de volumen de medio necesario y de la concentración del extracto G11 y el vehículo requeridos para las 10 condiciones, con 5 pozos por condición con 100µl de medio por pozo.
 - 4.2 Preparar las 9 concentraciones en dilución serial comenzando por 6.4 mg/ml.
 - 4.3 Vortexear vigorosamente los tubos entre cada dilución.
5. Incubar las células a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h.

Día 3 – MTT

6. Pasadas las 24 h de tratamiento quitar el medio de las células.
7. Agregar 100µl de medio fresco DMEM + 10% de SFB por pozo.
8. Agregar 10µl de reactivo MTT por pozo.
9. Dejar incubar las células a 37°C y 5% CO₂ durante 4 h.
10. Quitar el medio con el MTT y agregar 100µl de DMSO (puede ser fuera de campana)
11. Proteger de la luz y agitar durante 10 minutos.
12. Leer la absorbancia a 570nm.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON TRIZOL

Reactivos:

- Trizol Reactive (INVITROGEN®)
- Isopropanol 100%
- Acetato de sodio 3M
- Etanol al 75% en H₂O grado Biología Molecular
- Centrífuga a -4°C

Recolección de células con trizol: Una vez terminado el tratamiento, lavar las células con PBS frío, si es en placa de 24 pozos, agregar 200µl de trizol por pozo y dejar a 4°C por al menos 30 min. Transferir las células con trizol a tubos eppendorf para evitar la evaporación y guardarlos a -20 ó -80°C hasta su uso.

Día 1 de la extracción: Separación y precipitación de ARN

1. Atemperar la centrifuga a 4°C.
2. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de trizol y vortexear.
3. Incubar en hielo durante 10 min.
4. Centrifugar a 13,000 rpm durante 12 min.
5. Transferir la fase incolora a un nuevo tubo de 1.5ml sin tocar las otras fases.
6. Agregar 0.5ml de isopropanol por cada 1ml de trizol. Mezclar por inversión.
7. Opcional: para una mejor precipitación, se puede agregar acetato de sodio 3M a 1/5 de la cantidad de isopropanol.
8. Incubar toda la noche a -20°C.

Día 2 de la extracción: Lavado de ARN

9. Atemperar la centrifuga a 4°C.
10. Quitar completamente el sobrenadante de isopropanol con pipeta.
11. Lavar la pastilla agregando al menos 1 ml de etanol al 75% por cada 1 ml de trizol utilizado inicialmente y disgregar la pastilla por vortex.
12. Centrifugar a 13,000 rpm durante 12 minutos.
13. Quitar completamente el sobrenadante y dejar secar el ARN al menos 15 min en hielo con la tapa abierta.
14. Eluir la pastilla en 15µl de agua DEPC.
15. Cuantificar el ARN a 260/280 con ayuda de un NanoDrop.
16. Guardar a -80°C hasta su uso.

RETROTRANSCRIPCIÓN de ARNm

Reactivos:

- Muestras de ARN a 200ng/µl.
- Random primers (diluir a 250ng/µl)
- DNTP Mix (10mM)
- First Strand Buffer 5x
- DDT (0.1M)
- RNase Out (40 unidades/µl)
- Super Script II (200 unidades)
- Agua Grado Biología Molecular
- Encender el termociclador

Retrotranscripción de ARN mensajero (Para un total de 19µl por reacción)

1. Descongelar las muestras y los reactivos en hielo.
2. Mezclar y bajar los reactivos.
3. Preparar el Master Mix A usando 2µl de muestra. Considerar 10% de exceso en todos los reactivos.
4. Nota: si se usan más µl de muestra para obtener los 100ng totales de ARN, se debe variar el volumen del agua para un total de 11µl entre Master Mix A y la muestra.
5. Protocolo para una reacción

Master Mix A

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen 1x</i>
Random primers (250ng/µl)	1µl
DNTP Mix (10mM)	1µl
Agua	8µl
Volumen Total	10µL

6. Mezclar y centrifugar el Master Mix A.
7. Poner 10µL de Master Mix A a cada tubo o placa de PCR.
8. Agregar 1µl de la muestra.
9. Tapar la placa con plástico grueso y mariposa, vortexear y centrifugar.
10. Calentar la placa en el termociclador durante 5 min a 65°C y después a 4°C (con el programa α 4° del termociclador).
11. Mezclar y centrifugar los reactivos del Master Mix B.
12. Preparar el Master Mix B.

Master Mix B

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen 1x</i>
First Strand Buffer 5x	4µl
DDT (0.1M)	2µl
RNAse Out (40 unidades/µl)	1µl
Volumen Total	7µL

13. Mezclar y centrifugar el tubo de Master Mix B
14. Agregar 7µl (21µl) de Mater Mix B a cada tubo (cambiar punta entre cada tubo), mezclar y centrifugar.
15. Incubar la mezcla a 25°C por 2 min.
16. Mezclar la enzima Super Script II (200 unidades) por pipeteo NO VORTEXEAR.
17. Agregar 1µl de la enzima y mezclar por pipeteo.
18. En el termociclador incubar la mezcla:
 - 10 min a 25°C
 - 50 min a 42°C
 - 15 min a 70°C
 - infinito a 4°C
19. Diluir con agua si es necesario.
20. Guardar a -20°C hasta su uso.

MIGRACIÓN CELULAR CON SISTEMA TRANSWELL

Reactivos:

- Violeta de genciana al 3% o 0.75% (Violeta de Genciana Farmacias del Ahorro, se toma el envase original como 100%) en agua libre de ARNasas.
- Etanol frío al 70% con agua libre de ARNasas o Biología Molecular.
- Ácido acético al 10% en agua libre de ARNasas.

Materiales:

- Pinzas (estériles)
- Hisopos (estériles)
- 3 vasos o charolas para el lavado (estériles)
- PBS
- Papel aluminio

Día 1 - Siembra

1. Sembrar 3.0×10^5 células/pozo en caja de 6 pozos con medio DMEM más 10% FBS.
2. Incubar las células toda la noche de 12 a 18 h.

Día 2 - Tratamiento

3. Preparar el medio con la concentración de extracto *G1* y vehículo deseado.
4. Tratar las células con el extracto correspondiente, 1.4 ml por pozo.
5. Dejar incubar 48 h a 37° y 5% CO₂.

Día 3 - Siembra en transwell

Nota: Se puede o no acondicionar el transwell, con 30 min antes basta. Para invasión si es obligatorio. Para acondicionar, colocar 500µl de medio SIN SUERO en la cámara inferior y 300µl de medio SIN SUERO en el transwell, dejar incubar 37° y 5% CO₂ de 1 a 24 h.

6. Quitar el medio del transwell y de la cámara inferior con pipeta.
7. Enjuagar dos veces con PBS.
8. Tripsinizar las células y colocarlas en un tubo eppendorf, resuspender en 1 ml de medio SIN SUERO.
9. Contar cada pool y hacer los cálculos para tener 100 mil células en 300 µl.
10. Poner en el transwell 300µl con 100 mil células disueltas en medio SIN SUERO.
11. Agregar 750 µl de medio con 10% de SFB en la cámara inferior y colocar el transwell ahí.
12. Incubar por 24 h a 37°C y 5% CO₂.

Nota: Se tienen que sembrar 3 pozos adicionales por cada transwell en placas de 96 pozos (pueden ser el mismo número de células o si se tienen muy pocas la mitad). Y se les hace cristal violeta o SRB de 12 a 18h, es el control de que se está sembrando lo mismo en cada pozo.

Día 4 - Fijado de células

13. Quitar el medio del transwell y de la cámara inferior con pipeta.
14. Lavar el transwell dos veces con PBS por decantación en un vaso estéril o charola.

15. Fijar las células con EtOH frío al 70%, colocar 700µl en la cámara inferior.
16. Dejar a -20°C de 1 a 12 h.
17. Retirar el etanol con pipeta o por decanto y golpear la cajita para que seque muy bien. Dejar la caja destapada y boca abajo hasta que seque por completo.

NOTA: Todas los transwells que se tengan (repetidos y diferentes horarios) se dejan secando después de haber fijado las células, hasta que se tengan todas para teñir y medir juntas, así se evitan sesgos por la medición.

Día 5 - Tinción y medición

18. Para teñir, colocar 400µl de solución de cristal violeta en la cámara inferior y dejar 30 min a temperatura ambiente y PROTEGIDAS DE LA LUZ.
19. Pasado el tiempo limpiar el excedente de la parte superior del transwell con el hisopo estéril y dejar secar completamente ABAJO NO SE TOCA, son las células que nos interesan.
20. Regresar el transwell a la caja de 24 pozos y colocar en el microscopio para las fotos, es importante mantener el mismo zoom.
21. Para medir, colocar 300µl de ácido acético en la cámara de abajo para disgregar todas las células, poner durante 15 min en el agitador protegidas de la luz.
22. Poner 100µl en pozos de 96p (triplicados) y leer absorbancia espectro a 570nm.

PCR EN TIEMPO REAL

Reactivos:

- Muestras de ADNc
- Universal Taqman Master Mix.
- H₂O grado biología molecular
- Sondas para cada gen

NOTA: Este procedimiento se realiza en placas de 96 pozos.

1. Sacar los reactivos y descongelarlos en hielo. Cubrir la sonda con papel aluminio.
2. Mezclar y bajar los reactivos antes de la preparación. Considerar 5 o 10% de exceso.
3. Cada Master Mix PCR se prepara en un tubo eppendorf y es específico para una sonda. Es recomendable no preparar todas las Master Mix PCR al mismo tiempo.

Master Mix PCR

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen 1x</i>
Universal Taqman Mix	5µl
Agua	3.5µl
Sonda	0.75 µl
Volumen Total	9.25µl

1. Transferir 9µl del Master Mix PCR a cada pozo de la placa de 96 pozos (revisar distribución previa de la placa).
2. Agregar 1µl del producto de retrotranscripción a cada pozo previamente mezclado y bajado. Se puede utilizar pipeta multicanal.
3. Sellar la placa con adhesivo. Pegar bien las esquinas.
4. Vortexear la placa y centrifugarla a 3,000 rpm durante 1 min. Verificar que no tenga burbujas.
5. Crear la plantilla con los parámetros del experimento en el programa Quant Studio para 10µl.

Condiciones de termociclado

<i>Step</i>	<i>Hold</i>	<i>Hold</i>	<i>40 cycles Denature Anneal/Extend</i>	
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2 min	10 min	15 sec	1 min

APOPTOSIS POR ANEXINAV

Reactivos:

- FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis Kit® (LifeTechnologies,

Nota: Si es la primera vez que se hace AnexinaV, se deben llevar los siguientes controles para compensar el equipo, ninguno es apoptótico, son para ver la fluorescencia normal de las células. Con un replicado es suficiente.

- Control WT sin ningún fluoróforo
- Control WT marcado sólo con FITC
- Control WT marcado sólo con IP

Controles Internos del experimento:

- *Control positivo (a apoptosis):* marcado con FITC y IP, poner 2.5% de DMSO en cada pozo que se vaya a utilizar 30 min antes de marcar con los fluoróforos para llevarlas a apoptosis. También se pueden dejar 30 min a 55°C.
- *Control negativo (a apoptosis):* marcado con FITC y IP, son células WT normales son apoptosis marcadas con ambos fluoróforos, es el control “basal” del experimento para medir la fluorescencia normal de las células ocasionada por la manipulación.

Nota: Se leen aproximadamente 8 tubos por hora y se usan entre 2 y 2.5 h de cultivo para los marcajes previas a la lectura en el citómetro de flujo.

Día 1 Siembra de células

1. Sembrar 2.0×10^5 células/pozo en cajas de 6 pozos (hacer la cuenta de cuantos pozos por condición se necesitan para tener el día de la lectura 200 mil células por replicado).
2. Incubar las células de 12 a 18 h a 37°C y 5% de CO_2 .

Día 2 Tratamiento

3. Preparar la concentración deseada del extracto *G11* y el vehículo.
4. Tratar las células y dejar incubar por 48 h.

Día 3 Marcado y lectura

5. Se deben preparar las siguientes soluciones:
 - 5.1 *Anexina Binding Buffer 1x Preparar:* Diluir la Anexina binding buffer que viene a 5x en el kit a 1x que es como se va a utilizar. Multiplicar por el número de reacciones que se necesiten (incluyendo todos los controles) que se van a leer en el día. Preparar la cantidad exacta no se puede guardar.

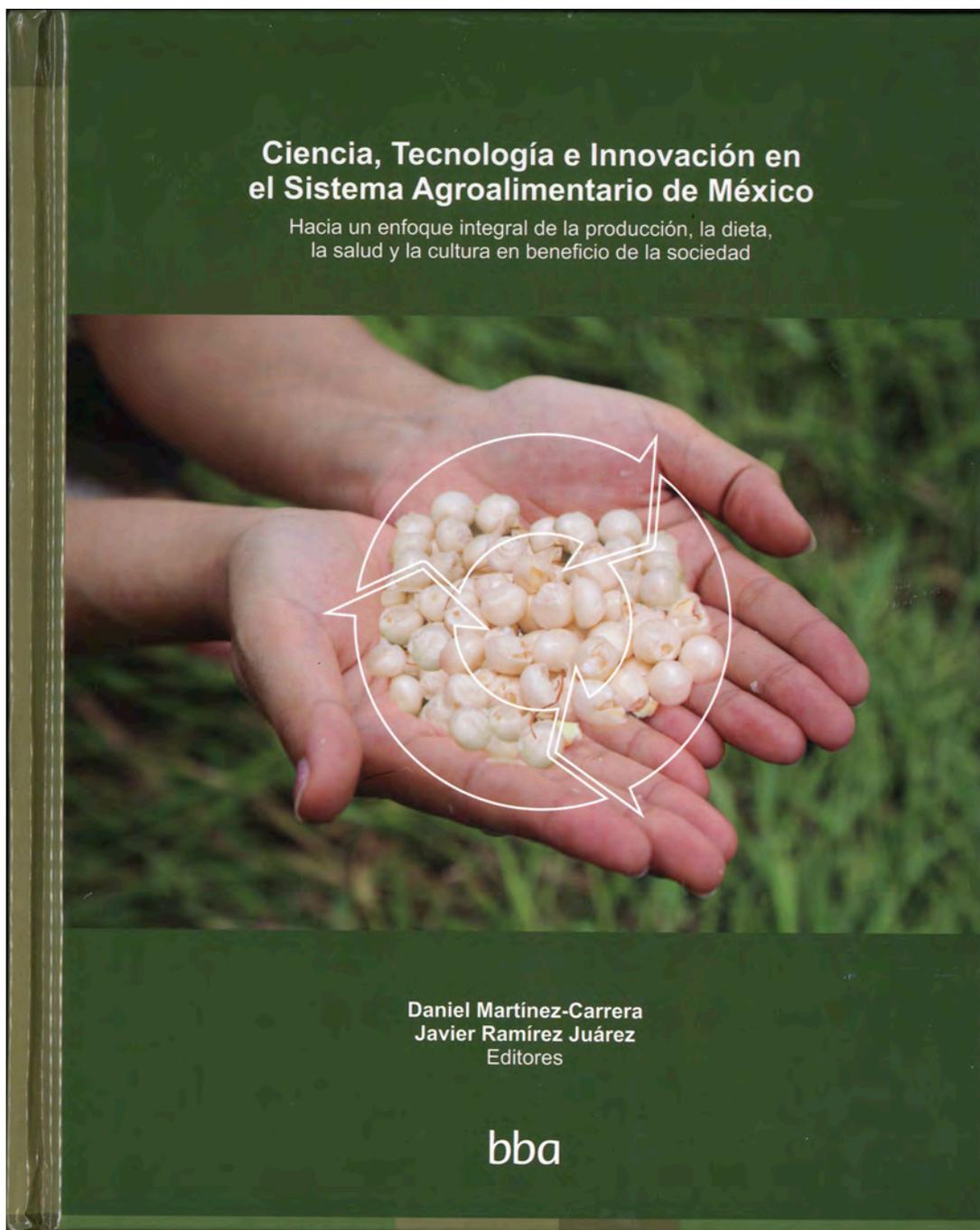
<i>Reactivo</i>	<i>Volumen 1x</i>
5x Anexina Binding Buffer	100 μl
Agua	400 μl
Total	500 μl

- 5.2 *Working Solition IP:* para preparar la solución que se va a usar de IP se debe hacer la siguiente dilución. El IP del kit viene a 1mg/ml y se necesita a 100ng/ml. Para ello se diluyen 5 μl de IP original en 45 μl de la solución 1x Anexina binding buffer que se acaba de preparar. Este SI se puede almacenar ya diluido para futuros experimentos.
6. Tripsinizar los pozos que se van a utilizar con 300 μl de tripsina por pozo y 4 minutos en la incubadora.
7. Recolectar las células (de preferencia en tubos eppendorf de 1.5 ml), se centrifugan a 1,200 rpm durante 4 min para quitarles la tripsina y se resuspenden con 300 μl de 1x AnexinaV Binding Buffer.
8. Contar las células y en tubos de 600 μl diluir las células de modo que cada repetido de 100 μl tenga 200 mil células.
9. Marcar las células con los fluoróforos: agregar 5 μl de FITC (Alexa Fluor® 488 annexinV) y 1 μl de la solución diluida de PI por cada 100 μl de células en suspensión.
10. Incubar la reacción a temperatura ambiente por 15 minutos en la oscuridad.
11. Pasado el tiempo de incubación, agregar 400 μl de 1x Anexina Binding Buffer para un total de 500 μl de muestra.
12. Mezclar por pipeteo y colocar en hielo.
13. Llevar las muestras al área de citómetro de flujo y leer.

ANEXO D – PUBLICACIONES

CAPÍTULO DE LIBRO

Como parte de una colaboración con el Dr. Daniel Martínez Carrera del Colegio de Postgraduados Campus Puebla, se realizó el capítulo 38 titulado “*Genómica de las propiedades anticancerígenas de los hongos comestibles, funcionales y medicinales: Investigaciones INMEGEN-CP*” del libro “*Ciencia, Tecnología en el Sistema Agroalimentario de México*”. A continuación se muestra el contenido del capítulo.



Título de la obra:

Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México

Editores:

© Daniel Martínez-Carrera

Javier Ramírez Juárez

© 1ª Edición, 2016

Coordinación editorial: Judith Sandoval

Maquetación: Alejandro Rojas Sánchez

Diseño de cubiertas: Rogelio Covarrubias Romo

Biblioteca Básica de Agricultura:

Editorial del Colegio de Postgraduados

Colegio de Postgraduados

Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, A. C.

ISBN: 978-607-715-314-6 Colegio de Postgraduados

© Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción, total o parcial de este libro ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito de los titulares del *copyright*.

Es responsabilidad del autor el uso de las ilustraciones, el material gráfico y el contenido creado para esta publicación.

Las opiniones expresadas en este documento son de exclusiva responsabilidad de los autores, y no reflejan necesariamente los puntos de vista del Colegio de Postgraduados, de la Editorial del Colegio de Postgraduados, ni de la Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.

Impreso en México - Printed in Mexico
PRINTING ARTS MEXICO, S. de R. L. de C. V.
Calle 14 no. 2430, Zona Industrial
Guadalajara, Jalisco, México. C.P. 44940
Fax: 3810 5567
www.tegrafik.com
RFC: PAM 991118 DGO

Tiraje: 1 000 ejemplares.

Cita bibliográfica:

Martínez-Carrera, D. y J. Ramírez Juárez (Eds.), 2016. *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México*. Editorial del Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México. 856 pp.

Contiene 131 Figuras y 181 Tablas.

Genómica de las propiedades anticancerígenas de los hongos comestibles, funcionales y medicinales: investigaciones INMEGEN-CP*

Mónica Peña-Luna¹, Alfredo Hidalgo-Miranda¹, Sandra Romero-Córdoba¹, Mercedes Sobal Cruz², Porfirio Morales Almora², Gerardo Jiménez-Sánchez³ y Daniel Martínez-Carrera²

¹ Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Laboratorio de Genómica del Cáncer, Periférico Sur no. 4809, Colonia Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, D.F. 14610, México. Correos electrónicos: ahidalgo@inmegen.gob.mx, sromero_cordoba@hotmail.com

² Colegio de Postgraduados (CP), Campus Puebla, Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, Apartado Postal 129, Puebla 72001, Puebla, México. Correo electrónico: dcarrera@colpos.mx

³ Harvard School of Public Health, Harvard University, Department of Epidemiology, 655 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, E.U.A.

Resumen

Se presenta un panorama general sobre el impacto de la genómica en la identificación de marcadores genéticos y epigenéticos que permiten el análisis a profundidad del genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de los organismos. En este contexto, se discute la aplicación de la genómica al estudio de los compuestos bioactivos derivados de productos naturales en el tratamiento del cáncer, lo cual ha permitido el desarrollo y la aprobación de nuevos fármacos disponibles comercialmente. Se analiza de manera específica la evidencia científica reportada que soporta las propiedades anticancerígenas de los hongos comestibles, funcionales y medicinales. Se presenta, por primera vez en el país, el proyecto de los recursos genéticos nativos de *Ganoderma lucidum* como modelo de estudio para evaluar, a nivel genómico, el potencial anticancerígeno de extractos estandarizados y patentados. La especie se identificó a nivel molecular y se desarrollaron tecnologías e innovaciones para su cultivo, así como la obtención de basidiocarpos y extractos, bajo condiciones axénicas y controladas. Se describen las investigaciones genómicas del efecto *in vitro* de los extractos estandarizados de *G. lucidum* sobre el transcriptoma de células de cáncer de mama (línea triple negativa MDA-MB-468), incluyendo su validación con análisis funcionales específicos. Los resultados obtenidos empleando la tecnología de microarreglos del ADN demostraron que los extractos de *G. lucidum* alteran los perfiles de expresión génica de las células cancerígenas en rutas específicas como proliferación, migración y apoptosis. El cáncer

* Investigación financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, C-630/2013) en el CP.

de mama es un problema de salud pública en México, ya que constituye la principal causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres mexicanas. Sin embargo, nuestro país cuenta con una gran diversidad de recursos genéticos de hongos comestibles, funcionales y medicinales, los cuales representan una valiosa fuente de compuestos bioactivos. Con esta base, las novedosas tecnologías genómicas abren una brecha importante en la búsqueda de agentes terapéuticos emergentes contra el cáncer de mama.

Palabras clave: agentes terapéuticos, células de cáncer de mama, extractos de hongos, *Ganoderma lucidum*, genómica, hongos comestibles y medicinales, propiedades anticancerígenas, transcriptoma.

Abstract

Genomics of anticancer properties from edible, functional, and medicinal mushrooms: INMEGEN-CP research program.

A general view is presented about the impact of genomics on the identification of genetic and epigenetic markers that allow genome, transcriptome, proteome, and metabolome analyses in all organisms. In this context, the application of genomics to study bioactive compounds derived from natural products in cancer treatment is discussed, including the development and approval of new drugs commercially available. The scientific evidence published on anticancer properties of edible, functional, and medicinal mushrooms is analyzed. The project on native genetic resources of *Ganoderma lucidum* as a model for assessing, at genomic level, the anticancer potential of standardized and patented mushroom extracts is presented for the first time in the country. This species was identified at the molecular level, and technologies and innovations were developed for its cultivation, as well as for the production of basidiocarps and extracts, under axenic and controlled conditions. Genomic research is described about the *in vitro* effect of standardized extracts of *G. lucidum* on the transcriptome of breast cancer cells (MDA-MB-468 triple negative line), including functional analyses. Results obtained using DNA microarray technology showed that *G. lucidum* extracts affect gene expression profiles from cancer cells in specific pathways, such as proliferation, migration and apoptosis. Breast cancer is a public health problem in Mexico, as it is the leading cause of cancer death among Mexican women. However, our country has a great diversity of mushroom genetic resources, which are a valuable source of bioactive compounds. On the basis of this, new genomic technologies open up an important avenue in the search for emerging therapeutic agents against breast cancer.

Key words: anticancer properties, breast cancer cells, edible and medicinal mushrooms, *Ganoderma lucidum*, genomics, mushroom extracts, therapeutic agents, transcriptome.

I. Introducción

El consumo de los hongos comestibles ha acompañado a la humanidad posiblemente desde su origen. Los seres humanos han reconocido su excelente sabor, aroma, y textura. Sin embargo, su impacto directo en la alimentación humana se ha hecho cada vez más evidente a partir del notable desarrollo de las biotecnologías intensivas de producción de las especies cultivadas, sobre todo durante los últimos 65 años (Chang y Miles, 2004; Chang y Wasser, 2012). Esto ha permitido que la producción mundial de hongos comestibles supere ya los 24 millones de toneladas anuales (Chang y Wasser, 2012). En este contexto, aquellos países que cuentan con una gran diversidad biológica y cultural, así como amplia tradición por el consumo de los hongos comestibles, deben promover el desarrollo y la competitividad de esta cadena agroalimentaria emergente para estar a la vanguardia en la aplicación de estos procesos biotecnológicos a la seguridad alimentaria y la salud (Martínez-Carrera *et al.*, 2012). Este es el caso de México, el mayor productor de hongos comestibles en Latinoamérica. Sus niveles de producción alcanzaron 62 374 toneladas de hongos frescos por año en el 2011, representando operaciones comerciales por más de 200 millones de dólares y generando alrededor de 25 mil empleos directos e indirectos. El consumo *per capita* en México es de alrededor de 0.620 kg de hongos comestibles por año (Martínez-Carrera *et al.*, 2012).

Recientemente, la investigación científica ha develado el gran potencial de los hongos comestibles como alimento funcional con propiedades nutricionales y medicinales que promueven la salud. Estas propiedades son únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos ampliamente consumidos, ya que los hongos constituyen un reino de la naturaleza independiente de las plantas y los animales (Chang, 1996; Chang y Miles, 2004; Martínez-Carrera *et al.*, 2004, 2010). El valor funcional de los hongos comestibles incluye propiedades anticancerígenas, antibióticas (antimicrobianas: antivirales, antibacterianas, antiparasitarias), antioxidantes, reductoras del nivel de colesterol y la hipertensión, antitrombóticas y antidiabéticas (Chang y Miles, 2004; Martínez-Carrera *et al.*, 2004, 2010).

Considerando los antecedentes citados, en octubre del 2012 el Colegio de Postgraduados (CP) y el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) iniciaron investigaciones genómicas conjuntas para estudiar las propiedades anticancerígenas de los hongos comestibles, funcionales y medicinales. La estrategia general establecida y los avances realizados a la fecha se presentan a continuación.

II. Impacto de la genómica en la identificación de marcadores genéticos y epigenéticos

Para poder tener una visión más amplia sobre el potencial preventivo y terapéutico de los productos naturales y sus compuestos bioactivos, se deben entender las complejas interacciones celulares mediante los nuevos abordajes genómicos. Hace unas décadas, los diseños experimentales

tradicionales podían establecer las relaciones entre los productos naturales (obtenidos mediante la dieta o mediante su uso como fármacos o fuente de sustancias bioactivas) con un limitado número de mecanismos moleculares, lo cual sólo explicaba en una mínima parte los procesos observados. El uso de la genómica permite expandir estos horizontes y evaluar los efectos de los productos naturales a nivel de genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma completo, en lo que colectivamente se ha denominado las “ómicas”.

El análisis genómico aplicado al estudio de productos naturales, en este caso de los hongos comestibles, funcionales y medicinales, se puede dividir en dos categorías. La primera es el análisis estructural, el cual tiene como objetivo definir cómo los cambios en el ADN (mutaciones, amplificaciones, deleciones) pueden modular la actividad de un compuesto bioactivo; o bien el establecimiento de patrones de expresión de ARN (transcritos codificantes y no codificantes con funciones regulatorias) y proteínas por la actividad de los productos naturales. Este abordaje emplea como herramientas tecnológicas los microarreglos, la secuenciación de nueva generación y la espectrometría de masas, las cuales arrojan miles de datos que potencialmente explican en conjunto la actividad de los compuestos. A la segunda categoría se le denomina genómica funcional, que a través de diversos mecanismos se favorece o inhibe un fenotipo específico (número de copias, mutaciones, expresión o silenciamiento génico) en modelos de estudio como líneas celulares o animales para determinar la función y el efecto de un producto natural mediante las tecnologías genómicas definiendo genes candidato, rasgos génicos o epigenéticos específicos (Emilien *et al.*, 2000).

En el caso de los productos naturales (*e.g.*, hongos comestibles, funcionales y medicinales) pueden evaluarse distintos escenarios a partir de la genómica del cáncer. Por ejemplo, con una metodología de gran escala podrían determinarse los mecanismos moleculares que tras la ingesta prolongada de ciertos alimentos brindan un efecto protector al prevenir el establecimiento de programas carcinogénicos; o bien entender la relación entre las respuestas biológicas y la dieta, en la que características génicas como los polimorfismos de un solo nucleótido podrían modular la magnitud de la actividad antitumoral de los compuestos bioactivos (Gorduza *et al.*, 2008; Scalbert y Knasmuller, 2008). Otro posible escenario es el estudio del uso terapéutico de los productos naturales en tumores ya establecidos, donde a través de la genómica se pueden establecer las rutas celulares que modulan los compuestos bioactivos con una visión ampliada e integral, definiendo blancos específicos de los agentes naturales (Figura 1).

Aunque es limitada la literatura donde se evalúa la interacción de la genómica y los productos naturales, podemos encontrar algunos ejemplos; van Erk *et al.* (2005) evaluaron mediante microarreglos los cambios en la expresión génica en líneas celulares tumorales de colón expuestas a quercetina, reportando genes que modulan proliferación celular, supresión tumoral y adhesión celular. En otro estudio empleando microarreglos de genoma completo, se estableció que los polifenoles del café modulan STAT5B y ATF-2 teniendo un impacto final en la regulación del

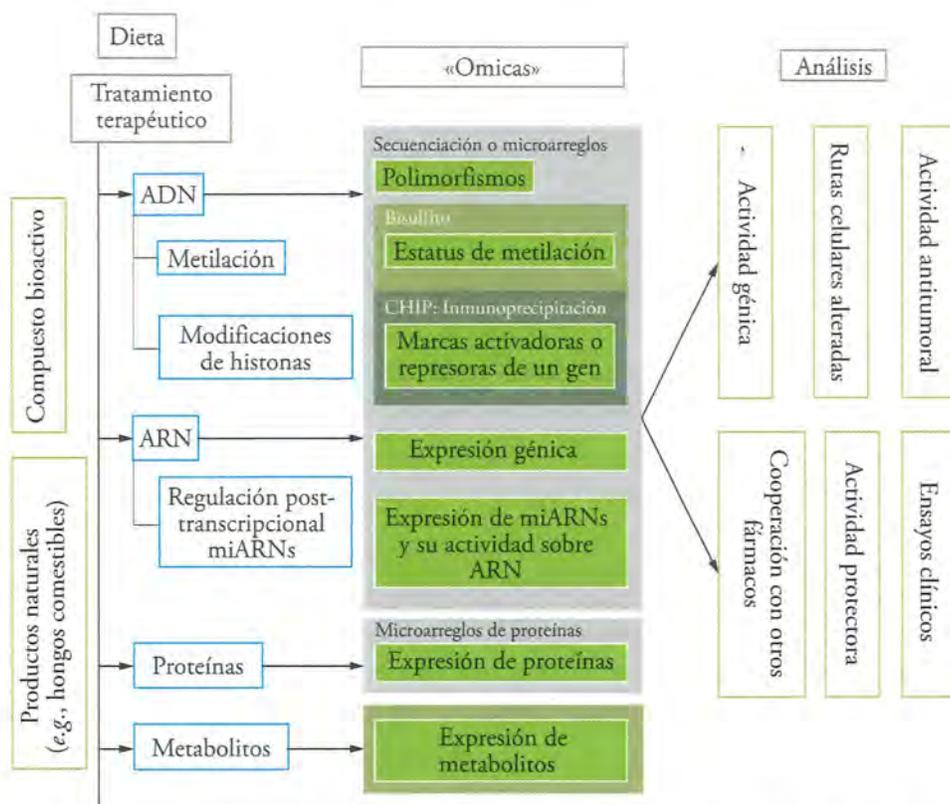


Figura 1. Genómica de los productos naturales (*e.g.*, hongos comestibles, funcionales y medicinales) e identificación de marcadores genéticos y epigenéticos para evaluar los efectos preventivos o curativos de los compuestos bioactivos en el cáncer.

ciclo celular en líneas celulares de cáncer de colon (Ortiz-Martínez *et al.*, 2014). Finalmente, Kachroo *et al.* (2011) tras un análisis de expresión génica con microarreglos reportaron el impacto quimiopreventivo de los ácidos grasos poliinsaturados consumidos en la dieta al modular genes reguladores de células troncales del colon, apuntando su potencial actividad protectora en el inicio y progresión de cáncer de colon.

El uso combinado de varias estrategias metodológicas de alto rendimiento como el análisis de transcriptoma, proteómica y bioquímica brinda una visión muy amplia y valiosa en el entendimiento de la forma en la que los productos naturales (*e.g.*, hongos comestibles, funcionales y medicinales) actúan en el contexto celular. Este abordaje permitió investigar el efecto de Thioestrepton y otros compuestos en la células humanas, particularmente en las células tumorales. La validación por espectrometría de masas y la subsecuente validación bioquímica demostraron que estos productos naturales inducen proteosomas que permiten la acumulación de agregados proteicos que favorecen la respuesta de las proteínas de choque y los programas de muerte celular programada en las células de cáncer (Sandu *et al.*, 2014).

Al enfoque cuyo objetivo es identificar los cambios en los procesos fisiológicos basados en la presencia y las variaciones de concentraciones de los productos finales de la actividad de las enzimas metabólicas, en respuesta a la exposición de factores ambientales, se le denomina metabolómica. El número de metabolitos humanos se ha estimado hasta un máximo de diez mil, los cuales podrían participar en el establecimiento del cáncer (Wishart *et al.*, 2013). Dado que los metabolitos son el producto final de la expresión génica y la actividad de las enzimas en los organismos; analizar los metabolitos puede revelar las consecuencias de la expresión génica alterada, expresión de proteínas y rutas de señalización en cáncer. La metabolómica es una de las mejores plataformas para definir el estatus metabólico de los sistemas biológicos (Sumner *et al.*, 2003), incluso a partir de muestras como biofluidos. Durante los últimos años, la metabolómica ha sido ampliamente utilizada para identificar productos naturales con propiedades anticancerígenas (Kersten y Dorresteijn, 2009).

Finalmente, la genómica también ha impactado ya en la caracterización de las plantas y microorganismos con propiedades anticancerígenas. Un ejemplo es la secuenciación de genoma completo del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., con lo cual fue posible identificar un conjunto de genes que pueden estar involucrados en el metabolismo secundario y su regulación. Esta información genómica ayuda a elucidar los mecanismos moleculares que subyacen en la síntesis de diversos metabolitos secundarios con efecto terapéutico. La secuencia del genoma de dicha especie hace posible obtener el máximo potencial de *G. lucidum* como fuente de compuestos bioactivos con potencial farmacológico (Chen *et al.*, 2012).

III. Los productos naturales: una fuente de agentes terapéuticos para la lucha contra el cáncer

El escenario actual para el tratamiento del cáncer plantea grandes retos a pesar de los enormes avances que se han logrado en el desarrollo de fármacos, los cuales contribuyen significativamente a una mayor supervivencia y calidad de vida de los pacientes con cáncer, ya que existe un porcentaje muy elevado de recurrencias y metástasis. Los productos naturales han sido utilizados como opción terapéutica contra el cáncer, en virtud de que pueden representar nuevas opciones para reducir los procesos oncogénicos y con ello la mortalidad por cáncer. Un ejemplo para el tratamiento de tumores malignos son los alcaloides de vinca y los taxanos utilizados como medicamentos para quimioterapia, los cuales hasta la fecha no han podido ser sintetizados *in vitro* (Exposito *et al.*, 2009). Desde el 2007, con la aprobación de la Rapamicina, 12 nuevos fármacos derivados de productos naturales han sido aprobados como tratamiento para el cáncer. La regulación del uso de estos productos está controlada por diversos organismos del sector salud, tales como la FDA (E.U.A.), la EMA (Europa), y la COFEPRIS (México). En la Tabla 1 se presentan diversos medicamentos derivados de productos naturales, así como sus propiedades. Actualmente, más del 50 % de los medicamentos aprobados por

Tabla 1. Fármacos aprobados contra el cáncer desde el 2007, derivados de productos naturales (modificada de Basmadjian *et al.*, 2014).

Nombre (denominación comercial)	Organismo de origen	Compañía y año de aprobación	Cáncer	Mecanismo de acción
Temsirolimus (Torisel®)	Bacteriano (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>), derivado de rapamicina	Wyeth, 2007	Carcinoma de células renales (RCC)	Inhibición de mTOR
Everolimus (Afinitor®)	Bacteriano (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>), derivado de rapamicina	Novartis, 2009	Cáncer de riñón avanzado	Inhibición de mTOR
Ixabepilone (Ixempra®)	Bacteriano (<i>Sorangium cellulosum</i>)	Bristol-Myers Squibb, 2007	Cáncer de mama agresivo metastásico y avanzado que no responde quimioterapia	Estabilización de microtúbulos
Vinflunine (Javlor®)	Vegetal, Vinca del cabo (<i>Catharanthus roseus</i>)	Pierre Fabre, 2009	Cáncer de vejiga	Inhibición de la polimerización de tubulina
Romidepsin (Istodax®)	Bacteriano, (<i>Viola chromobacterium</i>)	Celgene, 2009	Linfoma cutáneo de células T (CTCL)	Inhibición de las isoformas 1 y 2 de histona desacetilasas
Trabectedin = ecteinascidin 743 (Yondelis®)	Animal, Ascidia (<i>Ecteinascidia turbinata</i>)	Zeltia & Johnson and Johnson, 2009	Sarcoma de tejidos blancos Cáncer de ovario	Inducción de daño al ADN
Cabazitaxel (Jevtana®)	-	Sanofi-Aventis, 2010	Cáncer de próstata metastásico hormono-refractario	Estabilización de los microtúbulos
Abiraterone acetate (Zytiga®)	-	Janssen, 2011	Cáncer de próstata resistente a la castración	Inhibición de 17 α -hidroxilasa / C17, 20 liasa (CYP17A1)
Eribulin mesylate (Halaven®)	Animal, Esponja marina (<i>Halichondria okadaï</i>)	Eisai Co., 2011	Cáncer de mama metastásico	Inhibición de la dinámica de los microtúbulos
Homoharringtonine, Omacetaxine mepesuccinate (Synribo®)	Vegetal, Cowtail pino (<i>Cephalotaxus harringtonia</i>)	Teva, 2012	Leucemia mielógena crónica (CML)	Inhibición de la síntesis de proteínas
Carfilzomib (Kyprolis®)	Bacteriano, Actinomicetos, derivado de epoxomicina	Onyx, 2012	Mieloma múltiple	Inhibición de proteasoma
Ingenol mebutate (Picato®)	Vegetal (<i>Euphorbia peplus</i>)	LEO Pharma, 2012	Queratosis actínica	Activación de PKC δ

la FDA derivan de productos naturales (Kingston, 2011). Sin embargo, únicamente el 3 % de la investigación de productos naturales que llega a etapas preclínicas y clínicas se enfoca al estudio de hongos (Harvey, 2008), lo cual pone de manifiesto la relevancia del estudio de las propiedades fúngicas.

La micoterapia es el estudio de la utilización de extractos y compuestos bioactivos obtenidos a partir de hongos con el fin de utilizarlos como productos funcionales, agentes o medicinas que promueven la salud. Dentro del estudio del cáncer, la micoterapia es un campo relativamente nuevo y prometedor como fuente de agentes con propiedades anticancerígenas (Popovic *et al.*, 2013). La identificación de compuestos bioactivos en los extractos se ha convertido en un tema de gran interés en la comunidad académica debido a la creciente evidencia científica sobre sus propiedades anticancerígenas, así como al incremento en la incidencia de diversos tipos de cáncer a nivel mundial (Zong *et al.*, 2012). Dentro de los compuestos bioactivos de los hongos comestibles, funcionales y medicinales destacan los polisacáridos de la pared celular, los cuales se ha demostrado que actúan como modificadores de la respuesta biológica (MRB) y pueden impedir la carcinogénesis (Zjawiony, 2004). La Tabla 2 muestra algunos extractos con propiedades oncogénicas, así como su mecanismo de acción en los diferentes tipos de cáncer estudiados (Popovic *et al.*, 2013).

Los productos naturales poseen una gran diversidad química, por lo que constituyen una fuente potencial para el descubrimiento de compuestos bioactivos con ligandos selectivos capaces de influir en las vías relacionadas con los programas carcinogénicos (Clardy y Walsh, 2004). Mediante análisis bioinformáticos y genómicos realizados por diversas instituciones, tales como el *Broad Institute*, se ha demostrado que dichos productos tienden a regular genes y proteínas, así como un gran número de interacciones proteína-proteína que son particularmente esenciales para el organismo (Dancik *et al.*, 2010). El estudio de genes y transcritos mediante el uso de las nuevas tecnologías genómicas ha revolucionado no sólo el estudio de la biología del cáncer, sino también aquél sobre la actividad de los productos naturales proporcionando una visión global sobre su posible impacto en la biología de los tumores.

Considerando que la expresión génica es fundamental para las células, tanto normales como tumorales, el estudio de los reguladores transcripcionales y post-transcripcionales es de suma importancia para comprender las alteraciones en los patrones de expresión de las células tumorales (Li *et al.*, 2009). Uno de los reguladores post-transcripcionales de los ARN mensajeros son los miARNs, los cuales potencialmente también pueden ser regulados por los productos naturales. Diversos estudios genómicos con microarreglos han reportado que los tratamientos con agentes naturales en modelos *in vitro* e *in vivo* modulan la expresión de los miARNs y con ello la señalización celular (Tabla 3). El uso combinado de agentes naturales con efecto sobre los miARNs y los quimioterapéuticos convencionales podrían brindar nuevas aproximaciones para el tratamiento del cáncer (Li *et al.*, 2010).

Tabla 2. Actividad antitumoral de algunos extractos de hongos. Modificada de Popovic *et al.* (2013).

Especie	Tipo de extracto	Tipo de cáncer/ línea celular	Mecanismo de acción
<i>Amauroderma rude</i>	Extracto de agua caliente	Líneas celulares de cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción de apoptosis
<i>Antrodia camphorata</i>	Extracto de agua fría	Líneas celulares de cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición del crecimiento celular • Inducción de apoptosis a través de la inducción de ROS • Reducción de HER-2/neu • Disrupción de la vía de señalización PI3K/Akt
<i>Antrodia cinnamomea</i>	Extracto etanólico	Células de leucemia murina	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición de la proliferación y migración de células WEHI-3 • Reducción de la expresión de la proteína MMP-9
<i>Clitocybe alexandri</i>	Extracto etanólico	Cáncer de pulmón	<ul style="list-style-type: none"> • Arresto del ciclo celular en fase S
<i>Ganoderma lucidum</i>	Extracto disponible comercialmente Reishi-Max GLpTM	Xenógrafos murinos de células de cáncer de mama inflamatorio (IBC)	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción en la expresión a nivel de genes y proteínas de moléculas importantes en la vía de señalización PI3K / Akt / mTOR y MAPK
<i>Hericium erinaceus</i>	Extracto de etanol 50%	Carcinoma de colón	<ul style="list-style-type: none"> • Supresión de la activación de ERK y JNK • Inhibición de metástasis de pulmón <i>in vivo</i>
<i>Suillus collinitus</i>	Extracto metanólico	Cáncer de mama	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento en la expresión de p53 • Inducción de apoptosis

Tabla 3. Expresión de miARNs modulados por compuestos bioactivos de productos naturales en cáncer.

Productos naturales	Tipo de cáncer	miRNA sobre-expresados	miRNA sub-expresados	Referencia
Curcumina	Línea celular de cáncer pancreático	Mir-22, 34a, 24, 181a, 181b, 21, 27a	miR-199, 510, 196a, 7, 15b, 195, 374, 98	Sun <i>et al.</i> (2008)
I3C, DIM	Cáncer pancreático	miR-200b, 200c, let-7b, let-7d, let-7e, 663, 638, 122, 149	miR-21, 31, 130a, 156b, 377, 20b, 654, 34c	Li <i>et al.</i> (2009)
Isoflavonoides	Cáncer pancreático y pulmón	miR-200b, 200c, let7b, let-7c, let7-d, 663, 146a, 374b	miR-34c, 376a, 96a, 320, 654, 34c, 196	Li <i>et al.</i> (2009); Melkamu <i>et al.</i> (2009)
Resveratrol, vitamina E, folatos y retinoides	Diferentes tipos de cáncer	miR-10a, 10b, 9, 145, 30a-3p, 152, 122a, 125b	Mir-200a, 496, 296, 30e-5p, 362, 339, 29c, 154, 10a	Davis y Ross (2008)

En otro nivel celular, los programas epigenéticos, tales como la metilación del ADN [adición covalente del grupo metilo al carbón 5 de la citosinas, ocurriendo generalmente en un contexto de secuencia de citosina seguida por guanina; Lister *et al.* (2009)], ésta se encuentra alterada en cáncer asociándose con patrones globales de sub-expresión de genes supresores tumorales, sobre-expresión regionalizada y específica de oncogenes, así como con la inestabilidad cromosómica característica de las células tumorales (Fang *et al.*, 2007; Pogribny y Beland, 2009). Diversos estudios han definido que la metilación del ADN puede ser influenciada por diversos productos naturales, tal como se muestra en la Tabla 4 (Ross, 2007; Gilbert y Liu, 2010).

Otro mecanismo epigenético que puede modularse por los compuestos bioactivos de productos naturales es la modificación de histonas, representada por los cambios post-traduccionales que sufren las histonas en su extremo N-terminal, las cuales determinan la unión del ADN a los nucleosomas (unidad de compactamiento del ADN). Las más comunes son la acetilación o la metilación, las cuales favorecen o inhiben la expresión génica (Tan *et al.*, 2011). Diversos compuestos bioactivos provenientes de los hongos han mostrado efectos importantes sobre estos mecanismos epigenéticos, revirtiendo alteraciones epigenéticas en diferentes modelos celulares tumorales y contribuyendo a restablecer los programas de muerte, proliferación y migración celular. La Tabla 4 describe diversos compuestos bioactivos obtenidos de productos naturales con actividad epigenética (Kok *et al.*, 2012).

Tabla 4. Efectos epigenéticos de los compuestos bioactivos derivados de productos naturales.

Fuente	Compuesto	Cáncer	Mecanismo epigenético	Actividad	Referencia
Té verde	EGCG	Esófago, colon, próstata y cáncer de mama	Desmetilación de genes supresores de tumor	Re-expresión de genes supresores de tumor después de tratamiento prolongando con las biomoléculas	Fang <i>et al.</i> (2003)
Soya	Genisteína	Esófago	Desmetilación de genes supresores de tumor y acetilación de histonas	Re-expresión de genes supresores de tumor e incremento de la acetilación de las histonas 3 y 4, favoreciendo la expresión de genes supresores de tumor	Basak <i>et al.</i> (2008), Fang <i>et al.</i> (2005), Majid <i>et al.</i> (2008)
-	Folatos	Colon	Metilación de DNA	Modula el estado de metilación del ADN	Duthie (2011)
-	Sulforanos	Próstata, riñón y colón	Acetilación de histonas	Incrementa la acetilación de histona 4 promoviendo transcripción de genes supresores de tumor	Myzak <i>et al.</i> (2006a-b)
-	Isotiocianatos	Próstata	Acetilación de histonas	Permite la acetilación de histonas y la modificación selectiva de remodeladores de la cromatina	Wang <i>et al.</i> (2007, 2008)

Todo lo anterior indica que la actividad de los compuestos bioactivos derivados de los productos naturales tiene un efecto celular global sobre distintos mecanismos metabólicos, por lo que sus abordajes de investigación deben dirigirse a caracterizar de forma integral los procesos biológicos que regulan. Uno de los abordajes de estudio que ha revolucionado y facilitado el entendimiento de las propiedades y mecanismos de acción de los productos naturales de origen vegetal y fúngico es la genómica.

IV. Las propiedades anticancerígenas de los hongos comestibles, funcionales y medicinales

Como lo sintetizaron Martínez-Carrera *et al.* (2012), las propiedades de los hongos comestibles pueden concentrarse mediante extractos acuosos y alcohólicos, a través de los cuales pueden purificarse y obtenerse diversos compuestos bioactivos de alto peso molecular, tales como polisacáridos, glicoproteínas, α -glucanos, β -glucanos, heteroglicanos, proteoglicanos, proteoheteroglicanos, polisacaropéptidos, terpenoides, y proteínas fúngicas inmunomoduladoras. Se ha demostrado ampliamente que estas macromoléculas bioactivas purificadas tienen propiedades funcionales sin efectos secundarios adversos (Sullivan *et al.*, 2006), y que pueden incluso modificarse químicamente para mejorarlas (Wasser, 2002). Esto se ha logrado empleando diversos sistemas modelo *in vitro* e *in vivo* y desarrollando medicamentos específicos. Sólo por citar algunos ejemplos, algunos medicamentos patentados y avalados por el gobierno de Japón y la FDA en E.U.A. para combatir y/o tratar el cáncer, así como potenciar el sistema inmunológico humano incluyen: Lentinan [β -D-glucano, $(C_6H_{10}O_5)_n$, aislado de *Lentinula edodes*]; Krestin [PSK/PSP, complejo β -glucano-proteína, aislado de *Coriolus versicolor*]; Schizophyllan [β -glucano, aislado de *Schizophyllum commune*]; Flo-a-b (complejo proteína-polisacárido, aislado de *Agaricus blazei*); Flamulina (proteína aislada de *Flammulina velutipes*); GLP(AI) (heteropolisacárido aislado de *Ganoderma lucidum*); Ganoderan (glicoproteína aislada de *G. lucidum*); y la Fracción-MD [(1-6)- β -D-glucano con cadenas laterales, aislado de *Grifola frondosa*] (Mayell, 2001; Lindequist *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Firenzuoli *et al.*, 2008; Cheng y Leung, 2008; Sliva *et al.*, 2008). Diversas investigaciones clínicas y experimentales han demostrado su capacidad para prevenir (31-83 %), inhibir (73-97.5 %), o incluso revertir (22-77 %) la formación de tumores en modelos utilizados en medicina (Mizuno, 1995; Grube *et al.*, 2001). También tienen enorme capacidad para prevenir cánceres inducidos viralmente o químicamente, así como la metástasis cancerosa, mediante la activación del sistema inmunológico (Borchers *et al.*, 2004, 2008; Wasser y Weis, 1999a-b; Volman *et al.*, 2010). Paralelamente, se han demostrado efectos regenerativos de los compuestos bioactivos mencionados a nivel celular, aliviando efectos secundarios derivados de los tratamientos convencionales contra el cáncer (Chang y Miles, 2004). Por ello constituyen una excelente alternativa procedente de productos naturales para la recuperación de pacientes que reciben tratamientos de quimioterapia, radioterapia, y cirugías mayores. Se han estudiado

los siguientes efectos regenerativos: 1) Incremento del número de leucocitos en sangre; 2) Recuperación de las funciones del sistema inmunológico del organismo; 3) Recuperación del apetito; 4) Reducción del dolor; 5) Efectos antieméticos; y 6) Detención de la caída del pelo (Chang y Miles, 2004).

En general, los principales mecanismos de acción de las macromoléculas con propiedades medicinales de los hongos comestibles consisten en activar, estimular y reforzar el sistema inmunológico del organismo humano, y por ello se les conoce como modificadores de respuesta biológica (MRB). De esta forma, son capaces de proteger células sanas evitando su conversión a cancerosas, de prevenir la metástasis, y de inhibir y/o detener la formación de tumores. Diversas evidencias científicas han demostrado las propiedades anticarcinogénicas de los compuestos bioactivos derivados de los hongos comestibles, determinando su capacidad para prevenir la oncogénesis y la metástasis mediante la estimulación de subgrupos de las células-T, las células asesinas naturales (*natural killer cells: NK cells*), y los números y/o funciones del sistema inmunológico humano dependiente de los macrófagos (maduración, diferenciación, proliferación), dando lugar a la producción de citocinas, tales como interleucinas (ILs), factor alfa de necrosis tumoral [(TNF)- α], y gama-interferón [(INF)- γ]. Los datos científicos indican que la modulación del sistema inmunológico promovida por los hongos y sus compuestos bioactivos influye de diversas maneras en las etapas de iniciación, promoción, y evolución de la carcinogénesis (Ooi y Liu, 2000; Chang y Miles, 2004; Mizuno, 1999; Wasser, 2002; Lull *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Cheung, 2008; Roupas *et al.*, 2012). Datos epidemiológicos desarrollados en Japón indicaron que el consumo de hongos comestibles está asociado a tasas inferiores de muerte por cáncer, al compararse con el valor promedio nacional de ese país (Mizuno, 1995; Mizuno *et al.*, 1995).

V. Recursos genéticos nativos de *Ganoderma lucidum* como modelo de estudio

Identificación molecular

La taxonomía del género *Ganoderma* todavía no está claramente definida por su aparente naturaleza polifilética (Moncalvo *et al.*, 1995; Hong y Jung, 2004; Wang y Yao, 2005), sin embargo, el análisis de las secuencias de la región ITS del ADNr de los recursos genéticos nativos ha permitido identificar tres sublinajes de *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. *sensu lato* en México (Morales *et al.*, 2010). Asimismo, un segundo linaje incluye cinco cepas de *Ganoderma* sp. que muestran distancia genética con respecto a las especies más cercanas, tales como *G. australe* (Fr.) Pat., *G. gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat., *G. lobatum* (Schwein.) G. F. Atk., *G. pfeifferi* Bres., *G. resinaceum* Boud., *G. tornatum* (Pers.) Bres., y *G. tsugae* Murrill. Los recursos genéticos nativos de *Ganoderma* son relevantes en virtud de su amplia distancia genética con respecto a las especies descritas del sureste de Asia (Figura 2), por lo que sus compuestos bioactivos pueden ser una

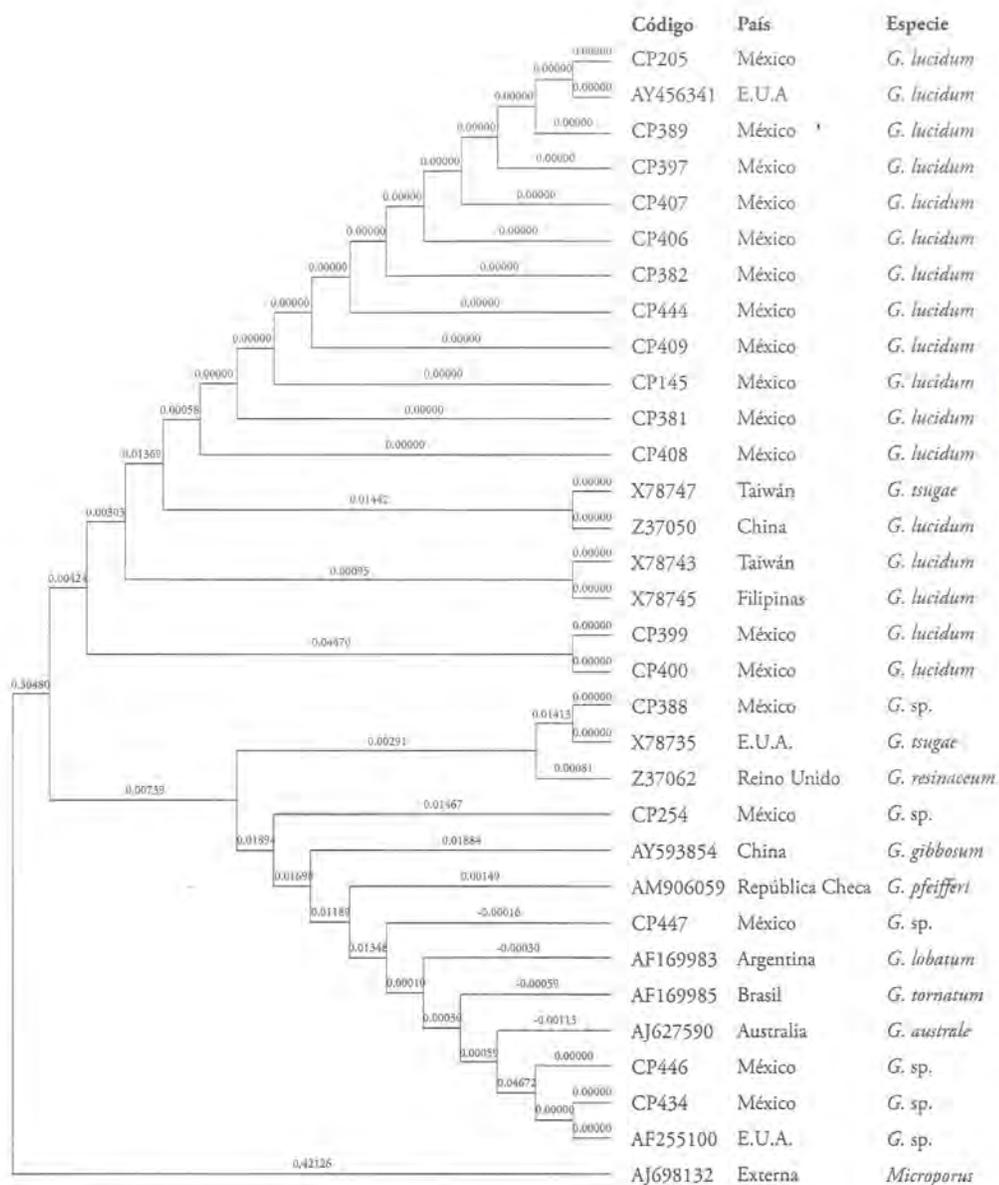


Figura 2. Identificación molecular de la cepa CP-145 de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., empleada en la presente investigación (flecha). El dendrograma muestra los recursos genéticos nativos de *Ganoderma* que se desarrollan en diferentes regiones geográficas de México (Morales *et al.*, 2010). Se deriva de una matriz generada en el programa MEGA4, por el método *Neighbor-Joining* (Tamura *et al.*, 2007), empleando secuencias de la región ITS-ADNr y *Microporus* como grupo externo. Las especies de *Ganoderma* corresponden a aquellas reconocidas por Moncalvo *et al.* (1995), Gottlieb *et al.* (2000), y Wang y Yao (2005), principalmente. El código de las cepas equivale a la clave de la Unidad de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGEN-HCFM), del CP, *Campus* Puebla, o al número de acceso en el *European Bioinformatic Institute*, Inglaterra (EBI; www.ebi.ac.uk). Todas las secuencias del ADN están registradas en la base de datos del CREGEN-HCFM.

fuente de novedosas propiedades funcionales y medicinales con relevancia para la salud. En esta investigación se estudió la cepa CP-145 de *G. lucidum*, nativa de México, la cual está depositada en la Unidad de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales del CP (CREGEN-HCFM).

Cultivo y obtención de basidiocarpos, bajo condiciones axénicas y controladas

En la Figura 3 se muestra el proceso biotecnológico desarrollado para la producción orgánica intensiva del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y sus productos, conocido comúnmente como “repisas” en las zonas rurales de México. Los basidiocarpos de la cepa CP-145 de *G. lucidum* se obtuvieron cultivando la cepa en laboratorio y módulo experimental. En el laboratorio, el micelio de la cepa se creció y resembró axénicamente en medio de cultivo de agar con dextrosa y papa a 25°C. Posteriormente, se preparó la “semilla” empleando granos de trigo estériles con un contenido de humedad del 60-70 %. Paralelamente, se preparó un sustrato de crecimiento con base en aserrín de encino que permite la producción intensiva de *G. lucidum* a bajo costo. El contenido de humedad del sustrato tiene un rango de 55-65 %. El sustrato se introduce en bolsas de polipropileno y se esteriliza a 121°C por 1.5 h. Las bolsas con aserrín estéril (ca. 2 kg peso húmedo) se inoculan con la “semilla” de *G. lucidum*, preparada en condiciones asépticas. Las bolsas inoculadas se trasladan a cuartos de incubación (25°-30°C) para favorecer el desarrollo del micelio en el sustrato estéril. Después de 80-120 días, el sustrato colonizado se somete a condiciones de fructificación con mayor humedad (60-80 %) y ventilación. Los basidiocarpos



Figura 3. Proceso biotecnológico general desarrollado para la producción orgánica intensiva de los recursos genéticos nativos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* (“repisas”) y sus productos, el cual es escalable a nivel comercial.

maduros del *G. lucidum* están listos para cosecharse 10-15 días después, dependiendo de las condiciones ambientales. La fructificación puede inducirse en 2 o 3 ocasiones por unidad de producción. El escalamiento del proceso biotecnológico desarrollado requiere de un costo inicial de inversión en infraestructura, ya que se utiliza un sistema de esterilización a gran escala y área estéril para la inoculación del sustrato.

Obtención de extractos estandarizados con compuestos bioactivos

Los basidiocarpos maduros producidos por *G. lucidum* (Figura 4), se cosechan y se deshidratan para la obtención de los extractos estandarizados siguiendo la metodología patentada por Martínez-Carrera *et al.* (2009). Previamente a la utilización de los extractos, se determina su control de calidad con pruebas microbiológicas, espectrofotométricas, y caracterización físico-química.

VI. Estudio de las propiedades anticancerígenas de los hongos comestibles, funcionales y medicinales

A. El cáncer de mama: descifrando el perfil del problema a través de la genómica

El cáncer de mama es una enfermedad que surge por la acumulación de alteraciones en el genoma de las células que componen la glándula mamaria, permitiendo la división celular descontrolada



Figura 4. Aprovechamiento de los recursos genéticos nativos y producción orgánica intensiva de *Ganoderma lucidum*, empleando sustratos estériles, en el módulo experimental de producción de hongos comestibles, funcionales y medicinales del *Campus* Puebla, CP.

hasta formar un tumor que puede invadir otros tejidos (Hanahan y Weinberg, 2011). A pesar del gran esfuerzo que se ha llevado a cabo en las últimas décadas para mejorar los métodos de detección y tratamiento, hoy en día el cáncer de mama representa un grave problema de salud pública con más de un millón de nuevos casos diagnosticados y alrededor de 548 000 muertes por esta patología cada año en el mundo (Ferlay *et al.*, 2012).

En años recientes y con los notables avances científicos, ha sido posible entender mejor las bases moleculares del cáncer de mama a través del uso de tecnologías de alto rendimiento, tales como los microarreglos o más recientemente la secuenciación masiva de nueva generación (Pleasance *et al.*, 2010; Stratton *et al.*, 2009). Estas tecnologías no sólo han impactado en el entendimiento de la biología básica de la carcinogénesis mamaria, sino que también han permitido traducir los hallazgos de la investigación básica en pruebas y herramientas con aplicación clínica. De esta forma, hoy en día, las pruebas genómicas permiten calcular con una alta confiabilidad el riesgo personalizado de presentar una recaída o metástasis, lo cual evidentemente impacta en el tratamiento y calidad de vida de la paciente. También a partir de perfiles moleculares del ARN mensajero se ha logrado clasificar a los tumores y desarrollar nuevos fármacos dirigidos para bloquear la acción específica de genes mutados, desarrollando, por ejemplo, inhibidores de tirosinas cinasas o anticuerpos dirigidos (Arteaga, 2013). La genómica es en esencia el uso de todo este potencial tecnológico para comprender las alteraciones de los tumores. En otras palabras, la genómica estudia la secuencia de letras que conforman nuestro ADN, así como sus cambios y las posibles consecuencias de las modificaciones que pueden derivar en tumores. Al analizar en retrospectiva el papel de la genómica en el entendimiento de las patologías, podemos concluir que una de las áreas de la biomedicina que más se ha beneficiado con estas nuevas tecnologías ha sido precisamente la oncología (Figura 5).

En el 2004, después la secuenciación del genoma humano, se inició el esfuerzo internacional del “Proyecto del Genoma del Cáncer Humano”. Tras una década de su inicio, se ha obtenido un mejor entendimiento de las bases moleculares del cáncer y del conocimiento de las alteraciones genómicas presentes en diversos tumores, así como de las mutaciones, la identificación de las vías celulares y metabólicas que se alteran en el cáncer, la identificación de blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos, y una mejor clasificación molecular de los tumores. La genómica también ha impactado de manera importante en el entendimiento de aquellos factores que contribuyen a la respuesta al tratamiento mediante la farmacogenómica. Esta disciplina identifica los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos regulados en gran medida por la genética (Emilien *et al.*, 2000). La farmacogenómica podría convertirse en una herramienta clave para establecer esquemas de dosis con una mayor eficacia terapéutica.

La caracterización profunda del genoma de los tumores ha tenido un profundo impacto en nuestro entendimiento acerca de las bases moleculares de la carcinogénesis. El uso de productos naturales, tales como los compuestos bioactivos de los hongos comestibles, funcionales

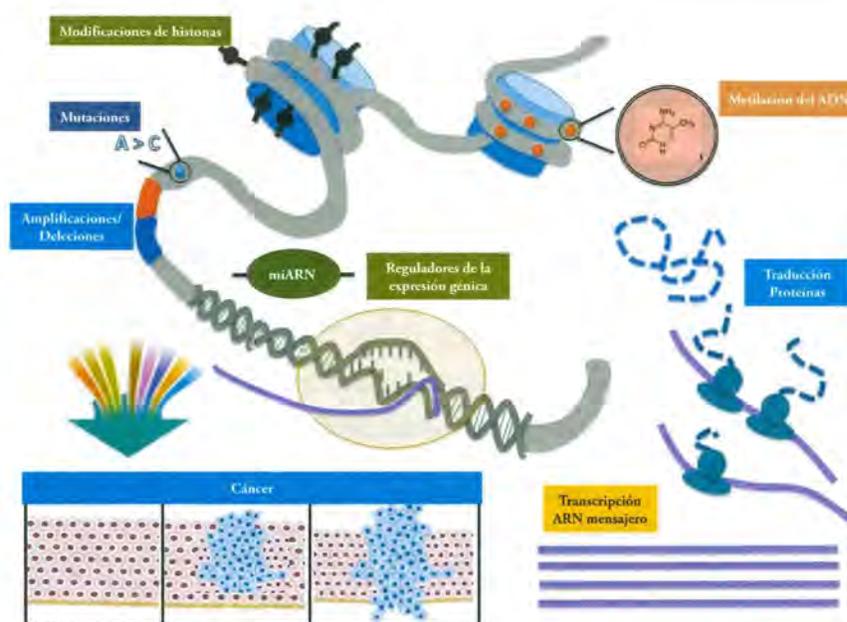


Figura 5. Diferentes niveles de análisis molecular desarrollados por las tecnologías genómicas en el estudio del cáncer.

y medicinales, para el tratamiento y prevención del cáncer no ha escapado a los impactos y beneficios que la genómica ha generado, iniciándose una nueva era del conocimiento donde las propiedades de la naturaleza se conjuntan con los avances tecnológicos para generar innovaciones de alto impacto en la salud humana.

B. Abordaje experimental y avances en *Ganoderma lucidum*

Esta especie ha sido utilizada ancestralmente para la cura y el tratamiento de distintas enfermedades, tales como el cáncer (Yun, 1999; Wasser, 2005). Diversos compuestos bioactivos aislados de esta especie han demostrado efectos antioxidantes, antihipertensivos y anticancerígenos debido a su alto contenido de polisacáridos de alto peso molecular, triterpenos, alcaloides, enzimas y proteínas (Gaoa y Zhou, 2003). Aunque se han registrado extractos de *G. lucidum* con efecto en rutas celulares tumorales específicas, a la fecha no existen análisis a profundidad con abordajes genómicos del transcriptoma de células de cáncer de mama. Por ello, en la presente investigación propusimos entender los mecanismos moleculares que modulan los extractos estandarizados y patentados de *G. lucidum* (CP-145), cuya composición química y propiedades generales fueron descritas por Martínez-Carrera *et al.* (2009, 2010, 2015), mediante tecnologías genómicas en una línea triple negativa de cáncer de mama (MDA-MB-468). Se trata de un tipo de cáncer cuyo único tratamiento disponible hoy en día es la quimioterapia. Este abordaje permitió dilucidar las rutas celulares que se ven afectadas tras la exposición *in vitro* de las células tumorales a los extractos estandarizados de *G. lucidum*, las cuales han sido validadas mediante análisis funcionales

concretos (Figura 6). Conocer cómo los compuestos bioactivos de *G. lucidum* pueden modular la expresión de ARNm con propiedades supresoras tumorales u oncogénicas, así como su impacto sobre la expresión de miARNs, es importante para generar una caracterización biológica completa de su potencial actividad anticancerígena.

Los resultados obtenidos de la tecnología de microarreglos del ADN demostraron que los extractos de *G. lucidum* alteran los perfiles de expresión génica de las células cancerígenas en rutas específicas como proliferación, migración y apoptosis. En la Figura 7 puede apreciarse un incremento de la apoptosis celular superior al 300 %, inducida por los extractos estandarizados de *G. lucidum*. Mediante ensayos funcionales se corroboró que los extractos tienen un efecto en rutas con actividad anticancerígena observando una disminución significativa en la proliferación y migración celular, así como un aumento en la activación de los programas de muerte celular programada.

Con esta investigación se demostró que los compuestos bioactivos contenidos en los extractos estandarizados de *G. lucidum* actúan directamente a nivel génico modulando vías transcripcionales específicas, las cuales se ven mayormente afectadas en patologías como el cáncer.

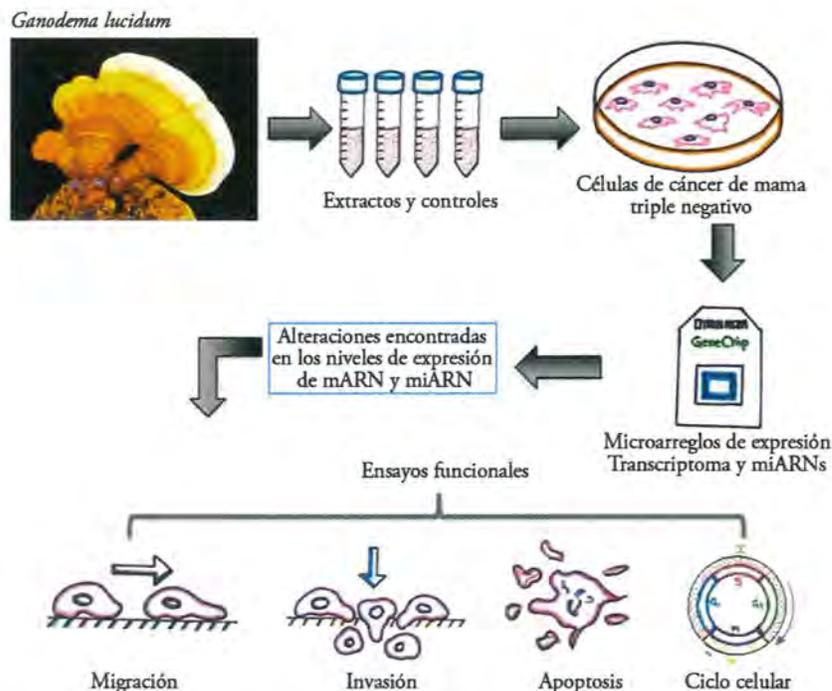


Figura 6. Abordaje metodológico para el análisis genómico de las propiedades anticancerígenas de *Ganoderma lucidum* en una línea triple negativa de cáncer de mama (MDA-MB-468). Se han identificado las principales vías celulares afectadas por el tratamiento *in vitro* de las células tumorales con los extractos fúngicos patentados.

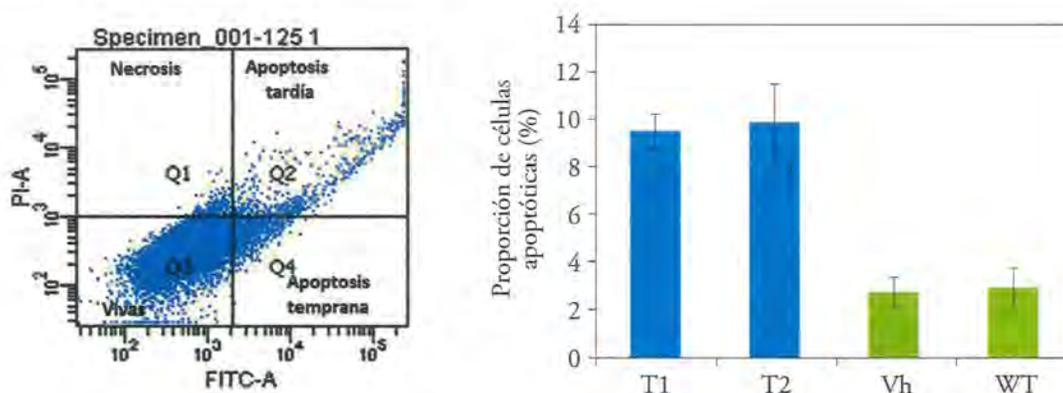


Figura 7. Inducción de apoptosis en una línea celular triple negativa de cáncer de mama (MDA-MB-468), a las 48 h, por extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* (T1: 0.31mg/ml; T2: 0.625 mg/ml), en comparación con el vehículo utilizado (Vh: alcohol 35%) y las células control sin tratamiento (WT). Se utilizó el método de análisis de Anexina V por citometría de flujo.

En la Figura 8, se presenta el efecto de los extractos de *G. lucidum* induciendo una expresión diferencial de genes a diferentes niveles del genoma de una línea triple negativa de cáncer de mama (MDA-MB-468). Los dos extractos estudiados tuvieron efecto sobre la expresión de diferentes genes y redes funcionales (Figura 9), las cuales permitieron identificar a las cinco redes biológicas más importantes, tales como aquellas asociadas al movimiento, muerte y sobrevivencia celular; al cáncer, la señalización y la morfología celular; y al sistema inmunológico y la respuesta inflamatoria (Peña *et al.*, 2015).

VII. Perspectivas

El cáncer de mama es un problema de salud pública en México, ya que su incidencia se ha incrementado en la última década afectando a 15 de cada 100 000 mujeres (Chavarri-Guerra *et al.*, 2014). De hecho, constituye la principal causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres mexicanas, porque la relación mortalidad/incidencia es muy alta (37 %). Sin embargo, México cuenta con una gran diversidad de recursos genéticos de hongos comestibles, funcionales y medicinales, los cuales representan una valiosa fuente de compuestos bioactivos. Se tienen las tecnologías e innovaciones para producirlos, extraerlos, concentrarlos, y purificarlos de manera estandarizada. Asimismo, con las herramientas y tecnologías genómicas ahora disponibles en el país, se abre una brecha importante en la búsqueda de novedosos agentes terapéuticos contra el cáncer de mama a partir de los hongos comestibles, funcionales y medicinales. La genómica también aportará evidencias fundamentales para entender sus mecanismos de acción a nivel molecular, establecer las dosis recomendadas por genética personalizada, y evaluar los efectos potenciales de los compuestos bioactivos. Al complementar estas investigaciones en líneas celulares con estudios en modelos animales y pruebas clínicas será posible establecer estrategias

más eficientes para la prevención y tratamiento del cáncer de mama con enormes repercusiones sociales y económicas para el país.

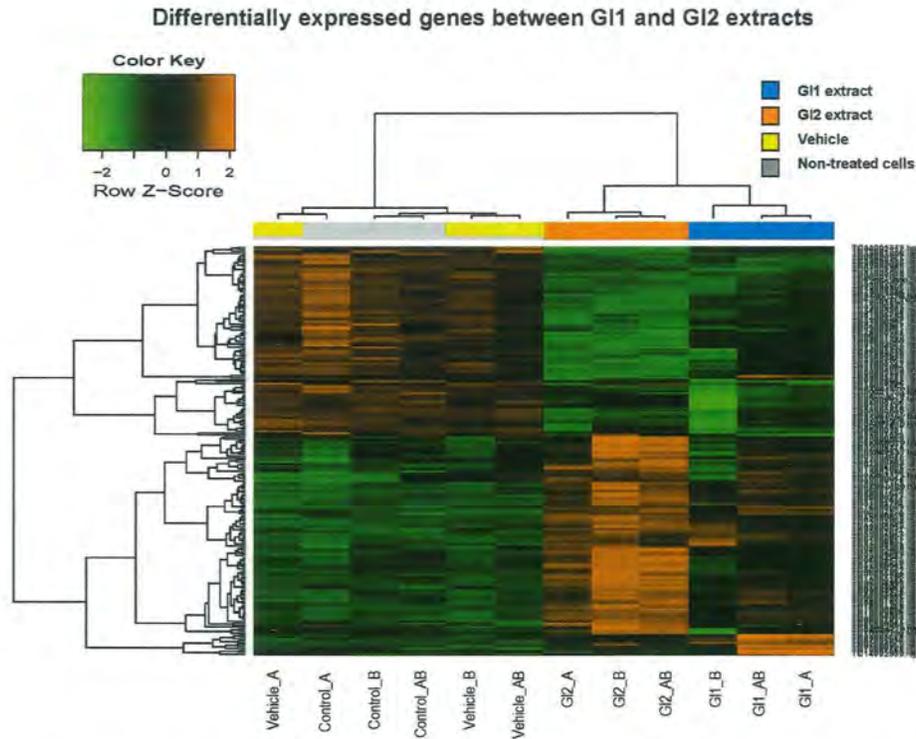


Figura 8. Mapa de calor del análisis de expresión diferencial de genes en una línea celular triple negativa de cáncer de mama (MDA-MB-468), a las 48 h, tratada con extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* [G11 (T1): 0.34 mg/ml; G12 (T2): 0.7 mg/ml], en comparación con el vehículo utilizado (alcohol por volumen) y el control de células no tratadas. Nótese la baja expresión de la mayor parte de los genes estudiados derivada del tratamiento con los extractos de *G. lucidum* (color verde), en contraste con los altos niveles de expresión correspondientes observados en el tratamiento con el vehículo y el control (color rojo). El estudio de la expresión diferencial de genes se realizó con la tecnología de microarreglos del ADN, empleando el *Genechip Human Array 2.0* (Affymetrix) para la evaluación del transcriptoma y los miARNs, involucrando un total de 44,699 genes y 245,349 transcritos analizados a través del *R Software* y la *Ingenuity Pathway Analysis tool* (IPA).

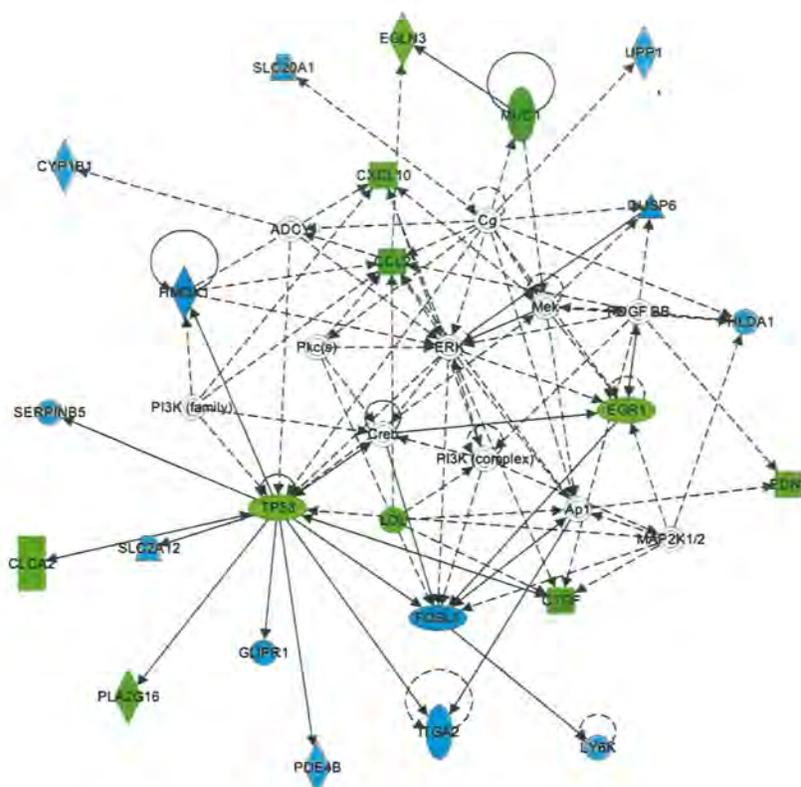


Figura 9. Red funcional de genes asociada principalmente al movimiento, muerte y sobrevivencia celular, generada por el análisis genómico de una línea celular triple negativa de cáncer de mama (MDA-MB-468), a las 48 h, tratada con el extracto estandarizado *G12* (T2) [0.7 mg/ml] de *Ganoderma lucidum*. El estudio de la expresión diferencial de genes se realizó con la tecnología de microarreglos del ADN, empleando el *Genechip Human Array 2.0* (Affymetrix) para la evaluación del transcriptoma y los miARNs, involucrando un total de 44,699 genes y 245,349 transcritos analizados principalmente a través del *R Software* y la *Ingenuity Pathway Analysis tool* (IPA).

Literatura citada

- Arteaga, C. L. 2013. Progress in breast cancer: overview. *Clinical Cancer Research* 19(23):6353-6359.
- Basak, S., D. Pookot, E. Noonan & R. Dahiya. 2008. Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(10):3195-3202.
- Basmadjian, C., Q. Zhao, E. Bentouhami, A. Djehal, C. G. Nebigil, R. A. Johnson, M. Serova, A. de Gramont, S. Faivre, E. Raymond & L. G. Désaubry. 2014. Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in Chemistry* 2:20.
- Borchers, A. T., A. Krishnamurthy, C. L. Keen, F. J. Meyers & M. E. Gershwin. 2008. The immunobiology of mushrooms. *Experimental Biology and Medicine* 233:259-276.

ANEXO E – ACTIVIDADES EXTRA

CONGRESO - UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE HONG KONG

Asistencia al congreso International Symposium on “Frontiers in Cancer Biology and Drug Development” ISCBDD en la Universidad Politécnica de Hong Kong, HK y presentación de poster con el título “*Gene expression profiles of triple negative breast cancer cells treated with a standardized extract of Mexican strain of Ganoderma lucidum*”, Marzo 2015.

ABSTRACT

Gene expression profiles of triple negative breast cancer cells treated with a standardized extract of a Mexican strain of *Ganoderma lucidum*

Monica Peña-Luna^{1,2}, Sandra Romero-Cordoba¹, Porfirio Morales³, Mercedes Sobal³, Helios Escudero³, Alfredo Hidalgo-Miranda¹, Daniel Martinez-Carrera³

¹Laboratorio de Genómica del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Secretaría de Salud, México. ² Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. ³Colegio de Postgraduados (CP), Campus Puebla, Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, Puebla, México.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the lack of expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor-type 2 (HER-2). The only systemic treatment currently available for this type of tumors is the chemotherapy. *Ganoderma lucidum* is a mushroom that has been used in Asia since ancient times to treat different diseases. Studies of the physiological effect of extracts obtained from the Asian *G. lucidum* strain have shown antioxidant, antihypertensive and anticancer properties. However, these effects have not been evaluated in strains from other geographical regions and most of the molecular and genomic mechanisms of its biological activity on cancer cells have not been fully elucidated. We evaluated the effect of two standardized extracts (*G1* and *G2*), obtained from a Mexican strain of *G. lucidum* on the global gene expression profiles of TNBC cells (MDA-MB-468). After 24 and 48 h of treatment with the extracts, a 50% reduction of cell viability was obtained using 0.34 mg/ml of the *G1* and 0.7 mg/ml of *G2* extracts. To analyze the genomic mechanisms implicated in the reduction of cell viability we determined the changes in gene expression patterns in the treated cells compared to non-treated cells. Identification of differentially expressed genes was carried out using the R software. Pathway analyses were performed with the DAVID tool. Results showed that *G1* altered the expression of 86 genes while *G2* altered 143 genes, of which 25 genes were shared by *G1* and *G2*. *G1* regulated genes related to immunity, homeostasis and cellular adhesion; while *G2* regulated genes related to extracellular matrix, enzymatic inhibitors, and hormone synthesis, among others. These data showed the great potential of natural bioactive

compounds from Mexican genetic resources of *G. lucidum*, as well as their effect on biological pathways and oncogenic processes of TNBC cells.



ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN – UNIVERSIDAD DE MISSOURI

Resumen

El 3,3'-Diindolilmetano mejor conocido como DIM, es un compuesto natural derivado de la digestión de Indole-3-carabíinol que es encontrado en vegetales crucíferos como el brócoli, la coliflor o la col. Actualmente se sabe que este compuesto posee propiedades antineoplásicas especialmente en cáncer de mama y próstata. Durante mi estancia en el Centro para los Estudios de las Interacciones Botánicas de la Universidad de Missouri bajo la dirección del Dr. Dennis B. Lubahn realicé estudios *in vitro* e *in vivo* para conocer más sobre las propiedades que tiene este compuesto en modelos de cáncer.

Durante el proyecto fui capacitada en el mantenimiento y la capacitación de ratones de diferentes cepas, proceso que incluye desde la selección de los ratones reproductores para la obtención de crías knock-out de genes de interés, el destete de las crías, el marcado, la diferenciación entre machos y hembras, la genotipificación, manipulación diaria, diversas técnicas de inyección así como el proceso para realizar una necropsia adecuada de los especímenes. También recibí capacitación en el uso, adquisición y desecho de material radioactivo para el marcaje de los compuestos en ensayos de unión a proteínas en modelos *in vitro* de acuerdo a los estatutos oficiales de manipulación de material radioactivo de la Universidad de Missouri, del estado de Missouri. Realicé diferentes ensayos *in vitro* utilizando DIM y otros compuestos que funcionan como ligandos, agonistas o antagonistas, del receptor de estrógenos. Con el fin de conocer las interacciones del DIM al receptor de estrógenos se utilizó la línea celular humana U2SO de osteosarcoma la cual carece inherentemente de receptor de estrógenos alfa y beta, con el fin de realizar ensayos de luciferasa. También se realizaron ensayos de unión radioactivo del compuesto DIM y de estradiol (E2) así como de agonistas y antagonistas del receptor de estrógenos ER con el objetivo de entender las interacciones que tiene este receptor a nivel biológico y molecular.

También me uní al estudio en modelos murinos para determinar las propiedades que tiene el compuesto DIM en ratones machos de la cepa TRAMP los cuales son modelos de cáncer de próstata. El objetivo del estudio es añadir 4 diferentes concentraciones de DIM (incluyendo el control) a la dieta normal de los ratones con el fin de monitorear el desarrollo de los tumores de próstata. Al finalizar el periodo de prueba los ratones son sacrificados y se recolectan algunos órganos como el corazón, páncreas, riñones, cerebro, testículos, gasa testicular así como del tumor con el fin de obtener su peso e indicios histopatológicos que revelen características del

funcionamiento del DIM. De este estudio central se desprendió otro estudio tanto en machos como hembras de las cepas FBV y C57 con el fin de comprobar el efecto del DIM en el peso de los. Para ello se alimentó al grupo control con dieta baja en grasa y al grupo de prueba con la misma dieta adicionada con 1% de DIM durante 3 semanas, periodo en el que se monitoreó su peso diariamente. Finalizando el periodo de prueba se alimentó tanto al grupo control como al de prueba con el alimento control. La segunda etapa del estudio consistió en la inyección intraperitoneal (IP) de DIM disuelto en aceite de maíz tres veces por semana para el grupo de prueba y para el grupo control la IP únicamente del aceite de maíz. El peso de los ratones se monitoreó 3 veces por semana antes de realizar la inyección.



UNIVERSITY OF MISSOURI-COLUMBIA

Departments of Biochemistry and Child Health

School of Medicine and College of Agriculture,
Food and Natural Resources

110A Animal Sciences Research Center
Columbia, Missouri 65211
Telephone (573) 884-6781
FAX (573) 882-6827
E-mail: LubahnD@missouri.edu

Information of invited

Name: Mónica Peña Luna
Gender: Female
Date of Birth: 21 August 1990
Passport Number: G13987613
CVU: 630757
Fellow record: 330482

May 15, 2015

Dear Miss Mónica Peña Luna,

On behalf of the University of Missouri Center for Botanical Interaction Studies, I would like to extend an invitation for you to join us as a visiting student researcher with Professor Dennis B. Lubahn research group for a period of three months beginning on August 10 and ending on November 06 of this year. Please note that this invitation is contingent on approval by Academic Committee of the Graduate Program in Biological Sciences, UNAM.

Below I provide a brief description of your activities during your appointment at MU Center for Botanical Interaction Studies. As a Visiting Student Researcher, you will learn about the biochemistry and allosteric interactions of various natural estrogens, botanical/herbal compounds, and endocrine disruptors with various estrogen receptors, including ER α , ER β , GPR30/GPER, and selected alternatively spliced isoforms of these ERs. This will help provide a better understanding of the molecular mechanisms of action of compounds important in both prostate and breast cancer. A senior graduate doctoral student in my lab will work closely with you initially until you are able to work independently and collaboratively.

Visiting Student Researchers must abide by all University of Missouri policies and applicable laws.

We look forward to your arrival and trust that your participation in our research activities will be rewarding both for you and the research group as a whole.

Sincerely,

Dennis B. Lubahn, PhD
Professor, Departments of Biochemistry and Child Health
Director, MU Center for Botanical Interaction Studies