



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE MEDICINA

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

**“EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS BAX Y BCL-2 EN LINFOCITOS
HUMANOS TRATADOS CON EXTRACTOS DE AGARICUS
BLAZEI MURRILL”**

Requisito previo para optar por el Título de Médico

Autor: Villacrés Salas, Christian Sebastián

Tutora: Dra. PhD. Carrero Castillo, Yenddy Nayghit

Ambato - Ecuador

Octubre 2021

APROBACIÓN DE LA TUTORA

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación, sobre el tema:

“EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS BAX Y BCL-2 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON EXTRACTOS DE AGARICUS BLAZEI MURRILL” de Villacrés Salas Christian Sebastián, estudiante de la Carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato; considero que el presente trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a evaluación del jurado examinador designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud de Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, octubre de 2021

LA TUTORA

Dra. PhD. Carrero Castillo Yenddy Nayghit

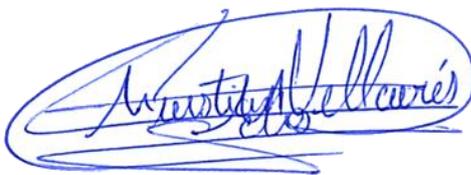
C.I.1757404577

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Trabajo de Investigación sobre:

“EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS BAX Y BCL-2 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON EXTRACTOS DE AGARICUS BLAZEI MURRILL” como también los contenidos, ideas, resultados, análisis y conclusiones emitidos en el presente trabajo de investigación son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor del presente trabajo de grado.

Ambato, octubre de 2021



Villacrés Salas Christian Sebastián

C.I. 1804855839

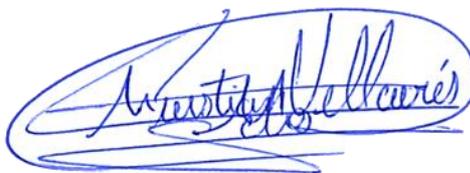
AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato para que haga de este proyecto de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación; dentro de la normativa de la Universidad Técnica de Ambato.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto de Investigación dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta producción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Ambato, octubre de 2021



Villacrés Salas Christian Sebastián

C.I. 1804855839

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe del Proyecto de Investigación, sobre el tema: **“EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS BAX Y BCL-2 EN LINFOCITOS HUMANOS TRATADOS CON EXTRACTOS DE AGARICUS BLAZEI MURRILL”** de Villacrés Salas Christian Sebastián, estudiante de la Carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, octubre de 2021

Para su constancia firman:

PRESIDENTE/A

PRIMER/A VOCAL

SEGUNDO/A VOCAL

DEDICATORIA

“Saber mucho no es lo mismo que ser inteligente. La inteligencia no es sólo información, sino también juicio para manejarla”

Carl Sagan

“Clama a mí y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tu no conoces”

Jeremías 33:3

Dedicado a mi Dios por haberme cuidado y bendecido durante toda mi carrera y también por los dones de la inteligencia y sabiduría que me han permitido convertirme en médico.

A mis padres Salomón Villacrés y Mariana Salas que me dieron la vida, inmenso amor y apoyo incondicional.

A mi hermana María Paula, mi cómplice, que me acompañó y amó desde el inicio de su vida.

A mis primas, Fernanda y Gabriela, que como hermanas han estado siempre en mi vida.

A mis abuelitos, que, a pesar de estar ausentes, siempre han estado presentes.

A toda mi familia y angelitos, gracias por todo.

Con mucho amor,

Villacrés Salas Christian Sebastián

AGRADECIMIENTO

Para empezar, me gustaría nuevamente agradecer a mi Dios, a mi Papá, Mamá, Hermana, Angelitos y demás familiares que me han apoyado y guiado durante toda mi carrera y vida.

A la Universidad Técnica de Ambato, mi alma mater, y a todos los docentes que desde las aulas y hospitales impartieron sus conocimientos para formarme como un profesional médico humanista y competente en la actualidad.

De manera especial quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Yenddy Carrero, quien me apoyó durante toda la investigación y elaboración del presente proyecto, y sobre todas las cosas, inculcar en mi profesión la investigación como una herramienta para el crecimiento del conocimiento humano.

Todos y todas han formado parte y aportado en lo que hoy he llegado a ser.

Villacrés Salas Christian Sebastián

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Antecedentes investigativos	3
1.1.3. Justificación.....	3
1.1.4. Pregunta de investigación	5
1.1.5. Estado del Arte	5
1.1.6. Fundamentación Teórico-Científico	6
1.2. Objetivos	19
1.2.3. Objetivo General	19
1.2.4. Objetivos Específicos.....	19
CAPÍTULO II	20
METODOLOGÍA	20
2.1. Tipo de investigación	20
2.2. Financiamiento de la investigación	20

2.3.	Recursos Humanos y Materiales	20
2.3.3.	Recursos Humanos.....	20
2.3.4.	Recursos Materiales	21
2.4.	Métodos	22
2.4.3.	Descripción de la metodología.....	22
2.5.	Criterios Bioéticos	23
2.6.	Procedimiento.....	23
2.6.3.	Obtención de los extractos bioactivos del hongo <i>Agaricus blazei</i> Murrill 23	
2.6.4.	Compuestos bioactivos del hongo <i>Agaricus blazei</i> Murrill.....	24
2.6.5.	Toma de muestras de sangre humana periférica	26
2.6.6.	Aislamiento de células linfocitarias a partir de sangre humana periférica 26	
2.6.7.	Cultivo Linfocitario.....	27
2.6.8.	Pase linfocitario.....	27
2.6.9.	Conteo linfocitario	28
2.6.10.	Aplicación del extracto de <i>Agaricus blazei</i> Murrill.....	28
2.6.11.	Método Bradford para la cuantificación de proteínas	28
2.6.12.	Ensayo colorimétrico MTT en linfocitos humanos.....	29
2.6.13.	Extracción y Cuantificación del ARN linfocitario.....	29
2.6.14.	Síntesis de ADN a partir de ARN linfocitario	30
2.6.15.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real 30	
2.6.16.	Determinación de la expresión génica: Método de Livak.....	31
2.7.	Diseño Experimental	32
CAPÍTULO III.....		33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		33

3.1. Análisis de resultados	33
3.1.1. Compuestos activos del Agaricus Blazei Murrill	33
3.1.2. Actividad inmunomodularora del Agaricus Blazei Murrill.....	35
3.2. Discusión de los resultados	39
CAPÍTULO IV.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
4.1. Conclusiones	42
4.2. Recomendaciones	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfico 1 Vía intrínseca y extrínseca de la Apoptosis (15).....	9
<i>Gráfico 2</i> Vista esquemática de los modelos propuestos para la estructura de los poros de la membrana (45). (a) Poros proteínáceos. (b) Poros lipídicos.	11
Gráfico 3 Programación equipo de CFX 96 ** REAL-TIME SYSTEM para la amplificación de los genes BAX y BCL-2.....	31
Gráfico 4 Compuestos bioactivos del Agaricus Blazei Murrill	34
Gráfico 5 Proliferación de los linfocitos tratados con ABM.....	36
Gráfico 6 Aumento de la expresión de BAX Y BCL2 en linfocitos tratados con ABM. Relación BAX/BCL2:1.65 $p \leq 0,05$	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Formas de muerte celular regulada reconocidas por el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular	7
Tabla 2 Número global de casos incidentes de cánceres más importantes en el año 2016.....	12
Tabla 3 Recomendaciones sobre la dieta y actividad física para la prevención del cáncer según la Sociedad Americana del Cáncer 2020.....	16
Tabla 4 Condiciones para la obtención de extractos del hongo <i>Agaricus blazei</i> Murrill	24
Tabla 5 Secuencia de los primers utilizados	31
Tabla 6 Concentración de Fenoles totales en los diferentes extractos de <i>Agaricus blazei</i> Murrill.....	33
Tabla 7 Concentración de Flavonoides totales en los diferentes extractos de <i>Agaricus blazei</i> Murrill.....	33
Tabla 8 Concentración de Polisacáridos totales en los diferentes extractos de <i>Agaricus blazei</i> Murrill.....	34
Tabla 9 Concentración de los compuestos bioactivos.....	36
Tabla 10 CT de los genes housekeeping	37
Tabla 11 CT del gen de interés BAX	37
Tabla 12 CT del gen de interés BCL-2	37
Tabla 13 Δ CT De BAX y BCL2 en linfocitos control y tratados con ABM (Actina)	38
Tabla 14 Δ CT De BAX y BCL2 en linfocitos control y tratados con ABM (GADPH)	38

RESUMEN

Introducción: El cáncer es considerado como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Se ha reportado que la mortalidad por los diferentes tipos de cáncer ocupa el segundo puesto después de las enfermedades cardiovasculares, mientras que, en nuestro país la morbimortalidad por esta patología está entre las primeras diez causas. Aunque la mayoría de los cánceres son prevenibles, el incremento de las formas y el número de casos ha permitido nuevas líneas de investigación enfocadas al desarrollo de alternativas terapéuticas cuyo propósito lo constituye las vías y genes involucrados en la apoptosis. Se han demostrado el potencial proapoptótico de diferentes compuestos bioactivos; limitadas investigaciones sobre los hongos de la familia *Agaricaceae* han expuesto su potencial inmunomodulador e inductor de la apoptosis en líneas celulares de cáncer, aun cuando el mecanismo en estas y células normales es incierto.

Objetivo: Determinar la expresión de las proteínas BAX y BCL-2 en linfocitos humanos tratados con extractos de *Agaricus blazei Murrill*.

Metodología: Se cultivaron linfocitos a partir de sangre venosa periférica humana separados por gradiente de densidad y se trataron con extractos de *Agaricus blazei Murrill*, posteriormente se extrajo y cuantificó el ARN linfocitario con el cual se sintetizó ADNc y se realizó qRT-PCR para determinar la expresión génica de BAX y BCL-2. Además, se realizó el ensayo colorimétrico MTT en los linfocitos para evidenciar proliferación celular.

Resultados: En los linfocitos tratados con los extractos de *Agaricus blazei Murrill*, la expresión de los genes BAX aumentó significativamente en comparación a los genes BCL-2, que a pesar del estrecho cociente de relación dio como resultado la apoptosis de las células linfocitarias.

Conclusiones: Los linfocitos humanos tratados con *Agaricus blazei Murrill* elevaron la expresión de las proteínas BAX y BCL-2, sin embargo, la expresión de BAX fue mayor e indujo la apoptosis celular. Ambas proteínas se consideran importantes marcadores para el diagnóstico y desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas con estos compuestos bioactivos.

Recomendaciones: Se recomienda investigar sobre la activación de BAX, BCL-2 y otras proteínas que inducen la apoptosis en células de diferentes tejidos humanos como terapia adyuvante en el tratamiento de otras patologías.

PALABRAS CLAVES: *AGARICUS BLAZEI MURRILL*, BAX, BCL-2, APOPTOSIS, LINFOCITOS

SUMMARY

Introduction: Cancer is considered one of the main public health problems worldwide. Mortality from different types of cancer has been reported to rank second after cardiovascular diseases, while in our country morbidity and mortality from this pathology is among the top ten causes. Although most cancers are preventable, the increase in the forms and number of cases has allowed new lines of research focused on the development of therapeutic alternatives whose purpose is constituted by the pathways and genes involved in apoptosis. The pro-apoptotic potential of different bioactive compounds has been demonstrated; Limited research on fungi of the Agaricaceae family has exposed their potential immunomodulatory and apoptosis inducing in cancer cell lines, even though the mechanism in these and normal cells is uncertain.

Objective: To determine the expression of BAX and BCL-2 proteins in human lymphocytes treated with extracts of *Agaricus blazei* Murrill.

Methodology: Lymphocytes were cultured from human peripheral venous blood separated by density gradient and treated with extracts of *Agaricus blazei* Murrill, later the lymphocyte RNA with which cDNA was synthesized and qRT-PCR was performed to determine gene expression was extracted and quantified. BAX and BCL-2. In addition, the MTT colorimetric assay was performed on lymphocytes to show cell proliferation.

Results: In lymphocytes treated with extracts of *Agaricus blazei* Murrill, the expression of the BAX genes increased significantly compared to the BCL-2 genes, which despite the close relationship ratio resulted in apoptosis of the lymphocyte cells.

Conclusions: Human lymphocytes treated with *Agaricus blazei* Murrill increased the expression of BAX and BCL-2 proteins, however, BAX expression was higher and induced cell apoptosis. Both proteins are considered important markers for the diagnosis and development of new anticancer therapies with these bioactive compounds.

Recommendations: It is recommended to investigate the activation of BAX, BCL-2 and other proteins that induce apoptosis in cells of different human tissues as adjunctive therapy in the treatment of other pathologies.

KEY WORDS: AGARICUS BLAZEI MURRILL, BAX, BCL-2, APOPTOSIS, LYMPHOCYTES

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer constituye un grave problema para la salud pública (1). Según datos de la Organización Mundial de la Salud, esta patología representa la segunda causa (2). En el año 2020 ocasionó cerca de 10 millones de fallecimientos, de los cuales el 70% sucedió en países de medios y bajos recursos (2,3). En el Ecuador, las neoplasias malignas ocupan la quinta causa de morbilidad, y la mortalidad por neoplasias malignas de útero y estómago son la séptima y décima causa respectivamente (4). Durante el año 2020, el diagnóstico y tratamiento del cáncer se vio obstaculizado por la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) debido al cierre temporal de los establecimientos de salud para la contención de esta infección (1).

En los últimos años se ha demostrado un crecimiento exponencial de los casos de cáncer y consecuentemente el aumento de mortalidad por esta enfermedad, debido al crecimiento poblacional, mayor esperanza de vida y la falta de recursos económicos destinados al diagnóstico y manejo (5). En países de recursos limitados, como el Ecuador, la creciente prevalencia de cánceres asociados a la transición socioeconómica puede colapsar con el sistema de salud (6).

Más de la mitad de las formas de cáncer se pueden prevenir, por lo que las acciones en la atención primaria es la manera más eficaz para el control de las neoplasias (7). Debido a la heterogeneidad del cáncer, existen casos en los que no se puede prevenir y se desarrolla a causa de eventos o mutaciones a nivel genético que impiden la apoptosis, por lo que, las últimas terapias se dirigen al estudio de las vías apoptóticas intrínsecas, extrínsecas o sus moduladores para desarrollar terapias dirigidas con mejores resultados (8). Se ha demostrado que los mecanismos proapoptóticos de las células están relacionados con una mayor generación de ROS, la liberación del factor inductor de apoptosis de las mitocondrias, el incremento de proteínas BAX y la disminución de proteínas BCL-2 (9). Estos dos últimos factores son considerados como los reguladores más importantes de la vía apoptótica mitocondrial, por lo que, en los últimos años ha llamado la atención de la comunidad científica como alternativa para el tratamiento del cáncer (9).

La relación y mecanismo de acción entre el *Agaricus blazei Murrill* y la apoptosis es incierta, pero varios estudios han propuesto que la activación de la vía apoptótica depende de las proteínas BAX que modulan el sistema inmunitario mediante una producción elevada del factor de necrosis tumoral- α e interleucina-8 por los macrófagos (10).

El hongo comestible *Agaricus blazei* perteneciente a la familia *Agaricaceae* en últimos años ha sido empleado como terapia adyuvante en la quimioterapia contra el cáncer (9). Se ha reportado la actividad apoptótica de este hongo en varias líneas celulares como en las de carcinoma de cuello uterino, mama, melanoma y leucemia, pero aún se desconoce su mecanismo de acción (9).

A lo largo de la historia los hongos han formado parte del conocimiento humano como organismos con efectos medicinales. En la naturaleza existen más de 2000 especies de hongos, pero son pocos los que poseen propiedades medicinales. Los compuestos más importantes para el tratamiento de múltiples enfermedades se derivan de la pared celular de los mismos, como la quitina y β -glucanos (11). Además de estos compuestos, existen otros como polisacáridos, complejos polisacárido-proteína, agaritina, ergosterol, selenio, polifenoles y terpenoides con efectos sobre la salud (12). La actividad inmunomoduladora de estos componentes permiten al sistema inmunitario combatir tumores y otras patologías mediante la estimulación de linfocitos, células NK y macrófagos, además de aumentar la producción de citocinas, inhibir la proliferación y actividad citotóxica de células tumorales, promover la apoptosis y bloquear la angiogénesis (12,13). A pesar de varios estudios relacionados a este hongo, con múltiples propiedades para la salud humana, no se ha realizado pruebas moleculares suficientes que permitan cuantificar con exactitud la expresión proteica de las proteínas BAX y BCL-2 y sus efectos en células humanas, de allí la importancia de realizar este estudio (10).

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.3. Justificación

1.1.3.1. Muerte celular programada y el Cáncer

El proceso menos evidente pero no menos importante para nuestro organismo es la muerte celular programada, es decir la apoptosis, es una función celular rápida y muy regulada que tiene como objetivo eliminar las células defectuosas e innecesarias (14). Durante la muerte celular programada, las células se fragmentan en pequeños cuerpos rodeados por membrana llamados cuerpos apoptóticos que se eliminarán por fagocitosis sin provocar una respuesta inflamatoria (15).

Este mecanismo es activado por dos vías, una vía extrínseca o receptora de apoptosis y una vía intrínseca o mitocondrial que impulsarán las caspasas iniciadoras y ejecutoras para procesar sus mecanismos de proteólisis (15,16). La activación de las caspasas se encuentra regulada por señales proteicas proapoptóticas y de supervivencia de la célula (17). La familia de proteínas del linfoma de células b – 2 (BCL-2) son importantes reguladoras de la apoptosis, que cumplen funciones antiapoptóticas y proapoptóticas dependientes de la vía mitocondrial (15,18,19). Específicamente, estas proteínas BCL-2 proapoptóticas formarán oligómeros con BAK y BAX para contribuir en el proceso de apoptosis intrínseco mediante la permeabilización mitocondrial de la membrana externa (MOMP) y la liberación del citocromo c al citosol (CYT-C) que iniciarán y activarán las caspasas (20).

Las células neoplásicas a menudo desactivan estos genes impidiendo su apoptosis, por lo tanto, continúan creciendo y dividiéndose hasta progresar a estados severos de malignidad (14). Estas aberraciones en los procesos apoptóticos son consecuentes a mutaciones que provocan un aumento de la expresión de BCL-2

antiapoptótico y mutaciones o regulación negativa de la proteína BAX proapoptótica (21).

1.1.3.2. Cáncer

A nivel mundial el cáncer y sus consecuencias representan un serio problema para la salud pública de los países de altos y bajos recursos económicos (22). Durante el año 2020 en todo el mundo se produjeron cerca de 20 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10 millones de muertes por esta causa (23). Constituye la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares, y se estima que alrededor de 9 millones de personas fallecen en el mundo al año (3,24). Por otra parte, en un estudio realizado en los Estados Unidos, indica que el cáncer es la primera causa de muerte en pacientes de origen hispano y asiático, así como en mujeres de 40 a 79 años y hombres de 45 a 79 años sin distinción étnica (25). En Ecuador en el año 2019, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, las neoplasias ocupan el puesto 7 y 9 en pacientes adultos y adultos mayores, respectivamente (4).

Se estima que a lo largo de la vida la probabilidad de desarrollar cáncer invasivo es del 37.6% en mujeres y 39,7% en hombres, mientras que la probabilidad de fallecer por esta patología es del 18.8% en mujeres y 22% en hombres (26).

Los cánceres se clasifican según su órgano o tejido de origen y la morfología histológica (2). Los cánceres más comunes por su incidencia son los de mama, pulmón, colon y recto, próstata, estómago, hígado, linfoma no Hodgkin, leucemia, vejiga y cuello uterino (2,27). Independientemente a la edad, en hombre, los cánceres más frecuentes son los de próstata, pulmón, colon y recto, mientras que, en mujeres el cáncer de mama es la neoplasia más común, seguida por las de pulmón, colon y recto (25). En nuestro país, las neoplasias malignas de estómago ocupan el primer lugar de mortalidad en la población general y en las mujeres la neoplasia maligna de cérvix, de las cuales, las más comunes son el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma (4).

Las características biológicas claves que permiten a las células cancerosas subsistir en nuestro organismo son las señales autosuficientes que permiten su rápida proliferación, evadir los supresores de crecimiento, estimular la angiogénesis local, invadir tejidos locales o metastatizarse, mostrar un control de

crecimiento disminuido y muy a menudo evadir los mecanismos fisiológicos de la apoptosis (28). El reconocimiento de estas características ha permitido un gran avance en el desarrollo y descubrimiento de nuevos tratamientos para el cáncer humano (28).

1.1.3.3. Agaricus blazei Murrill

Durante milenios los hongos han sido utilizados por el médico por sus múltiples características farmacológicas para el tratamiento de enfermedades que han aquejado a la humanidad (29). En el mundo existen aproximadamente 2.000 especies de hongos con propiedades medicinales, de un extenso e inexplorado reino fungí que estima alrededor de 1.5 a 5 millones de especies (30). El *Agaricus blazei Murrill* (ABM) es un hongo comestible de la familia Agaricaceae originario del Brasil, que en estudios in vivo e in vitro ha demostrado propiedades inmunomoduladoras, antimutagénicas y antitumorales (31). Si bien el mecanismo de acción no está definido, se ha demostrado que el ABM puede inhibir la proliferación o inducir la apoptosis de células leucémicas y células cancerosas de los pulmones, estómago y páncreas (10,29,32,33).

1.1.4. Pregunta de investigación

¿El tratamiento con extractos de *Agaricus blazei Murrill* induce la expresión de proteínas BAX y BCL-2 en linfocitos humanos?

1.1.5. Estado del Arte

Para el presente proyecto se realizó una búsqueda sistemática de bibliográfica en diferentes bases de datos con relación al tema de investigación; artículos que sirvieron como apoyo para el trabajo en cuestión:

Los estudios sobre los beneficios del *Agaricus blazei Murrill* en el campo de la oncología son limitados, sin embargo, la mayoría concluye su uso como una herramienta terapéutica prometedora en el cáncer. Yasuma et al. comprobó la actividad inhibidora del extracto de ABM en dos líneas celulares de cáncer de pulmón (A549 y H3255) tratadas con diferentes concentraciones que en

comparación al grupo control suprimió significativamente la proliferación celular y la expresión de moléculas de Axl, un receptor de tirosina quinasa importante en la resistencia a los fármacos anticancerígenos (29).

Akiyama et al. en 2011, a partir de la Agaritina, un compuesto derivado de las especies *Agaricus*, examinó los efectos morfológicos y citotóxicos en las células leucémicas U937; observó un evidente daño celular y aumento de la actividad de la Caspasa 3, 8 y-9 que sugirieron fuertemente la actividad proapoptótica del ABM a través de la liberación del citocromo c de las mitocondrias (33). En el año 2020, un estudio similar realizado por Cheng et al. respecto a los efectos inhibidores de ABM en células de leucemia mieloide, con el objetivo de investigar el efecto antitumoral de su extracto, demostró mediante RT-qPCR y Western blot que la expresión del gen y la proteína BAX estaba aumentada, mientras que la expresión de BCL-2 estaba disminuida, concluyendo que dichos extractos pueden inducir la apoptosis en células de la leucemia mieloide crónica (34).

Al igual que Cheng et al, dos años antes de su investigación, Matsushita et al. estudió los efectos del extractos de agua caliente de ABM en células pancreáticas cancerígenas; esta investigación arrojó resultados prometedores al tratamiento, ya que, inhibió significativamente la proliferación e indujo la apoptosis de las células cancerosas a través de la vía dependiente de BAX y Caspasa, e indica que el extracto de ABM es un potencial candidato para el tratamiento del cáncer, específicamente en páncreas (10).

Los principales compuestos del *Agaricus blazei Murrill* son polisacáridos, por lo que, Jiang et al. en 2018 evaluó los efectos inmunomoduladores de polisacáridos de bajo peso molecular como terapia adyuvante en la génesis de tumores en ratones a diferentes dosis del extracto, asociando una mayor respuesta de tipo Th1 específico en los sujetos tratados con esta terapia inmunoadyuvante, que demostró de forma prometedora sus propiedades inhibitorias en la progresión del cáncer (35).

1.1.6. Fundamentación Teórico-Científico

1.1.6.1. Muerte celular programada

El número de células de nuestro organismo está determinado por la tasa de producción y muerte celular (15). El proceso de muerte celular programada se

encuentra regulada por varias formas cruciales para eliminar las células defectuosas, en total se reconocen doce formas de apoptosis descritas por el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular las que se presentan en la tabla 1 (36):

Tabla 1

Formas de muerte celular regulada reconocidas por el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular

Tipos de muerte celular programada		
Nº	Tipo	Descripción
1	Apoptosis (Extrínseca)	Forma de muerte celular programada desencadenada por perturbaciones extracelulares, propagada por caspasa-8 y ejecutada por caspasa-3
2	Apoptosis (Intrínseca)	Forma de muerte celular programada desencadenada por perturbaciones intracelulares caracterizada por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y ejecutada por caspasa-3
3	Muerte celular dependiente de autofagia	Forma de muerte celular programada que depende mecánicamente de la maquinaria autofágica.
4	Muerte de células entóticas	Forma de muerte celular programada resultante de la internalización de célula en célula (enosis) dependiente de actomiosina seguida de muerte de la célula internalizada por degradación lisosomal
5	Ferroptosis	Forma de muerte celular programada iniciada por perturbación oxidativa del microambiente intracelular; bajo el control de GPX4 y puede ser inhibido por quelantes de hierro y antioxidantes lipofílicos
6	Muerte celular inmunogénica	Forma de muerte celular programada en la que los DAMPS liberados por las células moribundas son suficientes para desencadenar una respuesta inmune adaptativa específica para esos antígenos.

7	Muerte celular dependiente de lisosomas	Forma de muerte celular programada que implica la permeabilización de la membrana lisosomal y la liberación de catepsinas en el citoplasma
8	Necrosis impulsada por la transición de la permeabilidad mitocondrial	Forma de muerte celular programada desencadenada por perturbaciones intracelulares, como especies reactivas de oxígeno (ROS) o desequilibrio de Ca ²⁺ , que da como resultado la degradación de las membranas mitocondriales y necrosis dependiente de ciclofilina D
9	Necroptosis	Forma de muerte celular programada dependiente de la actividad de RIPK1 / 3 y la formación de poros de membrana por pseudoquinasa similar al dominio de quinasa de linaje mixto (MLKL)
10	Muerte de células neóticas	Una forma de muerte celular programada dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la que los NET se extruyen de la célula; ocurre en neutrófilos y otras células inmunes
11	Parthanatos	Forma de RCD iniciada por la hiperactivación de la proteína de respuesta al daño del ADN PARP1, que conduce al colapso redox, la fragmentación del ADN y la permeabilización de la membrana mitocondrial
12	Piroptosis	Forma de muerte celular que depende de la formación de un poro de membrana por las proteínas gasdermina, a menudo como resultado de la activación de la caspasa inflamatoria.

1.1.6.1.1. Apoptosis

Esta forma de muerte celular regulada se caracteriza y define por la formación de ampollas en la membrana plasmática, condensación de cromatina, fragmentación nuclear y contracción celular (15,36). Este proceso es crucial para mantener la homeostasis celular (37). Su particularidad es que no provoca una respuesta inflamatoria, ya que, los cuerpos apoptóticos son fagocitados y consecuentemente

eliminados (36). Este mecanismo es promovido y derivado de la proteasa intracelular específica de aspartato derivada de cisteína, también llamadas caspasas, que se clasifican por su actividad iniciadora (caspasas 8, 9 y 10) y ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) (16,38). La activación de las caspasas está regulada por dos vías, una intrínseca o mitocondrial y la extrínseca que depende de la expresión de los receptores de apoptosis en la membrana celular (39).

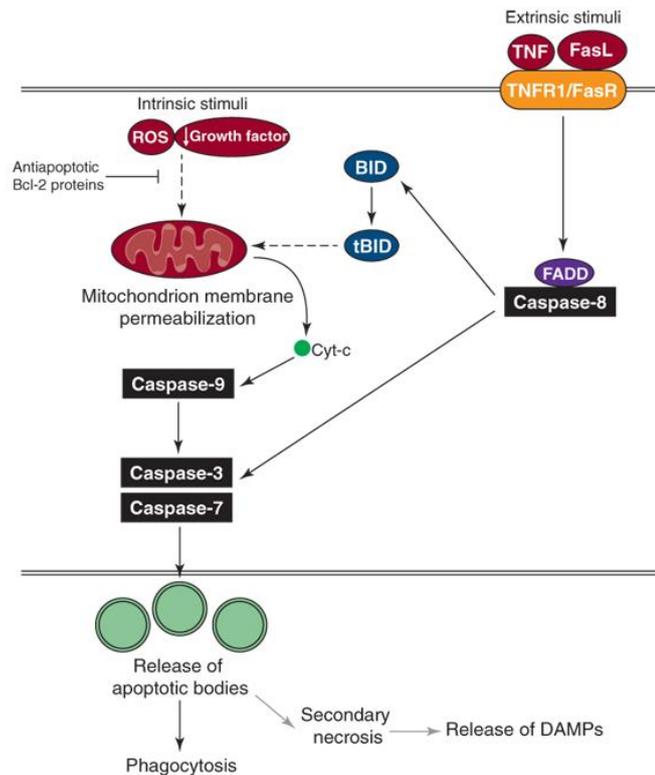


Gráfico 1 Vía intrínseca y extrínseca de la Apoptosis (15)

La vía extrínseca de la apoptosis se desencadena por ligandos de muerte celular producidos por células inmunitarias como el Fas-L y el factor de necrosis tumoral (TNF) que se unirán a los receptores de la célula diana (15,39). Una vez unido, los monómeros de procaspasa-8 se dimerizan y activan a Caspasa-8 que a su vez activará las Caspasas ejecutoras (15). La activación de la vía intrínseca de la apoptosis se inicia en respuesta a la hipoxemia, especies reactivas de oxígeno (ROS), radiación o por la ausencia de factores de crecimiento que permeabilizarán la membrana mitocondrial externa (MOMP) y liberará la proteína proapoptótica citocromo c (Cyt-c) activando la Caspasa-9 que a su vez activará la Caspasa-3 (15,38). Estos mecanismos conllevan a la formación de cuerpos apoptóticos en la célula diana que serán fagocitados, sin embargo, existen casos en el que este

proceso falla y se liberan patrones moleculares asociados al daño que provocan una respuesta inflamatoria (40).

1.1.6.1.2. Proteínas Proapoptóticas

El equilibrio entre señales proapoptóticas e inhibitoras de la apoptosis están codificadas por la actividad de las proteasas intracelulares (37). Las proteínas del linfoma de células B-2 (BCL-2) son importantes reguladores de la apoptosis que sistematizan las vías de muerte celular dependiente de las mitocondrias al liberar o no el citocromo c (Cyt-c) (18). Esta gran familia comprende proteínas proapoptóticas e inhibitoras de la apoptosis que regularizan la respuesta celular ante los numerosos estímulos que conllevan a la muerte de la misma (19).

Las proteínas BCL-2 proapoptóticas forman oligómeros con BAX (BCL-2 asociada con proteína X), BAK (antagonista de BCL-2), BAD, BID, BIM, BNIP3, Puma y Noxa que contribuirán a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa facilitando la liberación intracelular de Cyt-c (20,41). De estos oligómeros, BAX y BAK son fundamentales dentro de la apoptosis, ya que participan en la mayoría de procesos de activación de las dos vías de la muerte celular (42). El objetivo de estas proteínas, permeabilizar la membrana mitocondrial externa (MOMP), da como resultado la liberación de proteínas proapoptóticas que formarán un complejo molecular o apoptosoma activando la cascada de las caspasas (43).

La ubicación celular de ambos oligómeros, BAX y BAK, es crucial para ejecutar sus funciones de MOMP, la primera se encuentra en el citosol y la segunda constituye parte de la membrana mitocondrial (44). Los mecanismos por los cuales BAX y BAK forman poros en la membrana de las mitocondrias no están esclarecidos, pero se ha planteado dos teorías sobre la permeabilización, en si son proteináceos o lipídicos (45). Se ha visualizado anillos de oligómeros de BAX en la membrana mitocondrial externa lo que confiere una característica proteinácea, pero no descartan la existencia de poros lipídicos (46). Por otra parte, la creciente evidencia apunta una naturaleza lipídica de los poros formados por BAX y BAK, que su hallazgo se limita por las dificultades técnicas para su minuciosa observación (47,48).

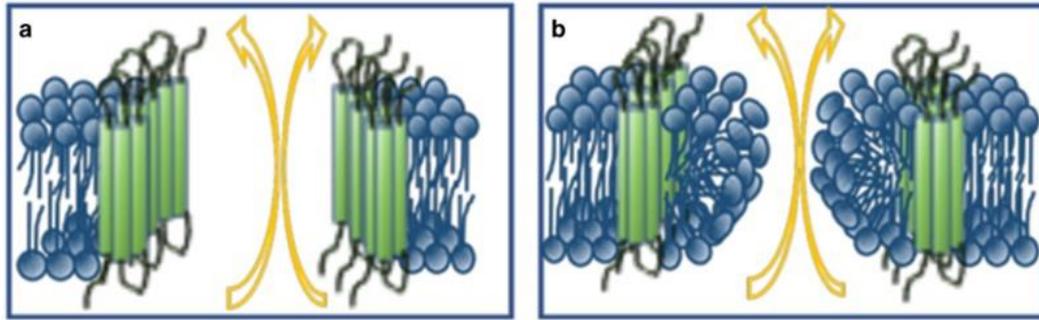


Gráfico 2 Vista esquemática de los modelos propuestos para la estructura de los poros de la membrana (45). (a) Poros proteináceos. (b) Poros lipídicos.

1.1.6.2. Cáncer

El término cáncer, también llamado neoplasia, generalmente se refiere a un conjunto de patologías tumorales de carácter invasivo o malignas (22). Es un conjunto muy extenso de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células anormales y representa la segunda causa de muerte en países desarrollados y en vías de desarrollo (27,49). En los seres humanos, esta enfermedad, supera las 200 etiologías (50). Esta diversidad está reflejada por la diferenciación anormal de las células de origen, influencia de los microambiente tisulares, redes de transcripción alterada y mutaciones somáticas adquiridas (50). En dependencia de la capacidad de invadir tejidos vecinos o de su diseminación, se considera tumor como maligno, y si no es así, benigno (22,50). Sin embargo, algunos cánceres de características benignas son mortales como las neoplasias cerebrales histológicamente normales y los adenomas hepatocelulares que causan el desplazamiento del tejido cerebral y hemorragias importantes, respectivamente (22). El crecimiento en las tasas de incidencia de cáncer y su mal manejo, representa un peligro para el desarrollo humano, por lo que, requiere un enfoque distinto al de otras enfermedades no transmisibles para la prevención, diagnóstico y tratamiento (51).

1.1.6.2.1. Epidemiología

Según la Colaboración Mundial sobre la Carga de Cáncer, en el año 2016 se contabilizó 17.2 millones de casos de cáncer en el mundo y un total de 8.9

millones de muertes por esta patología (51,52). Se estima que la probabilidad de desarrollar cáncer durante los 0 a 79 años de vida en dependencia del sexo es de 1 de cada 3 hombres y 1 de cada 5 mujeres (51). En pacientes masculinos, cerca del 40% del total de incidencia mundial, las neoplasias de próstata, pulmón y colorrectales fueron las más comunes, sin embargo, las causas más comunes de mortalidad corresponden a las patologías de pulmón, hígado y estómago (51). En pacientes femeninos, las neoplasias más comunes fueron la de mama, colorrectales y de piel con excepción del melanoma; y las principales causas de muerte fueron el cáncer de mama, pulmón y vías respiratorias y colorrectal (51). Se ha identificado las 10 neoplasias más comunes de importancia para la salud pública y representado en la siguiente tabla:

Tabla 2

Número global de casos incidentes de cánceres más importantes en el año 2016

N.º	Tipo de Cáncer	Número de Casos	Número de Muertes	Incidencia en Hombres	Incidencia en Mujeres
1	Pulmón y Vías Respiratorias	2.0 millones	1.7 millones	1:18	1:46
2	Colon y Recto	1.7 millones	830 000	1:26	1:41
3	Mama	1.7 millones	53 500 en mujeres 10 000 en hombres	-	1:20
4	Piel No Melanoma	1.5 millones	53 000	1:31	1:50
5	Próstata	1.4 millones	381 000	1:16	-
6	Estómago	1.7 millones	834 000	1:32	1:80
7	Hígado	1.0 millones	829 000	1:38	1:111
8	Cérvix	511 000	247 000	-	1:75
9	Leucemia	467 000	310 000	1:118	1:194
10	Linfoma no Hodgkin	461 000	240 000	1:110	1:161

Desde los 90's la tasa de mortalidad e incidencia han demostrado un patrón de disminución, debido al aumento de las pruebas de detección y mejora en el tratamiento de esta patología (25). Una década antes como resultado de la implementación de la mamografía y detección del antígeno prostático específico para el screening del cáncer de mama y próstata, la incidencia de estas patologías aumentó considerablemente, mientras que, la mortalidad disminuyó por la instauración de un tratamiento oportuno ante un diagnóstico precoz (53,54).

1.1.6.2.2. Factores de Riesgo

El cáncer, en la actualidad, es el resultado de mutaciones de genes que pueden heredarse, inducirse por factores medioambientales o debido a errores aleatorios durante el proceso normal de replicación del ADN que resultarán en un aumento de proliferación celular anómala (55–57).

1.1.6.2.2.1. Tabaco

En el cáncer y en otras enfermedades la principal causa prevenible es el tabaco (58). Este hábito tóxico es responsable de más del 31% de las muertes por cáncer en pacientes masculinos entre la 3ra y 6ta década de vida, y del 6% de las muertes en mujeres en estas edades (58). Se ha demostrado que el tabaco aumenta el riesgo de padecer un sinnúmero de variedades de cáncer como el de pulmón, esófago, estómago, hígado, páncreas, intestino, riñón vejiga, cervix y leucemia mieloide (25,58,59). Principalmente, el hábito tabáquico es el responsable de cánceres de la cavidad oral, esófago, laringe, pulmón, colon, recto y ovario (60). En países como China, Mongolia y Corea la tasa de incidencia de cáncer por esta causa es la más alta (61).

En pacientes fumadores de pipa y puros el riesgo de cáncer de pulmón es más del doble, el cáncer de labios, boca, faringe, esófago y vejiga se triplica y cuadruplica el de laringe, en comparación con pacientes no fumadores (62). El humo de tabaco tiene un efecto nocivo en fumadores pasivos, ya que, contiene más de 50 carcinógenos que aumentan el riesgo de padecer cáncer de pulmón, por lo que se le atribuye como la primera causa en aquellos casos que el hábito tabáquico no está presente (58).

1.1.6.2.2.2.Alcohol

Está claramente estudiado la relación entre el alcohol y varias neoplasias como el cáncer de boca, faringe, laringe, esófago y mama (63,64). A nivel global, las muertes por cáncer a causa del alcohol representan del 3,5 al 5% de los casos (63). En los Estados Unidos, se atribuye al consumo de alcohol más de 200 000 muertes por cáncer (65). En bebedores frecuentes, el riesgo de neoplasias hepatocelulares aumenta así como otras enfermedades hepáticas que conllevan al cáncer (66). Con respecto al cáncer de mama el alcohol parece estar relacionado con el 4 al 9% de los casos (59).

1.1.6.2.2.3.Contaminación ambiental

Se han realizado múltiples estudios sobre el impacto de la contaminación ambiental sobre los diferentes tipos de cáncer, y de forma especial con el de pulmón (67). Se estima que al menos el 5 % de los cánceres de pulmón a nivel mundial se debe a la contaminación ambiental y esto puede aumentar hasta un 7% en aquellos países en vías de desarrollo (59).

1.1.6.2.2.4.Radiación ionizante

Este tipo de radiación es causante de una gran variedad de tipos de cáncer (68). Se ha identificado dos tipos de exposición a la radiación ionizante, artificial y natural (68). Sin embargo, es difícil estimar y atribuir como causa de cáncer a todas las formas de radiación que experimenta la población general (69). Las fuentes de radiación natural incluyen la ingestión, la inhalación de gas radón, los rayos gamma terrestres y los rayos cósmicos (70). El gas radón se produce de forma natural a partir de la descomposición natural del uranio del suelo y se acumula fácilmente en lugares con mala ventilación (71). Alrededor del 3 y 20% de las muertes por cáncer de pulmón son a causa del gas radón residencial, convirtiéndolo en la segunda causa de esta patología después de fumar (72). La invención de los rayos X y la tomografía computarizada, dejando a un lado sus

grandes aportes para el diagnóstico de un gran número de enfermedades, constituyen un gran riesgo para la salud pública, ya que, su radiación y mayor cantidad la de la tomografía ha multiplicado por 20 la incidencia de diferentes neoplasias en humanos (73).

1.1.6.2.5. Agentes infecciosos

El 15% de los casos de cáncer se le atribuye a una infección por virus, bacterias e incluso parásitos (74). A nivel mundial cerca de 2 millones de casos nuevos de neoplasias malignas se atribuye a los siguientes agentes infecciosos: virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC) y al *Helicobacter pylori*, lo que ha permitido desarrollar nuevas estrategias preventivas para su diagnóstico y tratamiento (74,75). El *H. pylori* está presente en más de la mitad de la población general de los cuales solo del 1 al 3% desarrollan cáncer gástrico y se ha identificado la bacteria en más del 89% de los adenocarcinomas gástricos (76). Después del *H. pylori*, los tipos 16 y 18 de VPH son los agentes oncogénicos más comunes identificado en el cáncer de cérvix invasivo, representa el 66% de los casos en Estados Unidos (77). El cáncer de hígado es la segunda causa de muerte a nivel mundial, provocado por los virus de la hepatitis B y C (26).

1.1.6.2.6. Dieta, Obesidad y Sedentarismo

La evidencia ha demostrado que una baja ingesta de frutas y verduras se asocian con un mayor riesgo de cáncer de esófago, estómago, colon y recto y pulmón (59). Se presume que esta condición dietética se relaciona con malos hábitos alimenticios, obesidad y sedentarismo, de los cuales, estos dos últimos, se han asociado con cáncer de mama, cérvix, ovario, endometrio, esófago, vesícula biliar, colon, recto y riñón (59,60). Se ha justificado esta relación entre la dieta y el cáncer al contrastar una dieta no balanceada con una dieta mediterránea que reduce el riesgo de cáncer de mama y próstata (78). El aumento del IMC en pacientes jóvenes y adultos a nivel mundial, ha disparado el porcentaje de

neoplasias asociadas a esta condición, sugiriendo que los cambios metabólicos y la obesidad contribuyen al desarrollo de cáncer (79). La actividad física disminuye el riesgo de padecer cáncer, mientras que un comportamiento sedentario se asocia con un mayor riesgo de presentar tumoraciones colorrectales, prostáticas, ováricas, de endometrio y mama (80,81).

1.1.6.2.3. Factores genéticos

La predisposición genética para el cáncer ha sido un tema de estudio durante la última década, y son responsables del 5 al 10% de los casos de cáncer a nivel mundial (82). Se han identificado varios genes responsables de más de 50 síndromes hereditarios de cáncer, que a medida que mutan duplican el riesgo de padecer esta patología (82). En neoplasias comunes como la de próstata, pulmón, mama, vejiga y colón, el riesgo familiar en primera línea de consanguinidad de padecerlas aumenta entre dos a cuatro veces (57). Esta predisposición genética puede explicar por qué al exponer a dos sujetos a un carcinógeno en específico, quien cuente con genes oncogénicos desarrollará una neoplasia mientras que el otro no (83).

1.1.6.2.4. Prevención

El principal pilar para disminuir el riesgo de cáncer son los cambios en el estilo de vida, por lo que la Sociedad Americana del Cáncer recomienda mantenerse alejado del humo del tabaco, disminuir el consumo de alcohol, consumir una dieta saludable rica en vegetales, realizar actividad física, evitar la exposición al sol y mantenerse informado sobre los patógenos carcinógenos, incentivando la vacunación y su diagnóstico precoz (84)

Tabla 3

Recomendaciones sobre la dieta y actividad física para la prevención del cáncer según la Sociedad Americana del Cáncer 2020

Recomendaciones sobre la dieta y actividad física
1. Alcanzar y mantener un peso corporal saludable durante toda la vida
2. Sea físicamente activo.

<ul style="list-style-type: none"> • Los adultos deben realizar entre 150 y 300 minutos de actividad física de intensidad moderada por semana, o entre 75 y 150 minutos de actividad física de intensidad vigorosa o una combinación equivalente; Lo óptimo es alcanzar o superar el límite superior de 300 min.
<ul style="list-style-type: none"> • Los niños y adolescentes deben realizar al menos 1 hora de actividad de intensidad moderada o vigorosa todos los días.
<ul style="list-style-type: none"> • Limite el comportamiento sedentario, como sentarse, acostarse y mirar televisión, y otras formas de entretenimiento en pantalla.
<p>3. Siga un patrón de alimentación saludable en todas las edades.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Un patrón de alimentación saludable incluye: <ul style="list-style-type: none"> ❖ Alimentos ricos en nutrientes en cantidades que ayudan a lograr y mantener un peso corporal saludable; ❖ Una variedad de verduras: verde oscuro, rojo y naranja, legumbres ricas en fibra (frijoles y guisantes) y otras; ❖ Frutas, especialmente frutas enteras con una variedad de colores; y ❖ Granos integrales.
<ul style="list-style-type: none"> • Un patrón de alimentación saludable limita o no incluye: <ul style="list-style-type: none"> ❖ Carnes rojas y procesadas; ❖ Bebidas azucaradas; o ❖ Alimentos altamente procesados y productos de granos refinados.
<p>4. Es mejor no beber alcohol.</p>
<p>5. Las personas que eligen beber alcohol deben limitar su consumo a no más de 1 bebida por día para las mujeres y 2 bebidas por día para los hombres.</p>

Se recomienda la detección del cáncer en etapas tempranas y asintomáticas mediante el cribado de diferentes neoplasias como la de mama, próstata y colorrectal. El Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de los Estados Unidos (85–88), USPSTF por sus siglas en inglés, recomienda realizar la mamografía para el cribado de cáncer de mama cada dos años en mujeres de 50 a 74 años; para el cáncer de cérvix recomienda realizar un Papanicolaou cada 3 años en mujeres de 21 a 65 años y Pruebas de VPH cada 5 años; se recomienda el cribado del cáncer colorrectal en paciente a partir de los 50 años hasta los 75 años mediante exámenes coprológicos, visualización directa como la colonoscopia y pruebas

serológicos como la prueba de ADN metilado SEPT9; se recomienda medir el antígeno prostático específico en sangre en pacientes masculinos mayores de 75 años para la detección del cáncer de próstata.

1.1.6.3. *Agaricus blazei Murrill*

El hongo *Agaricus blazei Murrill* (ABM), perteneciente a la familia Agaricaceae, fue descrito por el científico Belga Heinemann en 1967 (31). Originario del Brasil, donde se le conoce como Hongo Solar o Himematsutake en Japón o Ji Song Rong en China, este hongo medicinal ha sido estudiado para el tratamiento de múltiples enfermedades como la diabetes, hiperlipidemia, hepatitis y cáncer (89). EL ABM es rico en polisacáridos (beta-glucanos), lecitinas, vitaminas, ácidos fenólicos y ergosterol (90,91), lo que le confiere propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antitumorales, antioxidantes y antivirales (92,93).

1.1.6.3.1. Propiedades del *Agaricus blazei Murrill*

Se ha demostrado que los beta-glucanos presentes en el ABM tienen una importante función inmunomoduladora y actividad antitumoral (94). Con este antecedente, se ha postulado que la actividad antitumoral es la fracción de B-glucano, el cual se administró vía oral a ratones portadores de tumores y resultó la regresión de los mismos (95,96). Otros compuestos derivados del ABM como el ergosterol y blazeispiroles tienen un efecto antitumoral por sus propiedades antiangiogénicas (97). Estas peculiaridades antitumorales y apoptóticas del ABM han sido registradas en diferentes líneas celulares cancerosas como en neoplasias de mama, cérvix, melanoma y leucemia, pero su mecanismo proapoptótico es poco conocido (98).

1.1.6.4. *Agaricus blazei Murrill* y las proteínas BAX y BCL-2

La actividad apoptótica del ABM posiblemente está inducida por p53 a través de varias vías que involucran a las proteínas BCL-2 (99). La proteína BAX, el

objetivo de p53, provoca la liberación del citocromo c activando la apoptosis (99). La exposición de extractos de ABM enriquecidos con blazeispiroles a células tumorales de carcinoma hepatocelular demostró un aumento en la expresión de BAX y disminución de BCL-2 inhibidora de la apoptosis (100). Este fenómeno se ha reportado en otros compuestos de ABM como el Agarol y Blazeispirol, que disminuyeron la expresión de BCL-2 y BCL-xL y aumentó la expresión de BAX, regulado por la función de p53 y fracción apoptótica de BAX y BCL-2 (9,97).

1.2. Objetivos

1.2.3. Objetivo General

Determinar la expresión de las proteínas BAX y BCL-2 en linfocitos humanos tratados con extractos de *Agaricus blazei Murill*.

1.2.4. Objetivos Específicos

- 1.2.4.1. Determinar la dosis óptima del tratamiento con *Agaricus blazei Murill* a través de ensayos de citotoxicidad.
- 1.2.4.2. Conocer el efecto del tratamiento del extracto de *Agaricus blazei Murill in vitro* en linfocitos humanos en la expresión de las proteínas BAX y BCL-2.
- 1.2.4.3. Correlacionar la expresión de proteínas BAX y BCL-2 con el efecto pro o antiapoptótico del *Agaricus blazei Murill*.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación

Se realizará un estudio no experimental con el fin de identificar la expresión de las proteínas proapoptóticas BAX y BCL-2 en linfocitos humanos sanos tratados con diferentes concentraciones de extractos de *Agaricus blazei Murrill*. Este estudio se considera no experimental, ya que, las variables no son manipuladas deliberadamente (101). Como nos menciona Hernández et al, un estudio no experimental las reacciones y acciones realizadas solo serán observadas para luego registrarlas, porque no será posible influir ni tener un control directo sobre las variables (101). De la misma forma, este proyecto se le considera como un estudio correlacional al plantear que la expresión de la proteínas BAX y BCL-2 en células humanas sanas inciden en la apoptosis de las mismas (101).

2.2. Financiamiento de la investigación

Este trabajo de investigación forma parte del macroproyecto dirigido por la Dra. Yenddy Carrero titulado “ESTUDIO ETNOBOTÁNICO Y BIOENSAYOS DE PLANTAS MEDICINALES RELACIONADAS CON EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE CÉRVIX EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA, ECUADOR” aprobado mediante resolución: 0904-CU-P-2018 y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato.

2.3. Recursos Humanos y Materiales

2.3.3. Recursos Humanos

- **Docente tutora del proyecto de investigación:** Dra. PhD. Carrero Castillo Yenddy Nayghit

- **Tesista:** Univ. Villacrés Salas Christian Sebastián
- Personal de la Red de estudiantes investigadores de la Universidad Técnica de Ambato

2.3.4. Recursos Materiales

- **Instalación:** Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencia de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato – Campus Querochaca.
- **Células:** Linfocitos humanos
- Extractos de *Agaricus blazei Murrill*
- Antibiótico penicilina/estreptomicina
- **Material de Laboratorio**
 - Pipeta serológica 5ml
 - Vasos de precipitación 25, 50, 100 ml
 - Matraces de 250 ml
 - Gradilla plástica
 - Pipeta Pasteur
 - Pipetas descartables 5, 10 y 25 ml
 - Tubos EDTA (Vacuette ®)
 - Jeringuilla 15 y 10 ml
 - Tubos cónicos para centrífuga Falcon 15, 50 ml
 - Pipeta multicanal
 - Micropipetas
 - Puntas estériles para micropipetas
 - Tubos eppendorf 0,5, 1 y 2 ml
 - Filtro 0,22 micras (Thermofisher)
- **Equipos**
 - Agitadores magnéticos
 - Balanza analítica (Ohaus, México)
 - Plancha de calentamiento (Fisher Scientific, USA)
 - Rota evaporador (IKA RU8, USA)
 - Equipo de filtración al vacío
 - Vórtex (Labnet, USA)

- Centrífuga (Hettich Zentrifugen, Alemania)
- Baño María (IKA, USA)
- Equipo para PCR-RT (Thermo Fisher, USA)
- Nanodrop
- Incubadora de CO₂ (Panasonic, Japón)
- Microscopio óptico (SCOPE, USA)
- Cámara de Neubauer
- **Soluciones**
 - Agua destilada estéril
 - Etanol 96% (C₂H₅OH)
 - MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
 - RPMI 1640 (Gibco TM)
 - Suero fetal bovino al 10% (Gibco TM)
 - Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco TM)
- **Reactivos**
 - Primers forward y reverse para las proteínas BAX y BCL-2
 - Histopaque[®] -1077 (Sigma- Aldrich, Alemania)
 - Kit PureLink[™] RNA Mini Kit - Thermo Fisher Scientific
 - Enzima SuperScript[™] One Step (Thermofisher)
 - qPCR Máster Mix (GoTaq[®])

2.4. Métodos

2.4.3. Descripción de la metodología

Para el presente proyecto se prepararon 4 extractos de *Agaricus blazei Murrill* y se cuantificó la cantidad de proteínas por el método colorimétrico de Bradford. Se aislaron linfocitos humanos a partir de sangre periférica mediante Histopaque[®] -1077 de la marca Sigma-Aldrich aplicando la metodología propuesta por la misma. Una vez obtenidos los linfocitos se cultivaron en una placa de 6 pocillos con medio RPMI 1640 (Gibco TM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco TM), 100 µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycinina y luego fueron incubados por 72 horas a 37° centígrados, CO₂ al 5% y atmósfera húmeda.

Para determinar la actividad del extracto de *Agaricus blazei Murrill* en los linfocitos se utilizó el ensayo MTT, el que permitió cuantificar la proliferación celular, mediante la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio) obteniéndose una dosis óptima y el IC-50 con el software Prisma Graphpad Versión 6 para cada una de las muestras.

Finalmente se extrajo el ARN de los linfocitos humanos control y con tratamiento mediante la técnica de columnas del Kit PureLink™ RNA Mini Kit - Thermo Fisher Scientific y se cuantificó el ARN obtenido en el nanodrop. Se procedió a realizar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (PCR-RT) con la enzima SuperScript™ One Step (Thermofisher) y los primers específicos aplicando la metodología indicada y se obtuvo la cuantificación de la expresión génica de las proteínas BAX y BCL-2.

2.5. Criterios Bioéticos

A los sujetos donantes de sangre para la obtención de linfocitos utilizados en la presente investigación permitieron y aceptaron ser parte mediante la firma de un consentimiento informado previamente entregado. Se sometió a consideración la obtención de muestras sanguíneas de voluntarios que deseaban participar en el estudio cumpliendo la normativa establecida por la Federación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

2.6. Procedimiento

2.6.3. Obtención de los extractos bioactivos del hongo *Agaricus blazei Murrill*

Se obtuvo los extractos a partir del cuerpo fructífero previamente molido del hongo *Agaricus blazei Murrill*, adquirido comercialmente de una plantación en Tabacundo, Pichincha. La presentación seca del hongo permitió mantener sus propiedades bioactivas disminuyendo el riesgo de contaminación de la muestra para los ensayos.

Con el apoyo de investigaciones previas (102–104), se determinó las condiciones para extraer el mayor porcentaje de sustancias bioactivas como el tipo de

disolvente y el tiempo de extracción en proporciones constantes de 1 en 15 de componente/disolvente.

Tabla 4

Condiciones para la obtención de extractos del hongo Agaricus blazei Murrill

Extracto	Temperatura (°C)	Componente / Disolvente	Tiempo (horas)	Disolvente
E1	100	1 en 15	1	Agua destilada
E2	100	1 en 15	2	Agua destilada
E3	100	1 en 15	1	Agua : Etanol (50% v/v)
E4	100	1 en 15	2	Agua : Etanol (50% v/v)

La cantidad del componente utilizado para cada uno de los extractos fue de 10 gramos de polvo seco del hongo *Agaricus blazei Murrill* pesados en una balanza analítica (Ohaus, México) que posteriormente se disolvieron en matraces de 250 mililitros con 150 mililitros de agua destilada para los extractos 1 y 2, mientras que, los extractos 3 y 4 se disolvieron en una solución al 50% v/v de agua – etanol. Todos los extractos se sometieron a una temperatura interior de 100 grados centígrados \pm 5 grados en una plancha de calentamiento de la marca Fisher Scientific a diferentes intervalos de tiempo como muestra la tabla 4.

Se eliminaron los residuos sólidos mediante filtrado al vacío, obteniendo 4 extractos, E1 y E2 en disolvente acuoso y E3 y E4 en disolvente a base de etanol el cual se eliminó con ayuda de un rotaevaporador marca IKA RU8 a una temperatura de 60 grados centígrados a 100 revoluciones por minuto durante 15 minutos para evitar la interacción de este compuesto en los próximos análisis.

2.6.4. Compuestos bioactivos del hongo *Agaricus blazei Murrill*

2.6.4.1. Cuantificación de fenoles totales

Se realizó el método de Folin – Ciocalteu, que se basa en la detección de un complejo azul mediante espectrofotometría formado a partir de la reducción del reactivo de Folin por acción de los fenoles (105). El cambio de color amarillo, característico del reactivo de Folin, a color azul se debe a que los fenoles, en un

pH básico, reaccionan al wolframato y molibdato sódico presentes en este reactivo (106). Además, se utilizó el método con microplacas para la cuantificación de fenoles totales propuesto por Bobo-García et al (107).

En una microplaca de 400 μ l y 96 pocillos se colocó 20 μ l de cada extracto diluido a una concentración de 1:40 de forma individual, se añadió 100 μ l del reactivo Folin-Ciocalteu para fenoles de la marca Merck a una concentración de 1:4 y se removió por 1 minuto, luego se dejó descansar la muestra por 4 minutos y se colocó 75 μ l de solución de carbonato de sodio 100 g/l de la marca Merck para nuevamente remover por 1 minuto y dejar reposar por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, con ayuda del espectrofotómetro para microplacas accuSkan GO UV/VIS Microplate Fisher Scientific y el software Skanit 4.1 for Microplate Readers se midió la absorbancia a 750 nm y se procesaron los datos, obteniendo las siguientes concentraciones calibradas a 10, 20, 50, 100 y 200 miligramos/litro de ácido gálico de la marca Fisher Scientific

2.6.4.2. Cuantificación de flavonoides totales

Mediante el método establecido por Sembiring et al (108), se cuantificó los flavonoides totales, ya que, estos compuestos en una solución de metanol tienen la propiedad de formar complejos con el catión de aluminio y los anillos hidroxilo de los flavonoides permitiendo ser detectados en un lector de microplacas a longitudes de onda mayores a 415 nm.

En una microplaca de 400 y 96 pocillos se colocó 50 μ l de solución de los extractos diluidos en etanol al 96% a una concentración de 1:40, sobre la cual se colocó 10 μ l de cloruro de aluminio al 10%, 150 μ l de etanol al 96% y 10 μ l de acetato de sodio a dosis de 1 mmol/l para luego dejar incubar por 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, con ayuda del espectrofotómetro para microplacas accuSkan GO UV/VIS Microplate Fisher Scientific y el software Skanit 4.1 for Microplate Readers se midió la absorbancia a 145 nm, se procesaron los datos, obteniendo las siguientes concentraciones calibradas a 30, 40, 50, 60 y 100 microgramos equivalentes de quercetina/mililitro

2.6.4.3. Cuantificación de polisacáridos totales

Mediante el método fenol – sulfúrico propuesto por Taylor et al en 1995 (109), se elaboraron soluciones al 1% de los diferentes extractos y en 4 tubos de ensayo de 10 mililitros se colocó 1 mililitro de esta solución, 1 mililitro de fenol al 5% y 5 mililitros de ácido sulfúrico. Posteriormente, se agitó vigorosamente la solución con ayuda del Vortex Mixer de la marca Labnet, obteniendo una reacción exotérmica para finalmente ser leídas en cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro UV-VIS de la marca HACH DR 5000 a 490 nm, obteniendo las siguientes concentraciones calibradas a 10, 40, 60, 80 y 100 microgramos equivalentes de glucosa/mililitro

2.6.5. Toma de muestras de sangre humana periférica

Previa firma del consentimiento informado con las adecuadas medidas de bioseguridad se tomó 10 mililitros de sangre venosa periférica con jeringuillas de 10 mililitros en un tubo de tapa lila con EDTA de la marca Vacuette® a 5 voluntarios, aparentemente sanos.

2.6.6. Aislamiento de células linfocitarias a partir de sangre humana periférica

Se aislaron los linfocitos humanos mediante gradientes de densidad, para lo cual, se empleó Histopaque ® - 1077 de la marca Sigma-Aldrich y se complementó la metodología en base a la tesis de Juárez-Vázquez (110,111).

Para diluir la muestra, en un tubo Falcon de 50 mililitros se colocó el volumen sanguíneo recolectado y se mezcló con 10 mililitros de Buffer Fosfato Salino 1X (PBS 1X) de la marca Gibco TM. Al mismo tiempo, en otros 4 tubos falcon de 15 mililitros evitando contaminar las paredes se colocó 5 mililitros de Histopaque ® - 1077 más 5 mililitros de la dilución sanguínea previa en PBS 1X a razón de 1:1. Se centrifugó los 4 tubos a 1500 revoluciones por 30 minutos, observándose 4 fases, en la parte superior se color amarillo se encontró el plasma sanguíneo, debajo un halo opaco con las células mononucleares (linfocitos) y en la parte inferior a este se suspendió el reactivo seguido por los componentes sanguíneos

más densos. Este halo con una densidad de aproximadamente 1,077 g/ml que contenía los linfocitos se separó y se volvió a suspender en PBS 1X para ser lavados por dos ocasiones mediante centrifugación a 1200 revoluciones por minuto por 10 minutos cada una.

2.6.7. Cultivo Linfocitario

Posterior al aislamiento, en frascas de Roux de 75 mililitros se cultivó los leucocitos suspendidos en medio de RPMI 1640 de la marca Gibco™ con rojo fenol, glutamina al 1%, enriquecido con suero fetal bovino al 10% y antibiótico penicilina-estreptomicina (100 µg/ml) al 1% para evitar su contaminación. Finalmente, esta frasca se incubó por 72 horas en la incubadora con 5% de dióxido de carbono a 37 grados centígrados y atmósfera húmeda que estimuló la proliferación y adherencia a la superficie de la frasca.

2.6.8. Pase linfocitario

Cuando los linfocitos alcanzaron del 80 al 100% de proliferación celular en una frasca se pasaron a otra para prevenir la inhibición de su crecimiento debido al contacto celular y reducción de nutrientes. Para ello se preparó medio de RPMI 1640, PBS 1X y Tripsina a baño maría a una temperatura de 37 grados centígrados. Se retiraron las frascas de la incubadora y se eliminó el medio, luego se colocó 8 mililitros de PBS 1X, se removió suavemente para una mejor limpieza y se desechó, después para despegar los linfocitos adheridos a la frasca se agregó 1 mililitro de tripsina/EDTA al 0,25% e incubó por 5 minutos en la incubadora de marca Panasonic con 5% de dióxido de carbono a 37 grados centígrados y atmósfera húmeda, luego de transcurrido los 5 minutos se retiró la frasca de la incubadora y colocó 5 mililitros de RPMI suplementado para inactivar la actividad de la tripsina. A continuación, se centrifugó a 500 atmósferas durante 5 minutos la suspensión de linfocitos, se descartó el sobrenadante y se homogenizó el material celular residual en 1 mililitro de RPMI suplementado. Finalmente, el volumen resultante se dividió para las frascas con medio de RPMI 1640 de la marca Gibco™ con rojo fenol, glutamina al 1%, enriquecido con suero fetal

bovino al 10% y antibiótico penicilina-estreptomicina (100 µg/ml) al 1% e incubó por 48 horas con 5% de dióxido de carbono a 37 grados centígrados y atmósfera húmeda.

2.6.9. Conteo linfocitario

Para contar los linfocitos es necesario que estos alcancen una proliferación del 80%, para este proceso se utilizó la tinción de Azul Tripán a una relación de 1:1 (se colocó en un Eppendorf™ 100 µl de solución linfocitaria y 100 µl de Azul Tripán) que tiñó los linfocitos viables. En una cámara de Neubauer se colocó 10 µl en cada cuadrante de la solución teñida con Azul Tripán y con un microscopio óptico a 10X se observó y barrió los 4 cuadrantes. Al concluir, para determinar el número de células por cada mililitro se multiplicó el valor por 2 y luego por 10 000 (112).

2.6.10. Aplicación del extracto de *Agaricus blazei Murrill*

Los linfocitos se cultivaron en una microplaca de 96 pocillos 200 µl a una concentración linfocitaria por cada pocillo de 1×10^5 e incubó por 72 horas con 5% de dióxido de carbono a 37 grados centígrados y atmósfera húmeda. A las 72 horas de incubación, se colocó descendientemente el tratamiento de *Agaricus blazei Murrill* diluido de forma seriada de 1×10^{-1} a 1×10^{-11} en suspensión de PBS 1X previamente filtrada con microfiltro de 0,22 µm de la marca Thermo Fisher con el fin de eliminar sustancias nocivas y esterilizar la solución, luego de lo cual, se volvió a incubar por 48 horas con 5% de dióxido de carbono a 37 grados centígrados y atmósfera húmeda.

2.6.11. Método Bradford para la cuantificación de proteínas

Mediante el método de Bradford para la cuantificación de proteínas, se realizó una curva con la albúmina del suero bovino calibrada desde 0,25 a 1.75 miligramos /mililitros con acrecentamientos de 0,25 miligramos /mililitros. En una

microplaca de 96 pocillos 200 μ l, se colocó 5 μ l del extracto de *Agaricus blazei Murrill* con 150 μ l del reactivo de Bradford, se lo dejó reposar por 5 minutos y con ayuda del lector de microplacas Víctor X3 de la marca Perkin-Elmer a 595 nm se determinó la absorbancia de cada pocillo.

2.6.12. Ensayo colorimétrico MTT en linfocitos humanos

Para determinar la actividad metabólica de los linfocitos humanos tratados con los extractos de *Agaricus blazei Murrill* se utilizó el ensayo de MTT, para lo cual, se basó en las indicaciones del producto Invitrogen™ y el protocolo de Vaikundamoorthy et al (113).

Se eliminó el tratamiento con el medio de cultivo de cada pocillo y se lavó con PBS 1X por dos ocasiones. En 1 mililitro de PBS 1X se disolvió 5 miligramos de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y se colocó 10 μ l de esta solución más 100 μ l de RPMI sin rojo fenol en cada pocillo e incubó por 2 horas con 5% de dióxido de carbono a 37 grados centígrados y atmósfera húmeda. Después, se colocó 100 μ l de Dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% más 100 μ l de Ácido clorhídrico al 0,01% y volvió a incubar en similares condiciones y tiempo. Finalmente, transcurrido el tiempo, con ayuda del lector de microplacas Víctor X3 de la marca Perkin-Elmer a 570 nm se determinó la absorbancia de cada pocillo.

2.6.13. Extracción y Cuantificación del ARN linfocitario

Al terminar la incubación de los linfocitos controles y tratados, con el kit PureLink® ARN Mini Kit de la marca Thermo Fisher Scientific se procedió a extraer y cuantificar el ARN linfocitario para determinar posteriormente la expresión génica de los genes en cuestión.

Antes de empezar se preparó el buffer de lisis al 1% de 2 mercaptoetanol (10 μ l de mercaptoetanol en 1 mililitro de buffer). Para la lisis celular y homogenización se resuspendió el pellet linfocitario y se centrifugó a 12 000 gravedades a 4 grados centígrados por 2 minutos y 30 segundos, obteniendo un volumen de aproximado de 300 μ l de suspensión linfocitaria. Se colocó 300 μ l de etanol al 70% y se

vorterizó la muestra. Se transfirió 500 µl de la muestra al tubo de recolección y cartucho y por 20 segundos se centrifugó a 12 000 gravedades a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se reinsertó el cartucho en el mismo tubo de recolección. Luego, se colocó 500 µl del Buffer de lavado I y se repitió el proceso de centrifugado anterior, con la diferencia que el cartucho se colocó en un nuevo tubo de recolección, donde se colocó 500 µl del Buffer de lavado II con etanol y se centrifugó con las similares características, este proceso se lo realizó por dos ocasiones. Se centrifugó la muestra por una tercera ocasión por 60 segundos a 12 000 gravedades a temperatura ambiente y se reinsertó el cartucho en un tubo de Eppendorf™. Finalmente, se colocó 100 µl de agua libre de ARNasa en el centro del cartucho, se centrifugó la muestra a velocidad máxima por 3 minutos. Las muestras finales de ARN obtenidas fueron leídas en el Nanodrop de la marca ThermoScientific para determinar la pureza y concentración obtenida.

2.6.14. Síntesis de ADN a partir de ARN linfocitario

En un tubo de 1,5 mililitros frío libre de ARNasa se agregó 1 µl de Buffer dsDNAasa 10X, 1 µl de dsDNAasa, la muestra de ARN total obtenida y agua libre de nucleasa hasta completar 10 µl de muestra total. Se mezcló la muestra e incubó por 2 minutos en el ThermoMixer precalentado a 37 grados centígrados. Después, la muestra se dejó reposar en hielo para centrifugarla y colocar nuevamente en el bloque de hielo. Luego, se colocó y centrifugó en el mismo tubo los siguientes reactivos en este orden: 4 µl de Reaction Mix 5X, 2 µl de Máxima Enzyme Mix y 4 µl de agua libre de nucleasa. Finalmente, se incubó por diferentes intervalos de tiempo y temperatura de la siguiente forma: 10 minutos a 25 grados centígrados, 15 minutos a 50 grados centígrados y 5 minutos a 85 grados centígrados. Al culminar se almacenó la muestra a menos 20 grados centígrados.

2.6.15. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

Para determinar la expresión génica de los genes BAX y BCL-2 en los linfocitos humanos tratados con *Agaricus blazei Murrill* se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR).

Tabla 5

Secuencia de los primers utilizados

GEN	Forward Prime	Reverse Primer
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
Actina	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
BAX	CAAGACCAGGGTGGTTGGG	ATCTTTGTGGCGGGAGTG
BCL-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA

Basándonos en el protocolo GoTaq® qPCR Máster, en la cabina de flujo laminar, en 4 tubos Eppendorf™ se colocó individualmente 1 µl de Forward Prime, 1 µl de Reverse Prime, 10 µl de Mix 2X y 1,6 µl de la muestra de ADN, cada tubo se completó hasta 20 µl de agua libre de ARNasa. Finalmente se centrifugaron los tubos y se colocó en el termociclador de CFX 96 ** REAL-TIME SYSTEM de la marca Bio-Rad.

Con ayuda del protocolo de Promega se programó el equipo de CFX 96 ** REAL-TIME SYSTEM de la marca Bio-Rad a una temperatura de 95 grados centígrados por 30 segundos para activar la polimerasa, a 95 grados centígrados por 15 segundos para desnaturalizar el ADN y a 58 grados centígrados por 25 segundos durante 32 ciclos para amplificar los genes en estudio.

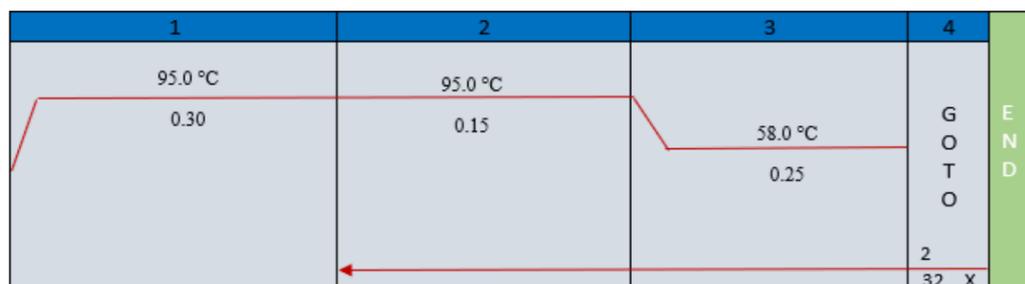


Gráfico 3 Programación equipo de CFX 96 ** REAL-TIME SYSTEM para la amplificación de los genes BAX y BCL-2

2.6.16. Determinación de la expresión génica: Método de Livak

Para determinar la expresión génica de los genes de interés en los linfocitos tratados se utilizó el método de Livak y Schmittgen o método $\Delta\Delta C_t$, utilizando las siguientes fórmulas:

Expresión génica control:

$$\Delta Ct_1 = Ct (\text{Gen diana control}) - Ct (\text{Gen Housekeeping control})$$

Expresión génica tratamiento:

$$\Delta Ct_2 = Ct (\text{Gen diana tratamiento}) - Ct (\text{Gen Housekeeping tratamiento})$$

Diferencia de la Expresión génica tratamiento – control:

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_2 (\text{Expresión génica tratamiento}) - \Delta Ct_1 (\text{Expresión génica control})$$

Expresión génica del gen diana sobre el gen housekeeping:

$$= 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

2.7. Diseño Experimental

Para el presente proyecto de investigación se utilizó dos genes housekeeping para el análisis de los genes de interés analizados por duplicado. Se empleó el software GraphPadPrism V7.0 para el análisis de los resultados y figurados como promedio la media de la desviación estándar. Además, se utilizó ANOVA para los análisis de comparativos y post test de Bonferroni - Turkey, tomando los valores menores o iguales a 0,05 como significativos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Compuestos activos del Agaricus Blazei Murrill

A partir de los extractos obtenidos del hongo Agaricus Blazei Murrill (Tabla 4), se procedió a caracterizar los compuestos bioactivos más importantes descritos con anterioridad mediante espectrometría UV-VISIBLE.

Tabla 6

Concentración de Fenoles totales en los diferentes extractos de Agaricus blazei Murrill

Compuestos bioactivos	Extractos	Concentración	Desviación estándar	Unidad de medida
Fenoles Totales	E 1	21,27	0,28	miligramos equivalentes de ácido gálico / gramo
	E 2	16,67	0,06	
	E 3	14,84	0,19	
	E 4	16,23	0,02	

En la tabla 5, los fenoles totales presentes en el extracto E 1 de Agaricus blazei Murrill presentó la mayor mayor concentración de los extractos con un valor de $21,27 \pm 0,28$ miligramos equivalentes de ácido gálico / gramo.

Tabla 7

Concentración de Flavonoides totales en los diferentes extractos de Agaricus blazei Murrill

Compuestos bioactivos	Extractos	Concentración	Desviación estándar	Unidad de medida
Flavonoides Totales	E 1	2,34	0,11	miligramos equivalentes de quercetina / gramo
	E 2	2,21	0,07	
	E 3	1,50	0,04	
	E 4	1,85	0,01	

En la Tabla 6 los flavonoides totales presentes en mayor concentración corresponden al extracto E 1, con un valor de $2,34 \pm 0,11$ miligramos equivalentes de quercetina / gramo.

Tabla 8

Concentración de Polisacáridos totales en los diferentes extractos de Agaricus blazei Murrill

Compuestos bioactivos	Extractos	Concentración	Desviación estándar	Unidad de medida
Polisacáridos Totales	E 1	192,41	0,53	miligramos equivalentes de glucosa / gramo
	E 2	133,38	0,33	
	E 3	82,09	0,73	
	E 4	59,73	0,53	

La concentración de polisacáridos totales mostrados en la Tabla 7, el extracto E 1 mostró la mayor cantidad con un valor de $192,41 \pm 0,53$ miligramos equivalentes de glucosa / gramo.

Se demostró que las condiciones aplicadas en el procesamiento del extracto E 1, el cual fue diluido en agua destilada durante 1 hora a 100 grados centígrados permitió obtener una mayor concentración de los principales compuestos bioactivos presentes en el Agaricus blazei Murrill. Además, el compuesto biológico presente en mayor cantidad en los 4 extractos fueron los polisacáridos, seguidos por fenoles y en menor cantidad los flavonoides como se muestra en la siguiente figura.

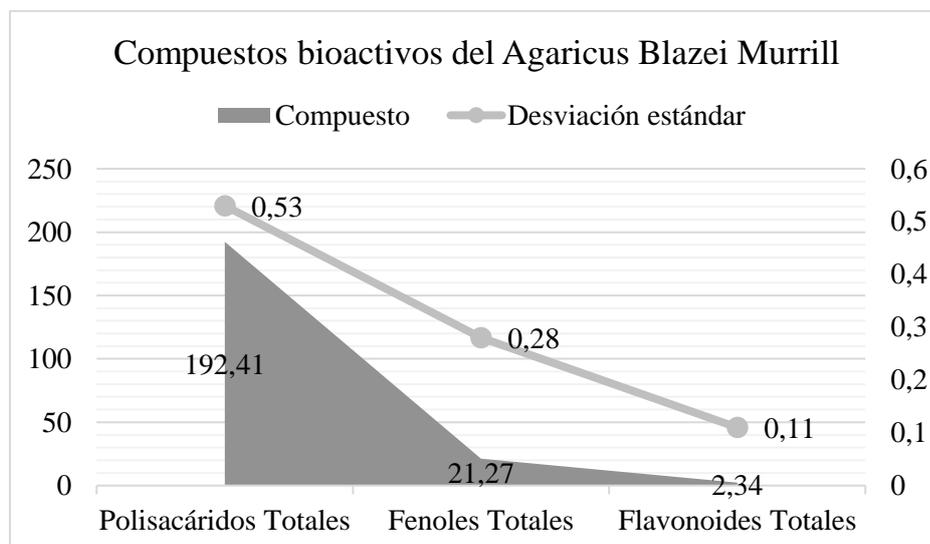


Gráfico 4 *Compuestos bioactivos del Agaricus Blazei Murrill*

Se comparó la cantidad y condiciones de extracción de los compuestos bioactivos del *Agaricus blazei* Murrill con estudios similares. Boonsong et al. en su estudio sobre las actividades antioxidantes de cinco hongos comestibles usando diferentes solventes para los extractos demostró que el contenido de fenoles y flavonoides del hongo *Lentinus edodes* es mayor en agua destilada con un valor de 36.19 ± 0.59 mg GAE/g y 3.75 ± 0.28 mg GAE/g , respectivamente, en comparación a soluciones con alcohol al 50% con un valor de 24.25 ± 0.49 mg GAE/g y 1.64 ± 0.36 mg GAE/g (114). En estudios realizados con especies de la familia Agaricaceae; Carneiro et al. demostró que los compuestos bioactivos obtenidos en un primer ensayo con agua destilada y etanol fueron relativamente similares (115). De la misma forma, Carvajal et al, demostró que los extractos diluidos en agua obtuvieron una mayor concentración de polifenoles con un valor superior a 20 mg GAE/g (116).

La mayor concentración de metabolitos obtenidos correspondientes al cuerpo fructífero del hongo fueron los polisacáridos en un valor promedio de 126 mg GAE/g en las extracciones con agua caliente que aquellas con alcohol al 50%. Al ser el principal compuesto del *Agaricus blazei* Murrill varios estudios se han centrado en su identificación, extracción y purificación, logrando demostrar la actividad inmunomoduladora y antitumoral de este compuesto (117). Estudios realizados por Liu & Sun et al. y Wu et al. evidenciaron concentraciones de polisacáridos superiores a 900 mg GAE/g en extractos purificados de *Agaricus blazei* Murrill, quienes otorgaron el efecto apoptótico e inhibidor del crecimiento de células cancerígenas a estos compuestos (118,119).

3.1.2. Actividad inmunomoduladora del *Agaricus Blazei* Murrill

Una vez determinado que el extracto E 1 contenía la mayor concentración de compuestos de ABM, se empleó en los linfocitos humanos para determinar la capacidad inmunomoduladora de dicho extracto.

Se obtuvo una concentración al 10^6 de los compuestos bioactivos del extracto E 1 en miligramos resuspendidos en mililitros de PBS 1X como muestra la Tabla 9.

Tabla 9
Concentración de los compuestos bioactivos

Extracto	Polisacáridos Totales	Polifenoles Totales	Flavonoides Totales	Compuestos Totales
ABM 10°	2,93 mg/ml	10,27 mg/ml	1,13 mg/ml	483 mg/ml

Varias investigaciones han demostrado que los compuestos bioactivos de la familia Agaricaceae, principalmente los polisacáridos, actúan directamente sobre el sistema inmunitario desencadenando la producción de anticuerpos y activación de linfocitos, macrófagos y neutrófilos (120–122).

En el ensayo MTT, al emplear los tratamientos en diferentes concentraciones seriadas de 10^{-11} a 10^{-1} en \log_{10} a los linfocitos, el porcentaje de proliferación celular se incrementó proporcionalmente a la concentración del tratamiento. La concentración de 10^{-1} mostró la mayor tasa de proliferación con un incremento del 41,25%, obteniendo un valor EC50 de $0,30 \pm 0,088$ mg/ml, sin descartar la efectividad del extracto en un rango de 0,18 a 0,47 mg/ml.

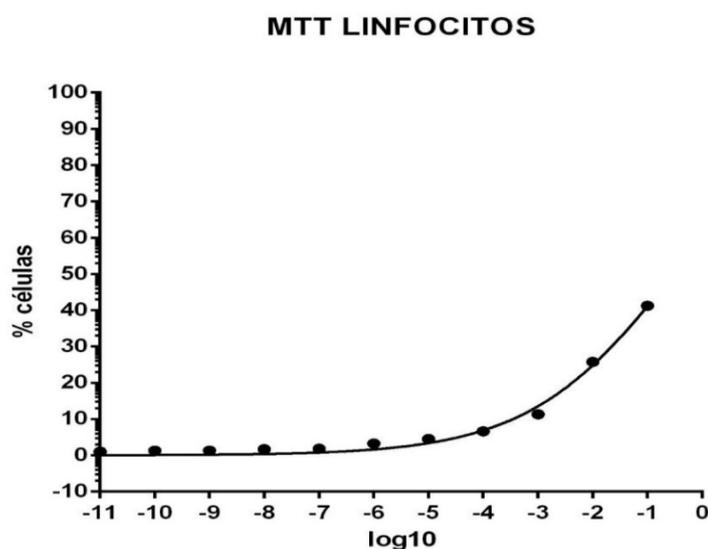


Gráfico 5 *Proliferación de los linfocitos tratados con ABM*

Al igual que en el estudio realizado por Tangen et al. (123), el extracto de ABM tiene la capacidad de inducir la proliferación de los linfocitos demostrando que sus compuestos no tienen efectos citotóxicos sobre los mismos.

3.1.3. Expresión génica de BAX y BCL-2

Una vez obtenidos los resultados de los Cts relativos de los genes housekeeping GADPH y Actina, y los genes de interés BAX y BCL-2 en linfocitos tratados con el extracto E 1 de *Agaricus blazei* Murrill a través de la RTqPCR (Tabla 10 - 12), se utilizó el método de Livak y Schmittgen o método $\Delta\Delta C_t$.

Tabla 10

CT de los genes housekeeping

GENES HOUSEKEEPING			
LINFOCITOS CONTROL	CT1	CT2	PROMEDIO
C1 ACTINA	27,26	32,69	29,98
C1 GADPH	22,55	23,98	23,27
LINFOCITOS TRATADOS	CT1	CT2	PROMEDIO
ABM ACTINA	26,01	27,69	26,85
ABM GADPH	22,95	22,41	22,68

La Tabla 10 muestra el promedio de los genes de control endógeno Actina y GADPH obtenidos mediante RTqPCR, el tratamiento con los extractos de ABM reducen su expresión relativa. La relación de la media con los promedios de los Cts medidos presentaron variaciones significativas $P < 0,05$.

Tabla 11

CT del gen de interés BAX

GEN DE INTERÉS BAX			
LINFOCITOS CONTROL	CT1	CT2	PROMEDIO
C1 BAX	32,43	31,66	32,05
LINFOCITOS TRATADOS	CT1	CT2	PROMEDIO
ABM BAX	30,07	28,99	29,53

Tabla 12

CT del gen de interés BCL-2

GEN DE INTERES BCL-2			
LINFOCITOS CONTROL	CT1	CT2	PROMEDIO
C1 BCL-2	29,72	32,1	30,91
LINFOCITOS TRATADOS	CT1	CT2	PROMEDIO
ABM BCL-2	29,46	27,47	28,47

Las Tablas 11 y 12, muestran la expresión relativa de los genes de interés BAX y BCL-2 respectivamente en los linfocitos control y linfocitos tratados con ABM.

Tabla 13

ΔCT De BAX y BCL2 en linfocitos control y tratados con ABM (Actina)

	GEN ACTINA VS BAX	GEN ACTINA VS BCL-2
ΔCT LINFOCITOS CONTROL	2,07	0,93
ΔCT LINFOCITOS TRATADOS	2,68	1,62
ΔΔCT	0,61	0,68
EXPRESIÓN	0,66	0,62

Tabla 14

ΔCT De BAX y BCL2 en linfocitos control y tratados con ABM (GADPH)

	GEN GADPH VS BAX	GEN GADPH VS BCL-2
ΔCT LINFOCITOS CONTROL	8,78	7,65
ΔCT LINFOCITOS TRATADOS	6,85	5,79
ΔΔCT	-1,93	-1,86
EXPRESIÓN	3,81	3,63

La Tabla 13 y 14, según el método $\Delta\Delta C_t$, muestra la expresión relativa normalizada de las proteínas BAX y BCL-2 en relación con el gen de control endógeno Actina y GADPH versus la expresión de los genes de interés en los linfocitos tratados con los extractos de *Agaricus blazei* Murrill y los linfocitos sin tratamiento. Sin embargo, el gen de control endógeno que más significancia aporta a la investigación es GADPH que ha mostrado triplicar la expresión de las proteínas BAX y BCL-2 en los linfocitos tratados. Se determinó dicha significancia estadística mediante la prueba ANOVA ($P < 0.001$). Además, en ambas tablas la expresión génica varía en los linfocitos tratados.

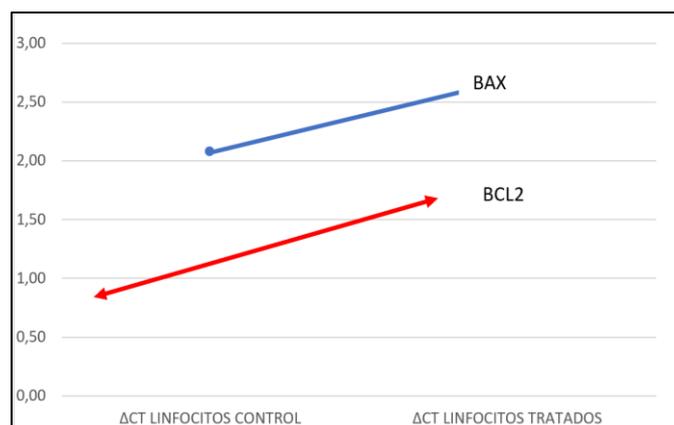


Gráfico 6 Aumento de la expresión de BAX Y BCL2 en linfocitos tratados con ABM. Relación BAX/BCL2: 1.65 $p \leq 0,05$.

Los resultados muestran que la expresión génica de las proteínas proapoptóticas en los linfocitos que recibieron el tratamiento varían. El aumento de BAX y BCL-2 es importante pero no significativo en ambos genes, por lo que al relacionar BAX/BCL-2 se obtiene valores por encima de 1 que pronosticarían la inducción de la apoptosis.

3.2. Discusión de los resultados

El presente trabajo de investigación pretende aportar sobre los efectos bioactivos del hongo *Agaricus blazei Murrill* en linfocitos humanos aparentemente sanos obtenidos de sangre periférica como complemento y aplicación para líneas celulares cancerígenas. En la actualidad, el tratamiento convencional del cáncer no ha demostrado ser efectivo en su totalidad debido a la quimiorresistencia del mismo inducida en parte por mutaciones de los genes responsables de la apoptosis, por lo que, varios estudios se han enfocado en el potencial de diferentes activos biológicos de plantas y hongos como posibles tratamientos o adyuvantes en el tratamiento de esta patología (124). Bajo esta premisa, las nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer son la inhibición de la proliferación celular y/o la inducción de la apoptosis (125).

En un ensayo con linfocitos del pollo, Liu et al. demostró el potencial proapoptótico de los polisacáridos del *Agaricus blazei Murrill* (ABM) al alimentar con 0,2 mililitros del mismo a dosis de 30 miligramos por cada mililitro y Cadmio, obteniendo que el ABM incrementó la tasa de apoptosis en la población tratada

con cadmio significativamente, debido al incremento de la relación BAX/BCL-2; por otra parte este extracto podría inhibir la apoptosis y la activación de la vía de señalización de los receptores tipo Toll-4 (TLR-4) provocando una disminución de las concentraciones de citocinas inflamatorias, desempeñando un efecto protector en las lesiones inducidas por el Cadmio en los linfocitos del pollo (126). Los receptores tipo Toll (TLR), es un grupo de receptores de reconocimiento de patrones de polisacáridos, alcaloides y melaninas vegetales (127). Identificados por primera vez en las moscas de la fruta, se han detectado 27 tipos de proteínas similares en las células humanas (128). Uno de estos tipos de proteínas, son los receptores TLR-4 presentes en las membranas celulares de los linfocitos, macrófagos y otros tejidos celulares (129,130). La estimulación de estos receptores transducen señales importantes en la liberación de citocinas inflamatorias y en la mediación de la respuesta inmune innata (131). Estas propiedades han sido demostradas en anteriores investigaciones, en las que se demostró que polisacáridos naturales activaron la vía de señalización de TLR-4 (132).

Sun et al. ha demostrado la actividad antitumoral del extracto de *Agaricus blazei Murrill* debido a la disminución del conteo celular e inducción de la apoptosis en células de leucemia mieloide crónica in vitro, acompañadas de una elevada expresión de BAX y una reducción de BCL-2 (133). Este mecanismo proapoptótico está presente en otras especies de la familia Agaricaceae, como en el *Agaricus lanipes* y *Agaricus bisporus*, que en estudios realizados por Kaygusuz et al. y Ghosh et al. en líneas celulares de cáncer pulmonar A549, cáncer cervical HeLa y cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 se demostró que en las células tratadas con extractos de *A. lanipes* y *A. bisporus* respectivamente, mostraron una disminución de los genes BCL-2, mientras que, los genes BAX, Caspasa-3, Caspasa-9 y p65 incrementaron su expresión induciendo la muerte de las líneas celulares cancerígenas (134,135).

El aumento significativo de la expresión génica de BAX con relación a BCL-2 en la presente investigación, resultó en la apoptosis de los linfocitos humanos tratados con ABM. Sin embargo, la disminución de la expresión de BCL-2 poco significativa no aleja el efecto proapoptótico de este extracto, ya que, durante la realización de los diferentes ensayos para demostrar y cuantificar los efectos citotóxicos e inductores genéticos de la apoptosis del *Agaricus blazei Murrill* en

linfocitos humanos corroboran la finalidad de los posibles usos de estos extractos como un tratamiento o terapia adyuvante antineoplásica en líneas celulares cancerígenas. Este resultado es respaldado fuertemente por otros estudios con agentes anticancerígenos naturales que han demostrado regular la expresión génica de la familia BCL-2 y su oligómero BAX; en donde, los niveles de BAX se incrementan de forma exponencial y BCL-2 demuestra cambios ligeros pero no poco importantes en la inducción de la apoptosis (136,137).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Los linfocitos tratados con *Agaricus blazei Murrill* aumentan la expresión de las proteínas BAX y BCL-2
- La relación de expresión de las proteínas BAX/BCL-2 mayor o igual a 1 demostró tener efectos apoptóticos en los linfocitos tratados con *Agaricus blazei Murrill*.
- Las proteínas BAX y BCL-2 demostraron ser importantes marcadores para la inducción de la apoptosis en células humanas.
- La expresión génica de BAX induce la apoptosis indistintamente a BCL-2.
- Los extractos de *Agaricus blazei Murrill* demostraron ser importantes compuestos bioactivos capaces de aumentar la expresión de genes proapoptóticos, como BAX y BCL-2, para inducir la apoptosis de los linfocitos y ser considerado en futuras terapias anticancerígenas.

4.2. Recomendaciones

- Investigar la expresión de las proteínas BAX y BCL-2 en otras células de tejidos humanos.
- Determinar la expresión de otros marcadores genéticos de la apoptosis en linfocitos tratados con *Agaricus blazei Murrill*.
- Evaluar la actividad biológica del *Agaricus blazei Murrill* como terapia adyuvante en linfocitos de pacientes con enfermedades mieloproliferativas.
- Valorar la actividad antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucémica e hipolipemiente del *Agaricus blazei Murrill*.
- Realizar ensayos de caracterización fitoquímica del hongo a fin de establecer los compuestos activos que inducen la apoptosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(1):7-33.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
3. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]. 2018 [citado 11 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. Censos IN de E y. Defunciones Generales – 2019 [Internet]. Instituto Nacional de Estadística y Censos. [citado 12 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/defunciones-generales-2019/>
5. Lortet-Tieulent J, Georges D, Bray F, Vaccarella S. Profiling global cancer incidence and mortality by socioeconomic development. *Int J Cancer*. 1 de diciembre de 2020;147(11):3029-36.
6. Bray F, Jemal A, Torre LA, Forman D, Vineis P. Long-term Realism and Cost-effectiveness: Primary Prevention in Combatting Cancer and Associated Inequalities Worldwide. *J Natl Cancer Inst*. diciembre de 2015;107(12):d1v273.
7. Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet*. 8 de febrero de 2014;383(9916):549-57.
8. Leveille E, Johnson NA. Genetic Events Inhibiting Apoptosis in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 30 de abril de 2021;13(9):2167.
9. Shimizu T, Kawai J, Ouchi K, Kikuchi H, Osima Y, Hidemi R. Agarol, an ergosterol derivative from *Agaricus blazei*, induces caspase-independent apoptosis in human cancer cells. *International Journal of Oncology*. 1 de abril de 2016;48(4):1670-8.

10. Matsushita Y, Furutani Y, Matsuoka R, Furukawa T. Hot water extract of *Agaricus blazei* Murrill specifically inhibits growth and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 4 de diciembre de 2018;18(1):319.
11. Baldassano S, Accardi G, Vasto S. Beta-glucans and cancer: The influence of inflammation and gut peptide. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 15 de diciembre de 2017;142:486-92.
12. Ayeka PA. Potential of Mushroom Compounds as Immunomodulators in Cancer Immunotherapy: A Review [Internet]. Vol. 2018, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi; 2018 [citado 14 de septiembre de 2020]. p. e7271509. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/7271509/>
13. Singdevsachan SK, Auroshree P, Mishra J, Baliyarsingh B, Tayung K, Thatoi H. Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.* 1 de enero de 2016;7(1):1-14.
14. Mescher AL. The Nucleus. En: Junqueira's Basic Histology Text and Atlas [Internet]. 16.^a ed. New York, NY: McGraw Hill; 2021 [citado 12 de agosto de 2021]. Disponible en: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1180411936
15. Glennon EKK, Vijayan K, Kaushansky A. Cell Death. En: Kaushansky K, Prchal JT, Burns LJ, Lichtman MA, Levi M, Linch DC, editores. *Williams Hematology* [Internet]. 10.^a ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2021 [citado 12 de agosto de 2021]. Disponible en: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1178737030
16. Ramirez MLG, Salvesen GS. A primer on caspase mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* octubre de 2018;82:79-85.
17. Debatin KM, Stahnke K, Fulda S. Apoptosis in hematological disorders. *Semin Cancer Biol.* abril de 2003;13(2):149-58.
18. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* mayo de 2000;6(5):513-9.

19. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2008;9(1):47-59.
20. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2011;1813(4):521-31.
21. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* abril de 2002;2(4):277-88.
22. Dennis LK, Lynch CF, Brown HE, Laukaitis CM, Lashway S, Smith EM. Cancer. En: Boulton ML, Wallace RB, editores. *Maxcy-Rosenau-Last Public Health & Preventive Medicine [Internet]*. 16.^a ed. New York, NY: McGraw Hill; 2022 [citado 11 de agosto de 2021]. Disponible en: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1182671262
23. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. [Internet]. 2020 [citado 3 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
24. Jacob M, Varghese J, Weil PA. Cancer: An Overview. En: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA, editores. *Harper's Illustrated Biochemistry [Internet]*. 31.^a ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018 [citado 11 de agosto de 2021]. Disponible en: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160193846
25. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* enero de 2017;67(1):7-30.
26. Howlader N, Noone A, Krapcho M. Cancer Statistics Review, 1975-2014 - SEER Statistics [Internet]. 2017 [citado 12 de agosto de 2021]. Disponible en: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2014/
27. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted

- Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 1 de abril de 2017;3(4):524-48.
28. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
 29. Yasuma T, Toda M, Kobori H, Tada N, D'Alessandro-Gabazza CN, Gabazza EC. Subcritical Water Extracts from *Agaricus blazei* Murrill's Mycelium Inhibit the Expression of Immune Checkpoint Molecules and Axl Receptor. *Journal of Fungi.* agosto de 2021;7(8):590.
 30. Patel DK, Dutta SD, Ganguly K, Cho S-J, Lim K-T. Mushroom-Derived Bioactive Molecules as Immunotherapeutic Agents: A Review. *Molecules.* enero de 2021;26(5):1359.
 31. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacotoxicological Problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2008;5(1):3-15.
 32. Itoh H, Ito H, Hibasami H. Blazein of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (*himematsutake*) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. *Oncology Reports.* 1 de diciembre de 2008;20(6):1359-61.
 33. Akiyama H, Endo M, Matsui T, Katsuda I, Emi N, Kawamoto Y, et al. Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1 de mayo de 2011;1810(5):519-25.
 34. Cheng M-X, Yu S-R, Wang Z-D, Bai K-T, Wang D-P, Li J, et al. [Inhibitory Effects of *Agaricus Blazei* Murrill (FA-2-b- β) on Proliferation of Chronic Myeloid Leukemia Cells in vivo and Its Mechanism]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* diciembre de 2020;28(6):1885-91.
 35. Jiang L, Yu Z, Lin Y, Cui L, Yao S, Lv L, et al. Low-molecular-weight polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill modulate the Th1 response in cancer immunity. *Oncology Letters.* 1 de marzo de 2018;15(3):3429-36.

36. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* marzo de 2018;25(3):486-541.
37. Fond AM, Ravichandran KS. Clearance of Dying Cells by Phagocytes: Mechanisms and Implications for Disease Pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2016;930:25-49.
38. Poręba M, Stróżyk A, Salvesen GS, Drąg M. Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* agosto de 2013;5(8):a008680.
39. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 de septiembre de 1999;96(20):10964-7.
40. Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis.* octubre de 2017;22(10):1189-204.
41. Walensky LD, Gavathiotis E. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends Biochem Sci.* diciembre de 2011;36(12):642-52.
42. Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. Ninth edition. New York: McGraw-Hill Education; 2019. 1 p.
43. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 12 de enero de 2015;7(12):a006080.
44. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de abril de 2013;5(4):a008714.
45. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* enero de 2018;25(1):46-55.
46. Große L, Wurm CA, Brüser C, Neumann D, Jans DC, Jakobs S. Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *EMBO J.* 15 de febrero de 2016;35(4):402-13.

47. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 1 de junio de 2005;19(11):1294-305.
48. Gillies LA, Du H, Peters B, Knudson CM, Newmeyer DD, Kuwana T. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. *Mol Biol Cell.* 15 de enero de 2015;26(2):339-49.
49. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 27 de enero de 2017;17(2):93-115.
50. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS. *Cell.* 9 de febrero de 2017;168(4):670-91.
51. Fitzmaurice C, Akinyemiju TF, Al Lami FH, Alam T, Alizadeh-Navaei R, Allen C, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016. *JAMA Oncol* [Internet]. noviembre de 2018 [citado 16 de agosto de 2021];4(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6248091/>
52. Global Burden of Disease Study 2016 (GBD 2016) Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life Years 1990-2016 | GHDx [Internet]. [citado 16 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://ghdx.healthdata.org/record/ihme-data/gbd-2016-cancer-incidence-mortality-years-life-lost-years>
53. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med.* 27 de octubre de 2005;353(17):1784-92.
54. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 5 de agosto de 2008;149(3):185-91.
55. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science.* 24 de marzo de 2017;355(6331):1330-4.

56. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 28 de marzo de 2013;153(1):17-37.
57. Mucci LA, Hjelmberg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*. 5 de enero de 2016;315(1):68-76.
58. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL, Buffler PA, Omenn GS. Current perspective on the global and United States cancer burden attributable to lifestyle and environmental risk factors. *Annu Rev Public Health*. 2013;34:97-117.
59. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 19 de noviembre de 2005;366(9499):1784-93.
60. Whiteman DC, Wilson LF. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiol*. octubre de 2016;44:203-21.
61. Lee Y-CA, Hashibe M. Tobacco, alcohol, and cancer in low and high income countries. *Ann Glob Health*. octubre de 2014;80(5):378-83.
62. Cullen JW, Blot W, Henningfield J, Boyd G, Mecklenburg R, Massey MM. Health consequences of using smokeless tobacco: summary of the Advisory Committee's report to the Surgeon General. *Public Health Rep*. agosto de 1986;101(4):355-73.
63. Roswall N, Weiderpass E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective. *J Prev Med Public Health*. enero de 2015;48(1):1-9.
64. Malhotra J, Praud D, Boffetta P. Changes in the trend of alcohol-related cancers: perspectives on statistical trends. *Chem Res Toxicol*. 21 de septiembre de 2015;28(9):1661-5.
65. Nelson DE, Jarman DW, Rehm J, Greenfield TK, Rey G, Kerr WC, et al. Alcohol-attributable cancer deaths and years of potential life lost in the United States. *Am J Public Health*. abril de 2013;103(4):641-8.

66. Welzel TM, Graubard BI, Quraishi S, Zeuzem S, Davila JA, El-Serag HB, et al. Population-attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol*. agosto de 2013;108(8):1314-21.
67. Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M. Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence. *Int J Cancer*. 20 de septiembre de 2004;111(5):647-52.
68. Ionizing radiation, part 2: some internally deposited radionuclides. Views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 14-21 June 2000. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2001;78(Pt 2):1-559.
69. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, et al. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de noviembre de 2003;100(24):13761-6.
70. UNSCEAR 2000. The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Health Phys*. septiembre de 2000;79(3):314.
71. Darby S, Hill D, Deo H, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, et al. Residential radon and lung cancer--detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14,208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe. *Scand J Work Environ Health*. 2006;32 Suppl 1:1-83.
72. Kim S-H, Hwang WJ, Cho J-S, Kang DR. Attributable risk of lung cancer deaths due to indoor radon exposure. *Ann Occup Environ Med*. 2016;28:8.
73. Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography--an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med*. 29 de noviembre de 2007;357(22):2277-84.
74. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. septiembre de 2016;4(9):e609-616.

75. Casper C, Fitzmaurice C. Infection-related cancers: prioritising an important and eliminable contributor to the global cancer burden. *Lancet Glob Health*. septiembre de 2016;4(9):e580-581.
76. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2010;23(4):713-39.
77. Saraiya M, Unger ER, Thompson TD, Lynch CF, Hernandez BY, Lyu CW, et al. US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst*. junio de 2015;107(6):djv086.
78. Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 26 de septiembre de 2017;9(10):E1063.
79. Goodwin PJ, Stambolic V. Impact of the obesity epidemic on cancer. *Annu Rev Med*. 2015;66:281-96.
80. de Rezende LFM, Rodrigues Lopes M, Rey-López JP, Matsudo VKR, Luiz O do C. Sedentary behavior and health outcomes: an overview of systematic reviews. *PLoS One*. 2014;9(8):e105620.
81. Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr*. noviembre de 2002;132(11 Suppl):3456S-3464S.
82. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 23 de agosto de 2004;23(38):6445-70.
83. Robson ME, Storm CD, Weitzel J, Wollins DS, Offit K, American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*. 10 de febrero de 2010;28(5):893-901.

84. Rock CL, Thomson C, Gansler T, Gapstur SM, McCullough ML, Patel AV, et al. American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(4):245-71.
85. Siu AL, U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 16 de febrero de 2016;164(4):279-96.
86. US Preventive Services Task Force, Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, et al. Screening for Cervical Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 21 de agosto de 2018;320(7):674-86.
87. US Preventive Services Task Force, Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 21 de junio de 2016;315(23):2564-75.
88. Moyer VA, U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 17 de julio de 2012;157(2):120-34.
89. Wei Q, Li J, Zhan Y, Zhong Q, Xie B, Chen L, et al. Enhancement of glucose homeostasis through the PI3K/Akt signaling pathway by dietary with *Agaricus blazei* Murrill in STZ-induced diabetic rats. *Food Sci Nutr*. febrero de 2020;8(2):1104-14.
90. Taofiq O, Corrêa RCG, Barros L, Prieto MA, Bracht A, Peralta RM, et al. A comparative study between conventional and non-conventional extraction techniques for the recovery of ergosterol from *Agaricus blazei* Murrill. *Food Research International*. noviembre de 2019;125:108541.
91. Wang H, Fu Z, Han C. The Medicinal Values of Culinary-Medicinal Royal Sun Mushroom (*Agaricus blazei* Murrill). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:842619.
92. Zhai F-H, Wang Q, Han J-R. Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. *Journal of Cereal Science*. 1 de septiembre de 2015;65:202-8.

93. Lima CUJO, Gris EF, Karnikowski MGO. Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 1 de noviembre de 2016;26(6):780-6.
94. Sari M, Prange A, Lelley JI, Hambitzer R. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chem*. 1 de febrero de 2017;216:45-51.
95. Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev*. febrero de 2000;5(1):4-27.
96. Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol Pharm Bull*. julio de 2001;24(7):820-8.
97. Su Z-Y, Tung Y-C, Hwang LS, Sheen L-Y. Blazeispirol A from *Agaricus blazei* fermentation product induces cell death in human hepatoma Hep 3B cells through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Agric Food Chem*. 11 de mayo de 2011;59(9):5109-16.
98. Ziliotto L, Pinheiro F, Barbisan LF, Rodrigues MAM. Screening for in vitro and in vivo antitumor activities of the mushroom *Agaricus blazei*. *Nutr Cancer*. 2009;61(2):245-50.
99. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 30 de abril de 2009;458(7242):1127-30.
100. Tung Y-C, Su Z-Y, Kuo M-L, Sheen L-Y. Ethanolic Extract of *Agaricus blazei* Fermentation Product Inhibits the Growth and Invasion of Human Hepatoma HA22T/VGH and SK-Hep-1 Cells. *J Tradit Complement Med*. abril de 2012;2(2):145-53.
101. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P, Méndez Valencia S, Mendoza Torres CP. *Metodología de la investigación*. México, D.F.: McGraw-Hill Education; 2014.

102. Carbonero ER, Ruthes AC, Freitas CS, Utrilla P, Gálvez J, da Silva EV, et al. Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydr Polym.* 1 de octubre de 2012;90(2):814-9.
103. Camellini CM, Maraschin M, de Mendonça MM, Zucco C, Ferreira AG, Tavares LA. Structural characterization of beta-glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnol Lett.* septiembre de 2005;27(17):1295-9.
104. Kim Y-W, Kim K-H, Choi H-J, Lee D-S. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol Lett.* 1 de abril de 2005;27(7):483-7.
105. Carvajal de Pabón LM, Turbay S, Rojano B, Álvarez LM, Luz Restrepo S, Álvarez JM, et al. Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* diciembre de 2011;16(4):354-63.
106. García Martínez EM, Fernández Segovia I, Fuentes López A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu [Internet] [Artículo Docente]. [España]: Universitat Politècnica de València; 2015. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056?show=full>
107. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric.* enero de 2015;95(1):204-9.
108. Sembiring E, Elya B, Sauriasari R, Sauriasari R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal.* 2018;10(1):123-7.
109. Taylor KACC. A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Appl Biochem Biotechnol.* 1 de junio de 1995;53(3):207-14.

110. Sigma-Aldrich Co. LLC. Histopaque-1077 Product Information [Internet]. Sigma-Aldrich Co. LLC.; 2020. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/351/859/10771pis.pdf>
111. Juarez Vazquez MDC. Actividad inmunomoduladora in vitro de extractos y compuestos de plantas mexicanas medicinales [Internet] [Tesis de licenciatura]. [México, D.F.]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. Disponible en: https://repositorio.unam.mx/contenidos/actividad-inmunomoduladora-in-vitro-de-extractos-y-compuestos-de-plantas-mexicanas-medicinales-305631?c=r6EOV2&d=true&q=:*:*&i=1&v=1&t=search_0&as=0
112. Williams Ibarra JA, Carrero Castillo YN. Capacidad proapoptótica in vitro de Valeriana rígida y Valeriana decussata en células cancerígenas [Internet]. [ECUADOR]: UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO; 2021. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32130/1/BQ%20263.pdf>
113. Vaikundamoorthy R, Krishnamoorthy V, Vilwanathan R, Rajendran R. Structural characterization and anticancer activity (MCF7 and MDA-MB-231) of polysaccharides fractionated from brown seaweed *Sargassum wightii*. *Int J Biol Macromol.* mayo de 2018;111:1229-37.
114. Boonsong S, Klaypradit W, Wilaipun P. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources.* 1 de marzo de 2016;50(2):89-97.
115. Carneiro AAJ, Ferreira ICFR, Dueñas M, Barros L, da Silva R, Gomes E, et al. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry.* 15 de junio de 2013;138(4):2168-73.
116. Carvajal AESS, Koehnlein EA, Soares AA, Eler GJ, Nakashima ATA, Bracht A, et al. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology.* 1 de mayo de 2012;46(2):493-9.

117. da Silva Campelo M, Neto JFC, Lima ABN, das Chagas Neto FC, da Costa Gonzaga ML, de Aguiar Soares S, et al. Polysaccharides and extracts from *Agaricus brasiliensis* Murill - A comprehensive review. *Int J Biol Macromol*. 31 de julio de 2021;183:1697-714.
118. Liu J, Sun Y. Structural analysis of an alkali-extractable and water-soluble polysaccharide (ABP-AW1) from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers*. 15 de agosto de 2011;86(2):429-32.
119. Wu B, Cui J, Zhang C, Li Z. A polysaccharide from *Agaricus blazei* inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. *Int J Biol Macromol*. 1 de mayo de 2012;50(4):1116-20.
120. Liu G, Ye J, Li W, Zhang J, Wang Q, Zhu X-A, et al. Extraction, structural characterization, and immunobiological activity of ABP Ia polysaccharide from *Agaricus bisporus*. *Int J Biol Macromol*. 1 de noviembre de 2020;162:975-84.
121. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacotoxicological Problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008;5(1):3-15.
122. Yamanaka D, Shoda M, Matsubara T, Ishibashi K-I, Motoi A, Motoi R, et al. Open-Label Study of the Influence of Food Containing the Royal Sun Mushroom, *Agaricus brasiliensis* KA21 (*Agaricomycetes*), on β -Glucan-Specific Antibody Production in Healthy Human Volunteers. *Int J Med Mushrooms*. 2021;23(2):13-28.
123. Tangen J-M, Holien T, Mirlashari MR, Misund K, Hetland G. Cytotoxic Effect on Human Myeloma Cells and Leukemic Cells by the *Agaricus blazei* Murill Based Mushroom Extract, Andosan™ [Internet]. Vol. 2017, BioMed Research International. Hindawi; 2017 [citado 15 de septiembre de 2020]. p. e2059825. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2059825/>
124. Ryu H, Nam K-Y, Kim JS, Hwang S-G, Song J-Y, Ahn J. The small molecule AU14022 promotes colorectal cancer cell death via p53-mediated G2/M-phase arrest and mitochondria-mediated apoptosis. *J Cell Physiol*. junio de 2018;233(6):4666-76.

125. Sun S, Zhang C, Gao J, Qin Q, Zhang Y, Zhu H, et al. Benzoquinone induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 cells. *Toxicol Ind Health*. abril de 2018;34(4):270-81.
126. Liu W, Ge M, Hu X, Lv A, Ma D, Huang X, et al. The Effects of *Agaricus blazei* Murill Polysaccharides on Cadmium-Induced Apoptosis and the TLR4 Signaling Pathway of Peripheral Blood Lymphocytes in Chicken. *Biol Trace Elem Res*. 1 de noviembre de 2017;180(1):153-63.
127. Yoon YD, Han SB, Kang JS, Lee CW, Park S-K, Lee HS, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum*. *Int Immunopharmacol*. diciembre de 2003;3(13-14):1873-82.
128. Wang J, Zhang Z, Fu H, Zhang S, Liu J, Chang F, et al. Structural and evolutionary characteristics of fish-specific TLR19. *Fish & Shellfish Immunology*. 1 de noviembre de 2015;47(1):271-9.
129. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull*. mayo de 2005;28(5):886-92.
130. Williams DL, Ozment-Skelton T, Li C. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Shock*. mayo de 2006;25(5):432-9.
131. McGuire K, Jones M, Werling D, Williams JL, Glass EJ, Jann O. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim Genet*. febrero de 2006;37(1):47-50.
132. Park H-J, Hong J, Kwon H-J, Kim Y, Lee K-H, Kim J-B, et al. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 4 de junio de 2010;396(3):721-5.
133. Sun Y, Cheng M, Dong L, Yang K, Ma Z, Yu S, et al. *Agaricus blazei* extract (FA-2-b- β) induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Oncology Letters*. 1 de noviembre de 2020;20(5):1-1.

134. Kaygusuz O, Kaygusuz M, Dodurga Y, Seçme M, Herken EN, Gezer K. Assessment of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of the wild edible mushroom *Agaricus lanipes* (F.H. Møller & Jul. Schäff.) Hlaváček. *Cytotechnology*. 1 de febrero de 2017;69(1):135-44.
135. Ghosh S, Sanyal T, Bera T. ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECT OF METHANOLIC EXTRACT OF EDIBLE MUSHROOM *Agaricus bisporus* AGAINST HELA, MCF-7 AND MDA-MB- 231 CELL LINES OF HUMAN CANCER AND CHEMOPROFILE BY GC-MS. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 1 de enero de 2020;21:109-22.
136. Liang J, Wang W, Wei L, Gao S, Wang Y. Oridonin inhibits growth and induces apoptosis of human neurocytoma cells via the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncol Lett*. septiembre de 2018;16(3):3333-40.
137. Srivastava R, Cao Z, Nedeva C, Naim S, Bachmann D, Rabachini T, et al. BCL-2 family protein BOK is a positive regulator of uridine metabolism in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 de julio de 2019;116(31):15469-74.