



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

**DETECCIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE
UNA LACASA DE *Agrocybe aff. pediades* APLICADA A
CÉLULAS CANCEROSAS PULMONARES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA

BIÓL. JANETE FLORES VEGA

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DRA. ROSA ANGÉLICA CASTILLO RODRÍGUEZ

TUTORES:

DR. OSCAR GONZÁLEZ FLORES

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO



IXTACUIXTLA, TLAX., ENERO 2025



AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

C. JANETE FLORES VEGA

PRESENTE

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: Detección *in vitro* del potencial antineoplásico de una lacasa de *Agrocybe aff. pediades* aplicada a células cancerosas pulmonares., realizado bajo la dirección de la Dra. Alba Mónica Montiel González y la Dra. Rosa Angelica Castillo Rodríguez. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Margarita Martínez Gomez

Dra. Elvia Ortiz Ortiz

Dr. Oscar G. Vázquez Cuecuecha

Dra. Esmeralda García Torres

Dra. Elizabeth García Gallegos

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
Ixtacuixtla, Tlax., 17 de enero de 2025.



DR. HÉCTOR SANTOS BENA ZENDEJAS
COORDINADOR GENERAL DE LICENCIATURA Y POSGRADO
EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c.c.p. Expediente



Documento exclusivo para uso de la dependencia responsable o autoridad correspondiente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primer lugar, a Dios por darme la fortaleza, sabiduría y perseverancia para completar este proyecto.

A CONACYT por el otorgamiento de la beca con número 1232639, que sin el apoyo económico está meta no hubiera sido posible lograr con éxito.

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala como a la institución Centro de Investigación en Genética y Ambiente y a sus profesores, por brindarme los conocimientos y herramientas necesarios para crecer profesional y personalmente.

A mi directora la Dra. Alba Mónica Montiel González por su guía, paciencia y valiosas enseñanzas durante el desarrollo de esta investigación. Sus consejos y orientación fueron fundamentales para alcanzar este logro. Que sin su apoyo y motivación habría sido posible, ya que usted me hizo darme cuenta de la importancia que tendría en mi vida.

Como a mi comité tutorial la Dra. Rosa Angélica Castillo Rodríguez, el Dr. Oscar González Flores y el Dr. Francisco José Fernández Perrino, por cada uno de sus comentarios tan asertivos a lo largo del proyecto, por mostrarme siempre su apoyo y estar pendientes de mí.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada como al Instituto Nacional de Pediatría, por permitirme realizar estancias en sus laboratorios (Laboratorio de Bioprocesos y Laboratorio de Oncología experimental).

Al Dr. Miguel Angel Plascencia Espinoza por su apoyo, que desde el momento que se solicitó se involucró en el proyecto, cada consejo, cada comentario siempre fueron para complementar más el proyecto.

A mis compañeras (Kari y Fanny) y amigos (Alan, Sergito, Pao, Aby e Ili), por su compañía y ánimo a lo largo de este camino, así como por los momentos de apoyo y motivación que me ofrecieron en los momentos más desafiantes.

A mis padres, por su amor incondicional, apoyo constante y por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación. Gracias por creer en mí en todo momento y ser mi mayor inspiración.

Finalmente, dedico este trabajo a todas las personas que, de una u otra manera, han sido parte de este proceso y han dejado una huella en mi vida.

Proverbios 16:3

“Pon todo lo que hagas en manos del Señor y tus planes tendrán éxito.”

Índice general

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
I.1 Marco teórico.....	15
1.1 Impacto de la dinámica antropogénica sobre la salud humana	15
1.2 Contaminación ambiental	15
1.3 Afectaciones a la salud por la contaminación ambiental	18
1.4 Cáncer como un padecimiento asociado a la contaminación ambiental	19
1.5 Tipos de cáncer asociados a contaminación ambiental.....	25
1.6 Fármacos antineoplásicos y sus mecanismos de acción.....	30
1.7 Uso de compuestos de origen natural para el tratamiento de cáncer: productos fúngicos.....	32
1.8 Principios activos fúngicos utilizados en el combate contra el cáncer ..	33
1.9 Enzimas lacasas y su uso biotecnológico	35
I.2 Antecedentes	39
I.3 Preguntas de investigación	42
I.4 Hipótesis.....	42
I.5 Justificación	42
I.6 Objetivos	43
6.1 Objetivo general	43
6.2 Objetivos específicos	43
II. Metodología	44
II.2 Propagación de las cepas.....	45
II.3 Obtención de los extractos de lacasa	45
II.4 Determinación enzimática de los extractos y zimografía	46
II.5 Purificación de las lacasas de <i>Agrocybe aff. pediades</i>	47
5.1 Cromatografía de intercambio iónico	48
5.2 Cromatografía por filtración en gel	48

II.6 Líneas celulares.....	49
II.7 Ensayo de actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales y determinación de IC ₅₀	49
II.8 Conteo celular	51
II.9 Análisis estadísticos.....	52
III RESULTADOS.....	53
III.1 Caracterización del extracto crudo enzimático extracelular de cultivos líquidos de <i>A. aff. pediades</i>	53
1.2 Purificación de las enzimas lacasa de <i>Agrocybe aff. pediades</i>	53
1.2.1 Cromatografía de intercambio iónico	54
1.2.2 Cromatografía por filtración en gel	56
1.2.4 Determinación enzimática de los extractos.....	57
1.3 Ensayo de actividad antiproliferativa de los extractos caracterizados en línea celular con cáncer de pulmón A549	60
1.4 Viabilidad celular y conteo	61
IV. DISCUSIÓN	69
IV. 1 Purificación de la lacasa producida por <i>Agrocybe aff. pediades</i>	69
IV. 2 Actividad antiproliferativa de la lacasa producida por <i>Agrocybe aff. pediades</i>	71
V. CONCLUSIONES	75
VI. PERSPECTIVAS	76
VII. REFERENCIAS	77
VIII. ANEXOS.....	90
Anexo 1. Preparación de medios.....	90
Anexo 2. Curva patrón de albumina.....	91
Anexo 3. PROTOCOLO MTT	92
Anexo 4 Análisis de correlación de Pearson.....	93
Anexo 5 Fotografías de las células en distintas condiciones.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros del agua que pueden ser afectados por un contaminante (tomado de Encinas Malagón, 2011).....	16
Tabla 2. Fuentes de contaminación del suelo (tomado de Encinas Malagón, 2011)	17
Tabla 3. Estadísticas de incidencia y mortalidad de cáncer en hombres y mujeres en América Latina, el Caribe y en México (obtenido de Cáncer Today, 2022).....	20
Tabla 4. Clasificación de los antineoplásicos (tomado de Benedí & Gómez Del Río, 2006)	31
Tabla 5. Programa de purificación de la lacasa de <i>Agrocybe aff. pediades</i> por Intercambio iónico (ELI).....	54
Tabla 6. Programa de purificación de la lacasa de <i>Agrocybe aff. pediades</i> por Filtración en gel (ELG)	56
Tabla 7. Determinación enzimática y proteica del ECF	57
Tabla 8. Fotografías de las células expuestas con el extracto ELI a las diferentes dosis en un periodo de 0 a 24 h	96
Tabla 9. Fotografías de las células expuestas con el extracto ELG a las diferentes dosis en un periodo de 0 a 24 h.....	97
Tabla 10. Fotografías de las células expuestas con el extracto ECF a las diferentes dosis en un periodo de 0 a 24 h.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de contaminación atmosférica del óxido de azufre emitido por chimenea de las industrias (tomado de Encinas Malagón, 2011).	16
Figura 2. Tasa por defunciones por tumores malignos por entidad federativa, 2020 (obtenido de INEGI, 2020).....	20
Figura 3. Capacidades distintivas del cáncer tomado de (Hanahan y Weinberg, 2011) .	22
Figura 4. Redes de señalización intracelular que regulan las operaciones de la célula cancerosa (tomado de Hanahan y Weinberg, 2011).....	23

Figura 5. Representación esquemática del mecanismo del cáncer que involucra oncogenes (genes como RAS, ERK y MYC), genes supresores de tumores (gen TP53) y genes de reparación del ADN (tomado de Kùpeli Akkol et al., 2020)	24
Figura 6. Diferencias entre los tipos de cáncer de pulmón (Cáncer de Pulmón Microcítico Roche Pacientes, 2019)	28
Figura 7. Vía del estrógeno en la carcinogénesis pulmonar y sus implicaciones para la terapia dirigida (tomada de Musial et al., 2021)	30
Figura 8. Estructura tridimensional de una lacasa fúngica	35
Figura 9. Sitio activo de las lacasas (obtenido de Jiménez Serna, 2016).....	36
Figura 10. Mecanismo de acción de las lacasas (obtenido de Jiménez Serna, 2016)....	38
Figura 11. Diseño metodológico del proyecto	44
Figura 12. Esquema de placa para el cultivo de células en las diferentes unidades de actividad lacasa de los extractos enzimáticos, con su respectiva réplica.....	50
Figura 13. Cuadrantes de la cámara de Neubauer para el conteo de las células	51
Figura 14. Cromatograma obtenido del FPLC	54
Figura 15. Cromatograma de la lacasa en columna de intercambio iónico.....	55
Figura 16. Cromatograma de la lacasa de las fracciones eluidas en la filtración en gel .	57
Figura 17. Zimogramas de la lacasa de <i>Agrocybe aff. pediades</i> de los diferentes extractos	58
Figura 18. Tinción de gel de poliacrilamida en plata en cada etapa de purificación del ECEE.....	60
Figura 19 . Fotografía de la placa con las células sin y con los extractos	61
Figura 20. Placa en el ensayo MTT (viabilidad celular)	62
Figura 21. Pruebas presuntivas de la línea celular A549 en cada uno de los extractos tratados.	64
Figura 22. Prueba presuntiva de la línea celular LL29 en cada uno de los extractos	67
Figura 23. Correlación de concentraciones 0.10-0.30 UI/mg en línea celular A549 en los diferentes extractos.....	93
Figura 24. Correlación de concentraciones 0.30-9.60 UI/mg en línea celular A549 en los diferentes extractos.....	94
Figura 25. Correlación de concentraciones 0.10-0.30 UI/mg en línea celular LL29 en los diferentes extractos.....	95

RESUMEN

Las personas expuestas a niveles variables de contaminación del aire pueden experimentar efectos adversos para la salud, incluido un mayor riesgo de cáncer, principalmente pulmonar. Los tratamientos actuales suelen inducir severos efectos secundarios; una alternativa para prevenir esos efectos adversos ha sido la utilización de ciertas especies de hongos que contienen algunos principios activos contra el cáncer. La acción antineoplásica de los hongos se ha asociado con diferentes mecanismos de acción derivados de algunos péptidos y enzimas como la hipsina, las lectinas y las lacasas, siendo estas últimas las que han recibido mayor atención. Se ha documentado el potencial efecto antiproliferativo de las lacasas en modelos celulares de cáncer de mama, hepático y leucemia, entre otros, con distintas tasas de eficiencia; sin embargo, se desconoce su efecto en cáncer pulmonar. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antineoplásico de una lacasa extracelular semipurificada producida por *Agrocybe aff. pediades* sobre células cancerosas de la línea A549 y sobre la viabilidad de la línea LL29 de fibroblastos. El estudio se realizó con la cepa CIGYA-002 de *Agrocybe aff. pediades*, de la cual se obtuvo el extracto crudo enzimático extracelular (ECEE), a partir de su cultivo en un medio mineral con glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El ECEE fue concentrado y fraccionado por medio de cromatografía rápida líquida (FPLC) con el uso de columnas de intercambio iónico y columnas de filtración en gel. Se obtuvieron fracciones con las lacasas semipurificadas, las cuales fueron probadas a diferentes concentraciones para determinar su efecto sobre cultivos tanto de las células A549 como de las células LL29. De acuerdo con las pruebas realizadas, se observó que las células A549 expuestas a los diferentes extractos en concentraciones mayores a las 20 UI/mg de proteína comenzaban a presentar un comportamiento antiproliferativo, a diferencia de las analizadas a concentraciones menores a 0.300 UI/mg, que presentaron un comportamiento proliferativo. Este último efecto fue también observado con las células LL29, lo que muestra la ausencia de un efecto citotóxico al estar expuestas a los extractos en concentraciones menores a

0.300 UI/mg, sugiriendo un efecto regenerativo. Ambos resultados aportan evidencia parcial del potencial tanto antineoplásico como regenerativo de los extractos semipurificados de lacasas, por lo que es necesario continuar con más pruebas para su confirmación, incluyendo procedimientos más efectivos para la purificación total de la enzima.

ABSTRACT

People exposed to varying levels of air pollution may experience adverse health effects, including an increased risk of cancer, primarily lung cancer. Current treatments often induce severe side effects; an alternative to prevent these adverse effects has been the use of some anti-cancer active ingredients contained in certain species of fungi. The antineoplastic action of fungi has been associated with different mechanisms of action derived from some peptides and enzymes such as hypsin, lectins and laccases, the latter having received the most attention. The potential antiproliferative effect of laccases has been documented in cellular models of breast, liver and leukemia cancer, among others, with different efficiency rates; however, their effect in lung cancer is unknown. The aim of this study was to determine the antineoplastic effect of a semi-purified extracellular laccase produced by *Agrocybe aff. pediades* on cancer cells of line A549 and on the viability of fibroblast line LL29. The study was performed with *Agrocybe aff. pediades* strain CIGYA-002, from which the extracellular enzymatic crude extract (ECEE) was obtained from its culture in a mineral medium with glucose and yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively. The ECEE was concentrated and fractionated by fast liquid chromatography (FPLC) using ion exchange columns and gel filtration columns. Fractions containing the semi-purified laccases were obtained and tested at different concentrations to determine their effect on cultures of both A549 and LL29 cells. According to the tests performed, it was observed that A549 cells exposed to the different extracts at concentrations higher than 20 IU/mg of protein began to antiproliferative behavior as opposed to those tested at concentrations lower than 0.300 IU/mg, which showed a proliferative behavior. The latter effect was also observed with LL29 cells, showing

the absence of a cytotoxic effect when exposed to the extracts at concentrations lower than 0.300 IU/mg, suggesting a regenerative effect. Both results provide partial evidence of both antineoplastic and regenerative potential of semi-purified extracts of laccases, and further testing is needed for confirmation including more effective procedures for total purification of the enzyme.

I. INTRODUCCIÓN

El ser humano, al formar parte del planeta como sistema, mantiene una interacción dinámica con sus subsistemas; conformados por la litosfera, hidrosfera, atmósfera y la biosfera. De la biosfera, se obtienen beneficios que nos permiten sobrevivir debido a los cambios del sistema que puedan ser modificable por los seres vivos (Folke *et al.*, 2016; Jørgensen *et al.*, 2019). Aunque las actividades humanas son intrínsecas a su entorno biológico, han tenido un impacto negativo significativo sobre el ambiente; el clima está cambiando de tal manera que se producirán importantes consecuencias para todos los seres vivos, poniéndose en peligro la vida animal (incluyendo los humanos), vegetal y microbiana en la Tierra (van Rhijn y Bromley, 2021). Entre las consecuencias importantes de estas actividades se encuentran el incremento de la contaminación del suelo, del agua y del aire, cuyos efectos repercuten en alteraciones de la salud humana y, siendo la contaminación del aire la que representa un mayor riesgo para la salud debido a que es un recurso vital para la vida de todas las especies vivientes en el planeta (Miguel-Pérez *et al.*, 2013). Por lo tanto, con mayor frecuencia van presentándose más enfermedades respiratorias relacionadas con elementos contaminantes que provocan incrementos en la mortalidad por causas respiratorias y cardiovasculares (Tenías Burillo y Ballester, 2002). Las personas expuestas a niveles variables de contaminación del aire pueden experimentar efectos adversos para la salud, incluido un mayor riesgo de cáncer, principalmente pulmonar (Cuéllar Luna *et al.*, 2021).

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que afecta a múltiples órganos y que se caracteriza por una proliferación descontrolada y anormal de las células que provocan aglomeraciones de tejidos causantes de la formación de tumores. Los tumores pueden ser

cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos) (Miguel-Soca *et al.*, 2007) que pueden surgir en cualquier parte del cuerpo humano y estar formado por billones de células.

La OMS confirmó en el 2013, a través de una evaluación, los efectos cancerígenos para el ser humano de partículas presentes en aire contaminado, relacionándolas estrechamente con la incidencia de cáncer de pulmón (Ou *et al.*, 2020).

El cáncer de pulmón en los seres humanos es un tipo de cáncer que presenta una mayor incidencia y letalidad en el mundo. La mayoría de los casos de cáncer de pulmón se diagnostican en una etapa tardía, debido a la falta de síntomas clínicos claros y a la falta de programas efectivos de detección temprana. Sin embargo, la estadística y clasificación precisa del cáncer de pulmón es esencial, ya que el diagnóstico y las opciones de tratamiento dependen de ello (Gridelli *et al.*, 2015). Existen dos tipos principales de este tipo de cáncer: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés), asociado con el tabaquismo, y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), que se presenta con mayor incidencia y se relaciona con la exposición a contaminación ambiental en donde ambos, tipos de cáncer tienen pronósticos y manejos distintos (Nooreldeen y Bach, 2021). Estudios recientes sugieren que hormonas como los estrógenos pueden desempeñar un papel en esta patología, pudiendo promover la expresión de quimiocinas involucradas en la progresión tumoral (Rodríguez-Lara *et al.*, 2015). Por ejemplo, el adenocarcinoma pulmonar (ADC) es sensible a los estrógenos y pueden responder a este tipo de hormonas. Sin embargo, las células cancerosas producen estrógenos porque se activa la enzima aromatasa (Rodríguez-Lara *et al.*, 2018). Aunque sus efectos en el desarrollo del cáncer pulmonar son aún poco explorados, se sabe que el catecol-estrógeno (un catabolito de los estrógenos), al actuar como un factor de transcripción que causa mutaciones en el ADN induciendo la expresión de genes provocando mutaciones los cuales presentan un potencial proliferativo estimulando el crecimiento celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos los cuales alimentan el tumor y estimulan su crecimiento (Rodríguez-Lara *et al.*, 2015). Algunas investigaciones sugieren que los estrógenos pueden mejorar la expresión de quimiocinas involucradas en el crecimiento tumoral un

mecanismo que podría estar relacionado en la fisiopatología del cáncer pulmonar. Asimismo, diversos estudios han demostrado que el tratamiento con tamoxifeno o toremifeno (bloqueadores de los receptores de estrógeno) a la quimioterapia para casos del cáncer avanzado de pulmón de células no pequeñas, provoca de un 18 a un 25% de respuestas positivas a esté (Rodríguez-Lara *et al.*, 2015).

Los fármacos que actualmente son utilizados para el tratamiento de cáncer pulmonar pueden ser de origen natural, sintéticos o semisintéticos y tienen distintos mecanismos de acción, dependiendo de su célula cancerosa. Entre esos agentes alquilantes o análogos de β -estradiol los cuales se administran en combinación con quimioterapia o radioterapia, por lo que ejercen un efecto inespecíficos y no selectivos (Benedí y Gómez Del Río, 2006). Estos tratamientos, por lo general, ejercen efectos colaterales indeseados, por lo que la búsqueda de mejores opciones de interés farmacéutico se encuentra vigente. Sin embargo, la utilización de bioprospección (proceso de búsqueda y análisis de recursos biológicos, como plantas, animales y microorganismos) tiene el objetivo de buscar alternativas para tratamientos que sean menos agresivos para la salud de los pacientes. Una alternativa que actualmente se ha sugerido para prevenir esos efectos adversos, ha sido la utilización de ciertas especies de hongos que, además, se ha descrito que contienen algunos principios activos contra el cáncer como: la hipsina, algunos péptidos, las lectinas y las lacasas, los cuales presentan diferentes mecanismos de acción (Fortes y Novaes, 2011; Laza Loaces *et al.*, 2003; T. Ng y Wong, 2013).

Las lacasas son los compuestos que han recibido mayor atención, y que se conoce que actúan como oxidorreductasas (EC 1.10.3.2) utilizando compuestos fenólicos como sustratos y han demostrado ser efectivas en degradar a los estrógenos cuando se han realizado análisis en aguas residuales. Además, estos compuestos se han estudiado gracias a su potencial antiproliferativo en modelos celulares de cáncer de mama, hepático y leucemia, entre otros, mostrando diferentes niveles de eficiencia (Guest y Rashid, 2016; Matuszewska, Karp, Jaszek, Janusz, Osińska-Jaroszuk, *et al.*, 2016).

En el presente estudio se investigó una lacasa de la cepa *Agrocybe* aff. *pediades* CIGYA-002, aislada de un bosque de sabino (*Juniperus deppeana*) de Ixtacuixtla Tlaxcala, y sus efectos antineoplásicos sobre una línea celular de cáncer de pulmón, además, de explorar si presenta algún efecto citotóxico en células normales.

I.1 Marco teórico

1.1 Impacto de la dinámica antropogénica sobre la salud humana

Las sociedades humanas, su economía, cultura, evolución y el desarrollo de sus interrelaciones con todos los demás seres vivos emergen y forman parte de la biosfera terrestre, es decir, la biosfera viviente sostiene una conexión dinámica con el sistema terrestre; la atmósfera, la hidrosfera, la litosfera, la criosfera y el sistema climático, por lo que es claro que las acciones humanas co-evolucionan con dicho sistema (Jørgensen *et al.*, 2019) y crean interacciones y dependencias locales, regionales y mundiales (Folke *et al.*, 2016). A partir de la década de 1950 las actividades humanas han modelado una sociedad globalizada, respaldada por el uso de energía fósil e innovaciones en la organización social, tecnológica y cultural (AWG, 2019; Ellis, 2015), permitiendo la mejora de la salud y el nivel de vida material de muchas personas, mejorando sus expectativas y calidad de vida (Coe *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015). Como consecuencia, se ha observado un incremento en la población humana, la cual se ha convertido en una fuerza global que afecta al sistema Tierra y a su biosfera (Steffen *et al.*, 2018), dando origen al Antropoceno (AWG, 2019), una era caracterizada por la urbanización (55% de la población vive en zonas urbanas), la selección artificial y controlada de cultivos, de ganado, de árboles y de microorganismos mediante el uso de productos químicos que generan contaminación ambiental y alteran la vida de las especies (Jørgensen *et al.*, 2019), incluyendo la de los humanos.

1.2 Contaminación ambiental

La contaminación es la presencia de sustancias indeseables o formas de energía en el aire, el agua o el suelo, en concentraciones en la que pueden afectar a la comodidad humana y a la salud (Encinas Malagón, 2011). Entre los principales contaminantes liberados a la atmósfera se encuentran los que provienen de las actividades generadoras de energía, la industria y otras actividades económicas,

los cuales perturban la totalidad de las matrices ambientales (aire, agua y suelo), en diferentes grados (Hernández-Garcés *et al.*, 2019).

La figura 1 muestra las principales causas del problema subyacente a la contaminación del aire son el dióxido de azufre (SO_2), dióxido de nitrógeno (NO_2) y el monóxido de carbono (CO), entre otros compuestos orgánicos volátiles (Cuéllar Luna *et al.*, 2021).

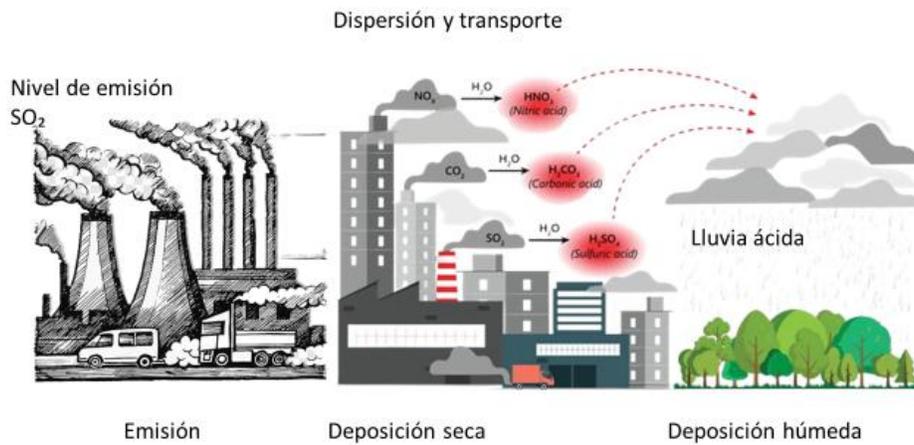


Figura 1. Proceso de contaminación atmosférica del óxido de azufre emitido por chimenea de las industrias (tomado de Encinas Malagón, 2011).

Se ha establecido que el agua estaría contaminada si contiene compuestos que restringen su uso. Algunas fuentes de contaminación pueden ser naturales (geoquímicas: suelo) o artificiales (antropogénicas ver la tabla 1) (Jørgensen *et al.*, 2019). Por lo general, en este medio, las fuentes naturales están muy dispersas y no tienen concentraciones altas. Sin embargo, la contaminación provocada por el hombre está centrada en una región particular (industria, ciudad, etc.) y los contaminantes son mucho más peligrosos que los que se liberan de fuentes naturales (Encinas Malagón, 2011).

Tabla 1. Parámetros del agua que pueden ser afectados por un contaminante (tomado de Encinas Malagón, 2011)

Físicas	Químicas	Biológicas
---------	----------	------------

Color	pH	Bacterias coliformes
Olor y sabor	O ₂ disuelto (OD)	Virus
Conductividad	DBO, DQO, COT	Microorganismos
Temperatura	Nitrógeno total	Animales
Materiales en suspensión	Fósforo total	Plantas
Radiactividad	Aniones: Cl, NO ₃ , NO ₂ ,	
Espumas	PO ₄ ³⁻ , S ²⁻ , CN, F	
	Cationes: Na, Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ,	
	NH ₄	
	Metales pesados	
	Compuestos orgánicos	

En el caso del suelo, la contaminación se define como un desequilibrio físico, químico o biológico debido a la acumulación de niveles de sustancias tóxicas para los organismos del suelo, lo que resulta en la pérdida de la productividad (De La Rosa-Pérez *et al.*, 2007). De igual manera, se diferencian las fuentes de contaminación son naturales o artificiales (antropogénicas) (tabla 2).

Tabla 2. Fuentes de contaminación del suelo (tomado de Encinas Malagón, 2011)

Naturales	Antropogénicas
Liberación excesiva de algunas sustancias en la meteorización de la roca madre, solo cuando esa sustancia se acumule y resulte tóxica para el suelo	Abonos, pesticidas, plaguicidas Agua de riego Depósito de contaminantes atmosféricos y lixiviados Lodos de las depuradoras

	Uso del suelo como depurador de aguas residuales
--	--

Las actividades diarias puede provocar contaminación ambiental en el lugar de trabajo, y se define como la presencia de cualquier factor en el ambiente (físico, químico o biológico) o una combinación de diferentes factores en diferentes lugares, formas y concentraciones que pueden ser perjudiciales para la salud, la seguridad o el bienestar de la población (Anzules y Castro, 2022).

1.3 Afectaciones a la salud por la contaminación ambiental

Los efectos de la creciente contaminación ambiental repercuten en alteraciones de la salud ya que cada vez aparecen más enfermedades respiratorias relacionadas con elementos contaminantes, provocando un incremento en la mortalidad por causas respiratorias y cardiovasculares (Tenías Burillo y Ballester, 2002) debido al aumento significativo de la contaminación del aire, de la cual es catalogada como una de las formas más peligrosas de contaminación (Guzmán y Restrepo, 2008).

Los seres humanos están expuestos a las sustancias químicas del ambiente a través del aire y el polvo que respiran, del agua que beben y de los alimentos contaminados con pesticidas y otros sedimentos del aire y del agua de riego que ingieren cotidianamente. La exposición también puede ocurrir durante el uso de productos que contienen sustancias químicas, como cosméticos, productos de limpieza o higiene personal y aditivos alimenticios (Anzules y Castro, 2022). Dependiendo de su extensión y frecuencia, la exposición a sustancias químicas puede causar muchos efectos adversos, incluidos problemas respiratorios, daños neurológicos, hepáticos, así como efectos en los sistemas cardiovascular, inmunitario y hormonal (Gaviria G *et al.*, 2011). Es evidente, que la contaminación ambiental y la exposición crónica a concentraciones por encima de los límites tienen graves consecuencias para la salud (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2012).

Actualmente, se han asociado las diversas fuentes de contaminación con la prevalencia de enfermedades graves como el cáncer. Por ejemplo, las personas expuestas a niveles variables de contaminación del aire pueden experimentar efectos adversos para la salud, incluido un mayor riesgo de cáncer, principalmente pulmonar (Cuéllar Luna *et al.*, 2021).

1.4 Cáncer como un padecimiento asociado a la contaminación ambiental

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, contabilizando casi 10 millones de decesos en 2020 (Peña-López y Remolina-Bonilla, 2016). En nuestro país, esta enfermedad también tiene repercusiones importantes como un problema de salud pública. En 2020, las entidades federativas con las tasas más altas de defunciones por tumores malignos fueron: Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Morelos, Veracruz y Colima, con tasas de 9.7 a 7.8 defunciones por cada 10 mil habitantes. En contraste, las entidades con las tasas más bajas fueron: Quintana Roo, Guerrero, Querétaro, Yucatán, Durango, Guanajuato, Tlaxcala, Tabasco, Estado de México, Puebla y Aguascalientes, con tasas de 4.5 a 6.4 defunciones por cada 10 mil habitantes (figura 2) (Peña-López & Remolina-Bonilla, 2016; WHO, 2022).

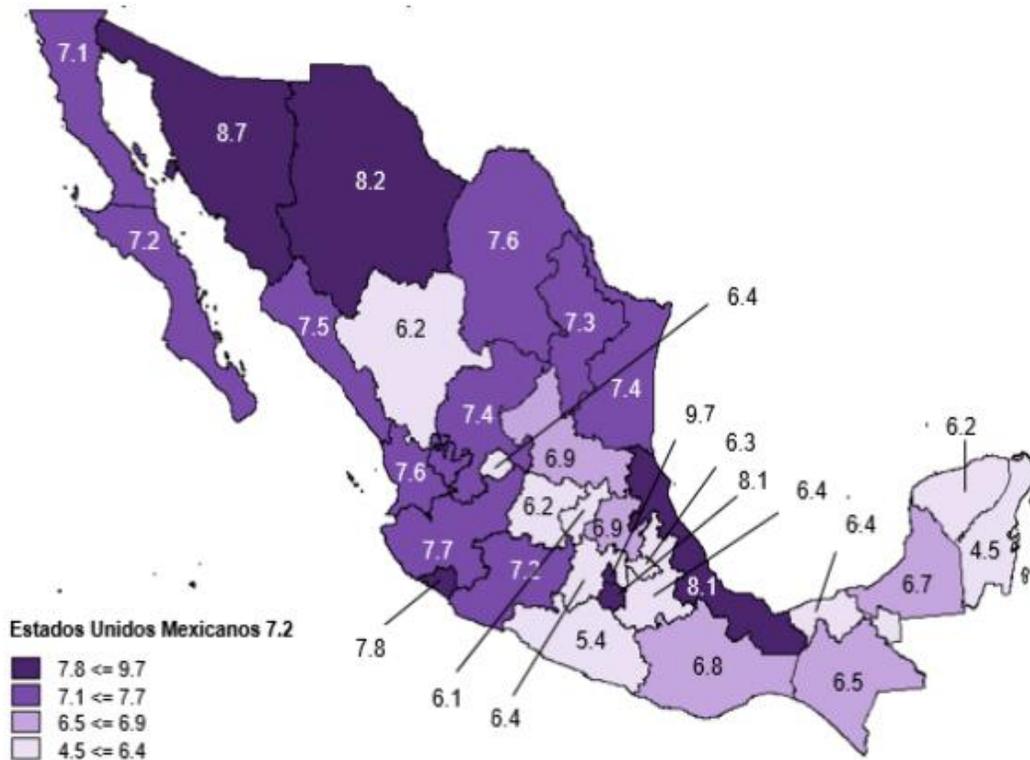
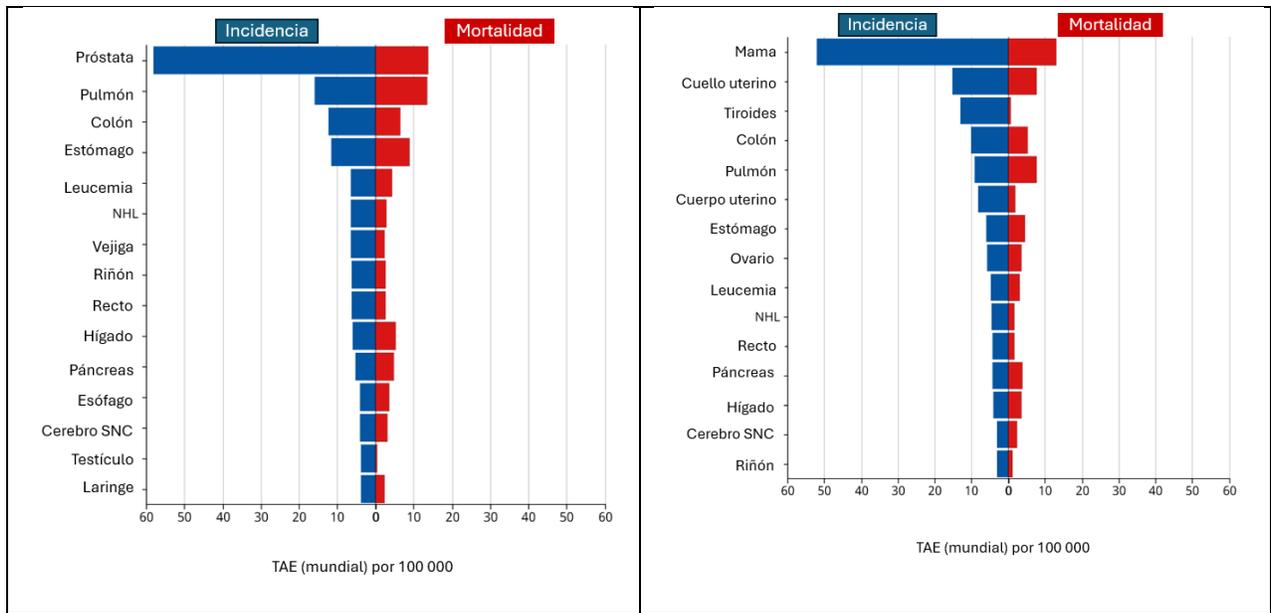


Figura 2. Tasa por defunciones por tumores malignos por entidad federativa, 2020 (obtenido de INEGI, 2020)

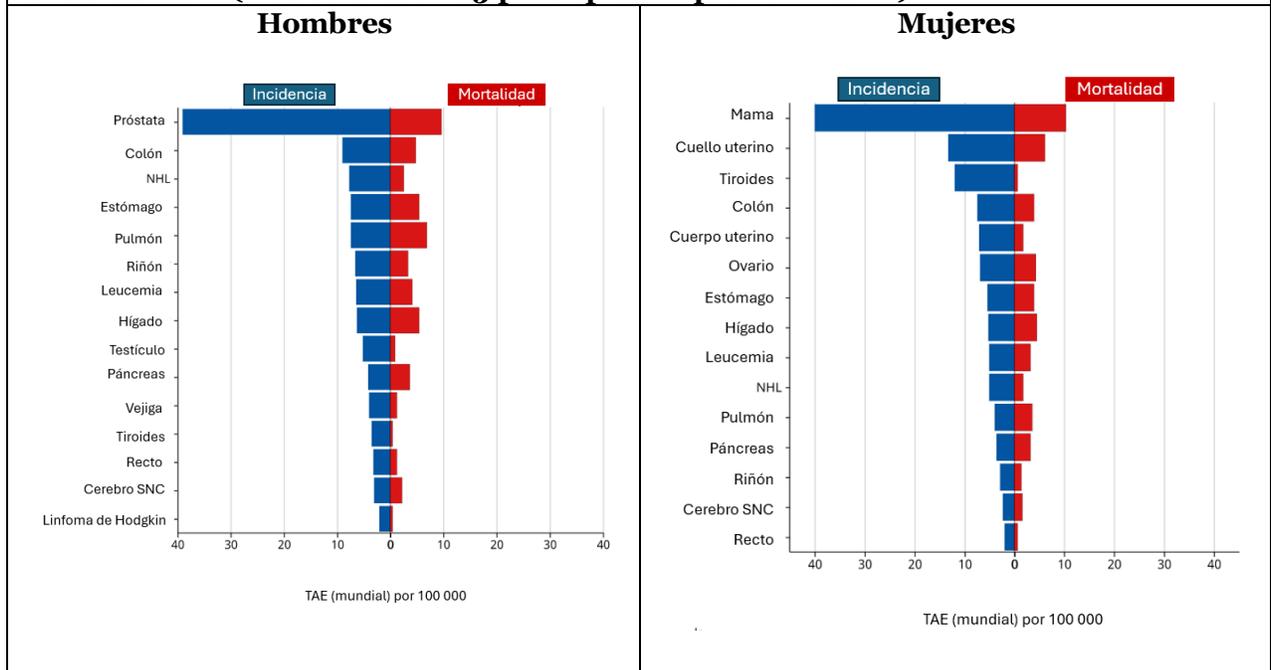
Los tipos de cáncer más comunes son el de mama, pulmón, colon, recto y próstata (tabla 3). Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer son causadas por fumar, un índice de masa corporal alto, beber alcohol, no comer suficientes frutas y verduras y no hacer suficiente ejercicio (Peña-López & Remolina-Bonilla, 2016).

Tabla 3. Estadísticas de incidencia y mortalidad de cáncer en hombres y mujeres en América Latina, el Caribe y en México (obtenido de Cáncer Today, 2022)

Tasa estandarizada por edad (mundial) por 100 000, incidencia y mortalidad en 2022. América Latina y el Caribe (considerando 15 principales tipos de cáncer)	
Hombres	Mujeres



Tasa estandarizada por edad (mundial) por 100 000, incidencia y mortalidad en 2022. México (considerando 15 principales tipos de cáncer)



Durante la presencia del cáncer hay interacciones dinámicas entre células malignas y no malignas, que implican cambios en el genoma y se caracterizan por la proliferación excesiva y descontrolada de un grupo de células que invaden y dañan tejidos (Peña-López & Remolina-Bonilla, 2016). Se han

propuesto once características del cáncer para ayudar a comprender la diversidad de las enfermedades neoplásicas. Las células normales evolucionan progresivamente hacia un estado neoplásico, en el que van adquiriendo una sucesión de capacidades distintivas. Algunas características, que a continuación se describen, continúan brindando una base sólida para comprender la biología del cáncer (figura 3).

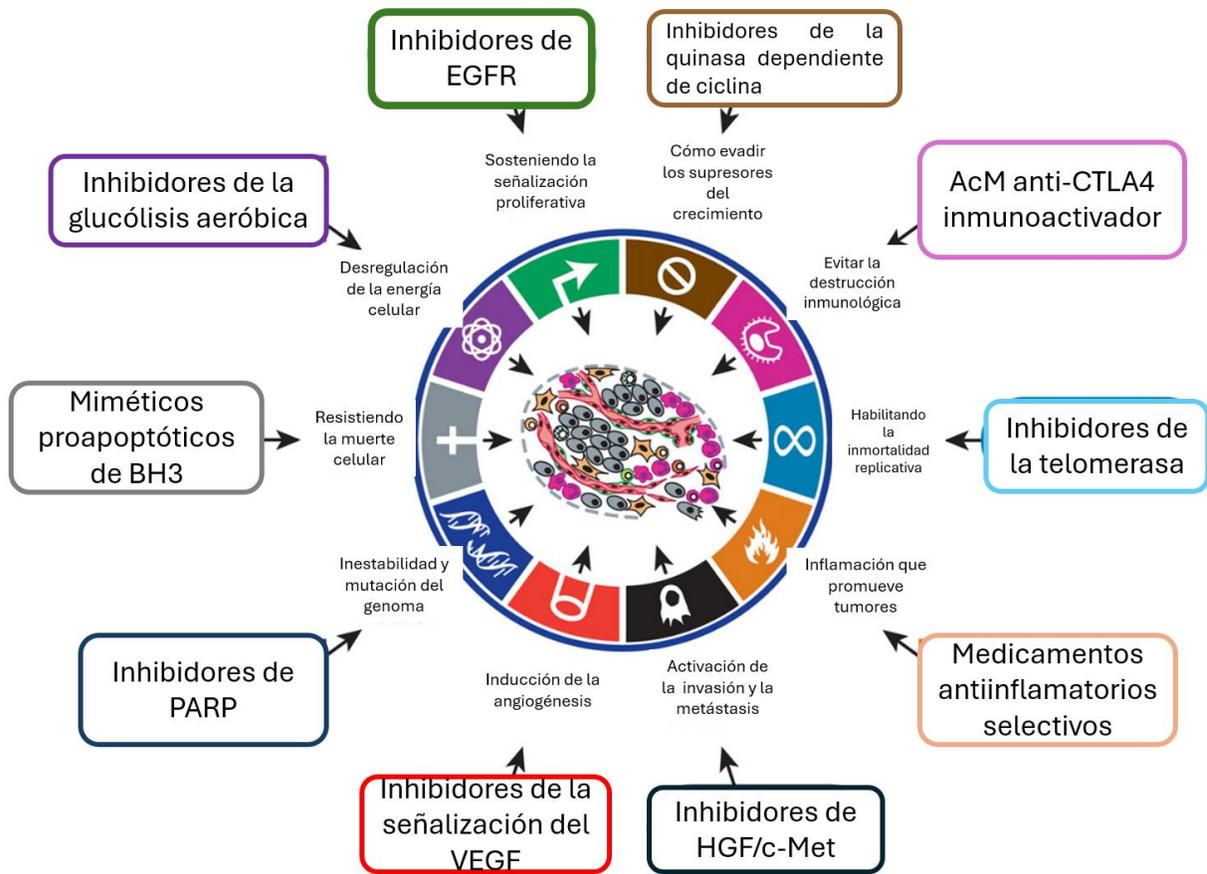


Figura 3. Capacidades distintivas del cáncer tomado de (Hanahan y Weinberg, 2011)

Las células cancerosas tienen defectos en los circuitos reguladores que rigen la homeostasis y la proliferación celular normal (Hanahan y Weinberg, 2011). Estos cambios se relacionan estrechamente con el microambiente tumoral (TME), que contiene señales, proteínas y células residentes en el tumor, como células inmunitarias y fibroblastos, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo tumoral (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013; Hausman, 2019) (figura 4).

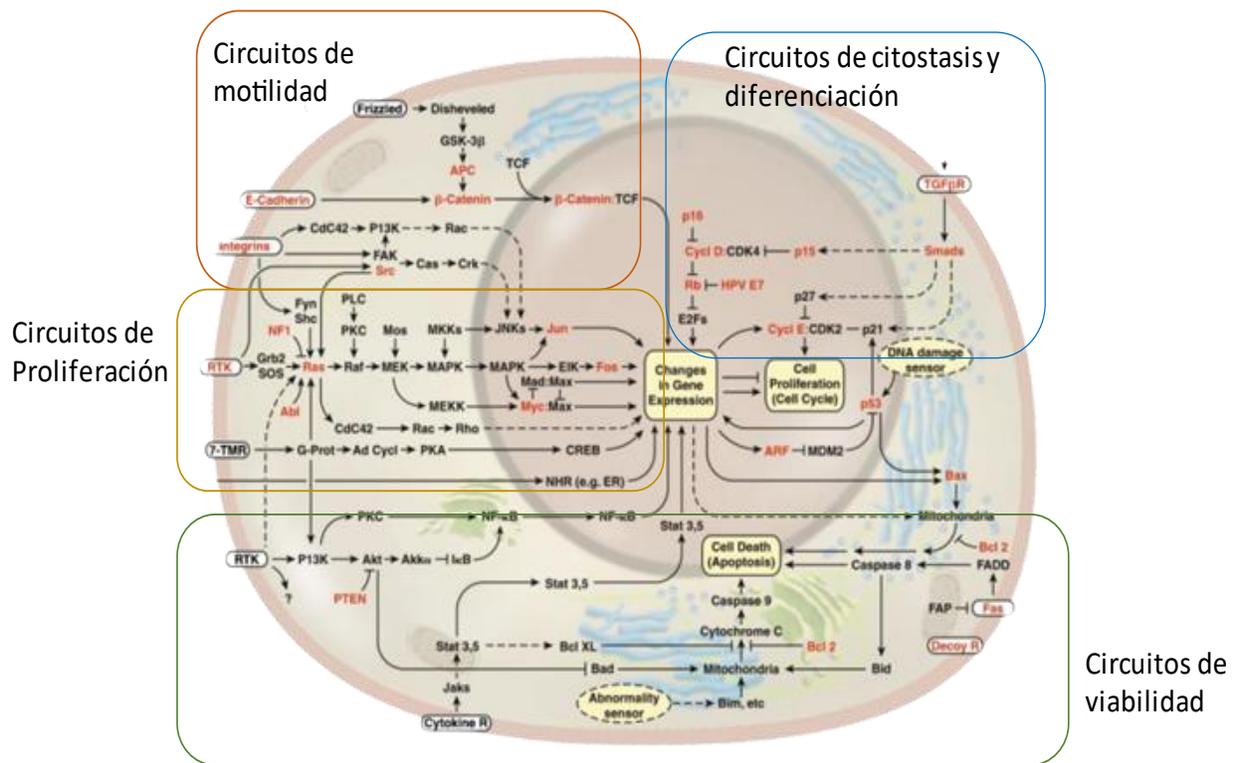


Figura 4. Redes de señalización intracelular que regulan las operaciones de la célula cancerosa (tomado de Hanahan y Weinberg, 2011)

Hay tres grupos de genes que desempeñan funciones importantes en el desarrollo del cáncer: oncogenes (genes como RAS, Erk y MYC, entre otros), genes supresores de tumores (por ejemplo, TP53) y genes de reparación del DNA (Küpeli Akkol *et al.*, 2020). Los protooncogenes, genes normales que permiten que las células crezcan y se diferencien, pueden activarse a través de mutaciones, aumento de la expresión génica, duplicación de genes o reordenamientos cromosómicos. Los genes supresores de tumores controlan la división y proliferación celular, iniciando la reparación del DNA cuando se produce daño y desencadenan la apoptosis cuando fallan los intentos de reparación. Las deleciones y la segregación cromosómicas inapropiada, las mutaciones puntuales, el silenciamiento génico epigenético, y la recombinación mitótica, pueden provocar la pérdida del control de los genes supresores de tumores, lo que lleva a la pérdida del

control del ciclo celular y la carcinogénesis. Otro grupo importante de genes alterados en el cáncer son los genes de reparación del DNA, que atraen las proteínas necesarias a los sitios dañados del DNA y ayudan a restaurar la función de los genes. Otra función importante de los genes de reparación del DNA es interrumpir de forma fiable las vías celulares apoptóticas y necróticas cuando la reparación es ineficaz (Küpeli Akkol *et al.*, 2020).

El cáncer se ha caracterizado por un crecimiento celular anómalo y continuo que altera los mecanismos de control del organismo y presenta una tendencia a la invasión y la metástasis, alterando, principalmente, las vías de transducción intracelular de señales mitogénicas, del ciclo celular y de los mecanismos de muerte celular programada, llamada apoptosis (Clark y Longo, 2019; Wang *et al.*, 2018) (figura 5).

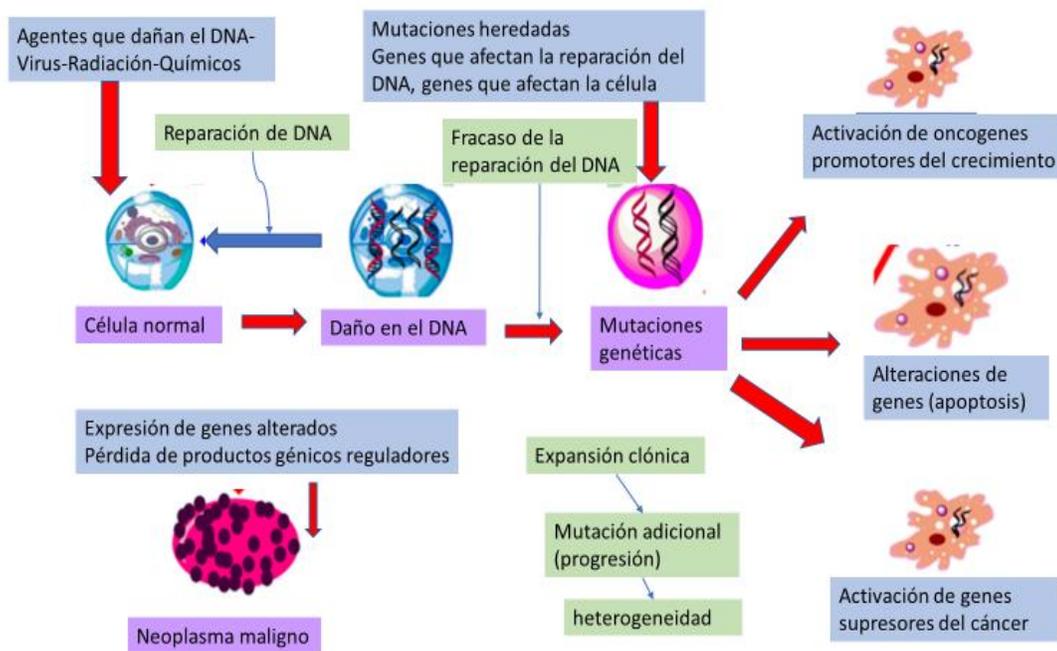


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo del cáncer que involucra oncogenes (genes como RAS, ERK y MYC), genes supresores de tumores (gen TP53) y genes de reparación del ADN (tomado de Küpeli Akkol *et al.*, 2020)

Actualmente, se han identificado factores de riesgo previsible para evitar el desarrollo de cáncer, como es el no inhalar el humo de tabaco el cual representa el 30% de los casos, mientras que otro

30% está relacionado con la obesidad. Estos factores, a su vez, se asocian con la inactividad, el consumo de alcohol y una dieta desequilibrada. Algunos patógenos, al igual que la contaminación ambiental, tienen un potencial cancerígeno bien establecido. Se ha documentado que los contaminantes ambientales y otros factores extrínsecos contribuyen a un estimado del 70% al 90% de los cánceres en humanos, incluida la contaminación del aire ambiental, que ha sido declarada cancerígena. Así desde el 2016, debido a las emisiones de contaminación del aire ambiental, en los Estados Unidos han aumentado los fallecimientos, existiendo un estimado de 10000 muertes adicionales en regiones geográficas donde la contaminación del aire ha empeorado (Ou *et al.*, 2020).

1.5 Tipos de cáncer asociados a contaminación ambiental

Múltiples estudios internacionales han demostrado vínculos entre la contaminación ambiental y diversos tipos de cáncer, como melanoma, cáncer de mama, próstata, gastrointestinal y pulmón (Hanahan & Weinberg, 2011b). Existe suficiente evidencia epidemiológica que relaciona la exposición a partículas y otros contaminantes del aire exterior con el riesgo de eventos adversos. Un ejemplo, son los cánceres gastrointestinales (GI) los cuales son una causa muy importante de muerte por cáncer, por lo que se ha estimado que 4.8 millones de casos nuevos de cánceres GI a nivel global. Además, cuatro de los cinco tipos de cáncer con el peor pronóstico (esófago, estómago, páncreas, hígado y pulmón) son cánceres gastrointestinales (Pritchett *et al.*, 2022). Se ha sugerido que factores como la contaminación doméstica, la exposición ocupacional e incluso la nutrición son responsables de un porcentaje importante de muertes anuales por cáncer de pulmón (Clofent *et al.*, 2021).

El aumento del crecimiento económico y de la urbanización conducen a enfrentar nuevos riesgos en la promoción del desarrollo del cáncer, por ejemplo, la exposición de un gran número de personas a la contaminación del aire. La evidencia epidemiológica vincula la contaminación del aire y la mortalidad por cáncer de pulmón de manera sólida. La mayoría de estas enfermedades son

causadas por eventos respiratorios y cardiovasculares, pero el cáncer también es una consecuencia importante. El cáncer de pulmón está más estrechamente relacionado con la exposición, a largo plazo, a la contaminación del aire, especialmente cuando se expresa como un componente gaseoso o de partículas contaminantes. De hecho, a medida que aumenta la exposición a altas concentraciones de material particulado, el cáncer de pulmón se convierte en un Factor más relevante que los eventos cardiovasculares en la incidencia de la enfermedad (Guzmán & Restrepo, 2008).

El cáncer de pulmón es un cáncer que se va formando en los tejidos del pulmón, generalmente en las células epiteliales, las cuales recubren los conductos de aire. El pulmón es un órgano rodeado por una doble membrana serosa, constituido por un parénquima con abundantes elementos celulares, destacando las dilataciones terminales, alvéolos, con los neumocitos I y II; conjuntamente se localizan los vasos arteriales y venosos, así como las estructuras respiratorias de las que se originan los alvéolos, es decir, los bronquios y bronquiolos (Ravelo Rodríguez et al., 2012).

Existen alrededor de 40 tipos celulares diferentes en el parénquima pulmonar, de los cuales prácticamente la mayoría son neumocitos (85%) y el 15% son otros tipos celulares como: fibroblastos/miofibroblastos, células endoteliales y pericitos de los capilares sanguíneos, macrófagos alveolares, mastocitos, leucocitos. La mayor parte de la población de alvéolos, neumocitos o células epiteliales alveolares establecen contacto directo con células vecinas a través de uniones comunicantes laterales con otras variantes celulares mediante señales intracelulares como citoquinas y factores de crecimiento, a través de receptores contenidos en la membrana basal localizados cerca de los fibroblastos, y en el caso de las células endoteliales a través de los septos alveolares (Ravelo Rodríguez *et al.*, 2023).

Debido a su función fisiológica, los pulmones están constantemente expuestos a diversas partículas, microorganismos y gases que afectan negativamente la homeostasis pulmonar y la susceptibilidad a las infecciones. Los pulmones tienen la capacidad de contrarrestar estas infecciones de una forma

estructural a través de las vías respiratorias y el epitelio alveolar, los cuales recubren las superficies internas de los pulmones y actúan como una barrera física contra partículas y microorganismos que ingresan al tracto respiratorio (Nooreldeen y Bach, 2021).

Como ya fue mencionado, hay dos tipos principales de cáncer de pulmón. El SCLC es un tipo de cáncer neuroendocrino de alto grado que aparece, principalmente, en fumadores actuales o anteriores y presenta muy mal pronóstico clínico. Este tipo de cáncer representa aproximadamente el 15% de los casos de cáncer de pulmón. Los pacientes con SCLC generalmente presentan síntomas respiratorios como tos, disnea (dificultad para respirar), hemoptisis (tos con sangre) y detección de masas pulmonares centrales con alguna afectación de los ganglios linfáticos evidenciando por imagenología. Dos tercios de los pacientes tienen enfermedad metastásica a distancia en el momento del diagnóstico inicial. Los sitios más comunes de metástasis incluyen el pulmón, el cerebro, el hígado, las glándulas suprarrenales y los huesos adyacentes (Rudin *et al.*, 2021). Por otro lado, el NSCLC, representa una clase heterogénea de tumores con aproximadamente el 85% del número total de casos nuevos de cáncer de pulmón. Fumar sigue siendo el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, pero la exposición al radón y la contaminación del aire, también juegan un papel importante. Se pueden utilizar varios métodos para diagnosticar el NSCLC, incluidos rayos X, tomografías computarizadas y examen histológico de biopsias tumorales (Gridelli *et al.*, 2015) (figura 6).

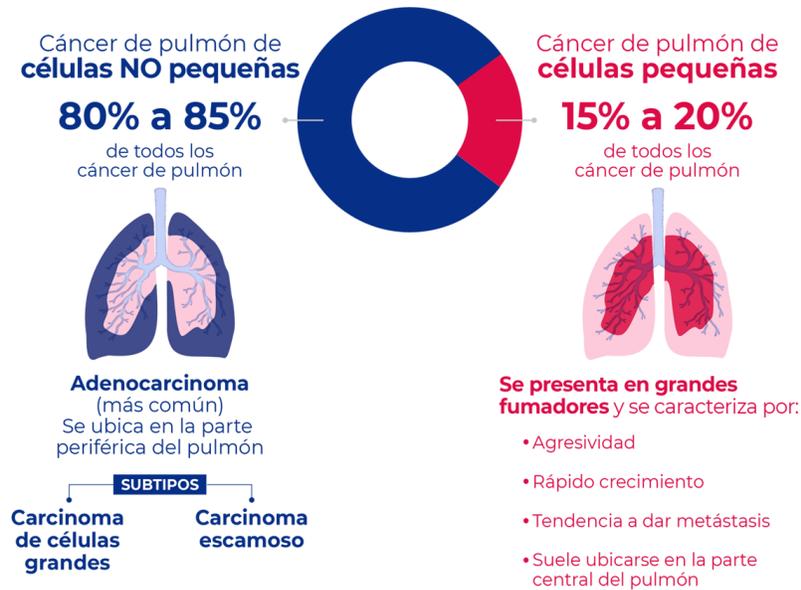


Figura 6. Diferencias entre los tipos de cáncer de pulmón (Cáncer de Pulmón Microcítico | Roche Pacientes, 2019)

Esta clasificación patológica del cáncer de pulmón se ajusta constantemente, utilizándose terminologías y criterios específicos para distinguir entre carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma, tumores especialmente difíciles de diferenciar (Gridelli *et al.*, 2015).

Se ha descrito que los estrógenos contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer de pulmón, debido a que algunos estudios epidemiológicos indican una tendencia al alza en la incidencia del cáncer pulmonar en las mujeres, a pesar de una reducción del 50% de mujeres fumadoras. Por ello, se atribuye un papel decisivo a las hormonas sexuales femeninas, principalmente a los estrógenos esteroide derivado del colesterol (Musial *et al.*, 2021). El 17- β -estradiol (E2) es la principal hormona reproductiva sintetizada en los ovarios después de la estimulación con la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante. La estrona y el estriol se sintetizan principalmente a partir de E2 en el hígado. La importancia de la señalización de estrógenos ha sido ampliamente estudiada, no solo en la carcinogénesis sino también en varias funciones fisiológicas y patológicas, especialmente con respecto al cáncer de mama. Hay dos tipos de receptores de

estrógeno (ER) clásicos. ER alfa (ER α , también conocido como ESR1), un producto génico en el cromosoma 6, que se distribuye en la mama, el ovario y el endometrio. ER beta (ER β , también conocido como ESR2) es un producto genético localizado en el cromosoma 14, que está más ampliamente distribuido en hueso, cerebro, colon, endotelio, riñón, pulmón, ovario, próstata y testículo (Hsu *et al.*, 2017).

Recientemente, se ha demostrado en el adenocarcinoma de pulmón, una interacción entre la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la señalización del estrógeno, un hallazgo que estimula a la evaluación de una terapia combinada basada en inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) y una terapia antiestrógenos (Musial *et al.*, 2021). la relación de la expresión de los ER con las complicaciones del NSCLC es importante tener en cuenta que los tejidos del NSCLC están expuestos al estrógeno a través de una mayor expresión o síntesis de aromatasa local y secreción de suficiente estrógeno circulante en las gónadas. La exposición del cuerpo humano a estrógenos exógenos también es posible mediante la administración de estrógenos/fitoestrógenos sintéticos o agentes xenoestrogénicos. Debido a que los efectos genómicos y no genómicos del estrógeno que involucran la interacción del ER u otros receptores relacionados (como GPER/EGFR), son factores importantes para determinar los niveles de expresión de estos receptores en tejidos de NSCLC puede ser muy importante. De hecho, se ha detectado incremento de actividad de aromatasa en líneas celulares de NSCLC y en aproximadamente del 44 al 86% de tejidos de NSCLC femeninos y masculinos (Maitra *et al.*, 2022; Rodríguez-Lara *et al.*, 2018) (figura 7).

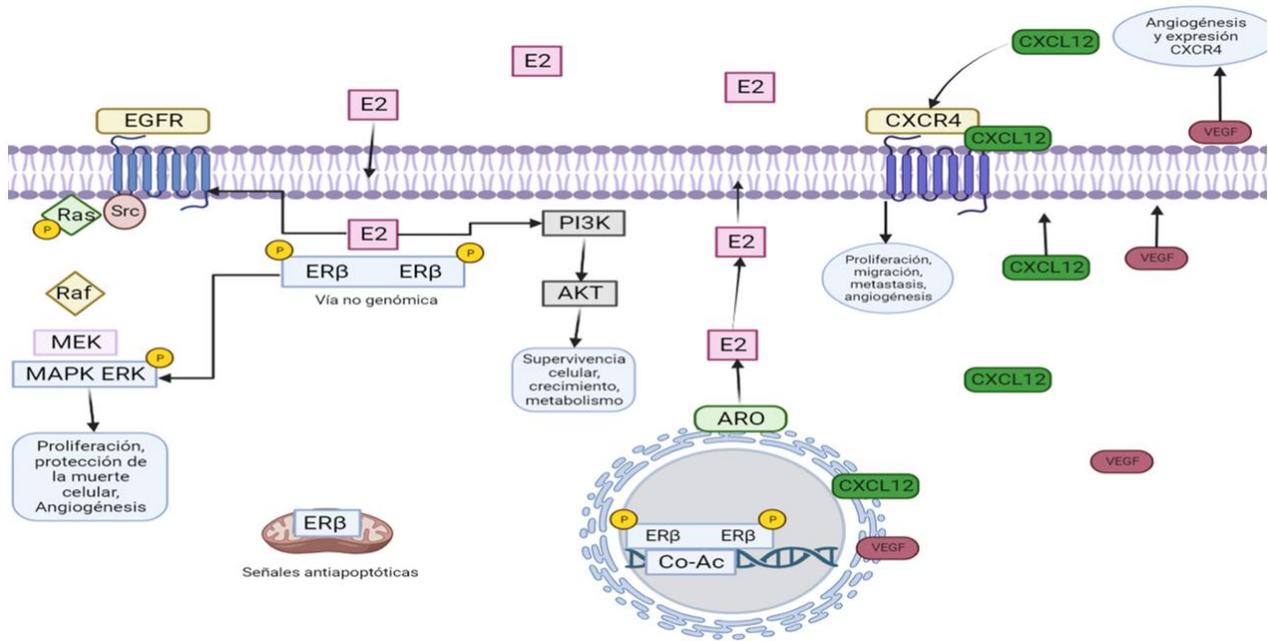


Figura 7. Vía del estrógeno en la carcinogénesis pulmonar y sus implicaciones para la terapia dirigida (tomada de Musial *et al.*, 2021)

1.6 Fármacos antineoplásicos y sus mecanismos de acción

Existen diversos medicamentos y sustancias que se utilizan para el manejo del cáncer, incluyendo el uso de profármacos. Un profármaco se define como una forma químicamente modificada de un compuesto farmacológicamente activo que sufre transformaciones bioquímicas o químicas antes de ejercer su acción farmacológica. Los fármacos precursores se pueden considerar como moléculas que contienen grupos protectores no tóxicos que se utilizan de forma transitoria para alterar o eliminar propiedades indeseables de la molécula original. Además, el diseño sofisticado de profármacos puede alterar la farmacocinética, prolongar la acción, reducir la toxicidad y los efectos secundarios, mejorar la selectividad y abordar los problemas de eficacia (estabilidad, solubilidad, etc.) que existen (Arpicco *et al.*, 2011).

Estos productos biofarmacéuticos tienen potencial en esta área, ya que pueden dirigir, selectivamente, potentes agentes citotóxicos hacia las células cancerosas a través de marcadores de superficie asociados a tumores, minimizando así la toxicidad sistémica (Dosio *et al.*, 2014). Los

diferentes fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular (tabla 4). La respuesta obtenida se relaciona directamente con la capacidad proliferativa de la célula, que está determinada por el tiempo de duplicación del tumor (Benedí y Gómez Del Río, 2006).

Tabla 4. Clasificación de los antineoplásicos (tomado de Benedí & Gómez Del Río, 2006)

Antineoplásicos que actúan sobre el ADN	Antineoplásicos que actúan sobre la fase de mitosis sin afectar al ADN	Antineoplásicos que actúan sobre factores extracelulares de división celular	Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario
Agentes alquilantes	Antineoplásicos de origen vegetal	Antagonistas de estrógenos	Factor de necrosis tumoral, interleucinas, anticuerpos monoclonales, vacunas BCG.
Antibióticos: antraciclinas y análogos		Antagonistas de andrógenos	
Antimetabolitos		Progestágenos	
Derivados del platino		Interferones	
Derivados de camptotecinas		Análogos de la LHRH	

1.7 Uso de compuestos de origen natural para el tratamiento de cáncer: productos fúngicos

Además de los tratamientos convencionales, se están realizando nuevas investigaciones para la búsqueda de compuestos con efectos antiproliferativos que sean de utilidad en el manejo del cáncer. Estos compuestos pueden tener su origen en productos de origen vegetal o fúngico (aquellos compuestos obtenidos precisamente de los hongos) (Laza Loaces *et al.*, 2003).

Los hongos son de gran importancia en la biotecnología como productores de compuestos farmacéuticos, metabolitos secundarios, agentes de biocontrol y otras propiedades benéficas (Barrales-Cureño & Montoya, 2014). Se ha demostrado que el consumo de hongos medicinales mejora la actividad del sistema inmune y, además, algunos de ellos poseen un alto contenido en antioxidantes que previenen la aparición de varios tipos de cáncer en el organismo. Los hongos se han utilizado desde la antigüedad, como suplementos para el tratamiento o para mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer, debido a los efectos inmunosupresores y nutricionales que poseen. Éstas estrategias de tratamiento complementarias han usado convencionalmente hongos comestibles (Fortes y Novaes, 2011).

Los hongos silvestres comestibles (HSC) tienen un alto valor económico y culinario debido a sus propiedades tanto nutricionales como medicinales. Se consideran alimentos funcionales porque, además de sus propiedades nutricionales, también se ha demostrado que tienen beneficios para la salud y pueden utilizarse para prevenir o tratar enfermedades. Su acción terapéutica se atribuye a los compuestos bioactivos contenidos en el cuerpo fructífero. En general, solo se ha estudiado el 6% de la diversidad fúngica debido a la amplia gama de HSC que se pueden consumir y utilizar de manera segura en el desarrollo de alimentos. Sin embargo, se requieren más estudios sobre las propiedades nutricionales y los beneficios para la salud que se pueden obtener con el consumo de estos compuestos (Cano-Estrada & Romero-Bautista, 2016).

1.8 Principios activos fúngicos utilizados en el combate contra el cáncer

La influencia de los hongos en la inmunidad, el cáncer y, especialmente, en la autoinmunidad, ha propiciado un creciente interés en los últimos años, lo que ha llevado a la búsqueda de compuestos específicos que pudieran tener propiedades bioactivas y a la caracterización de los mecanismos por los cuales se tienen esos efectos. Ciertos glucanos y proteínas son responsables de la mayor parte de los efectos biológicos de los hongos, particularmente con respecto a los resultados inmunomoduladores y antitumorales. Las proteínas bioactivas incluyen lectinas, proteínas inmunomoduladoras fúngicas (FIP), proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP), ribonucleasas, lacasas y otras muchas glicoproteínas (Motta *et al.*, 2021).

La producción de los diversos metabolitos secundarios por los hongos se debe, principalmente, a la incapacidad de estos organismos para sintetizar macromoléculas a partir del dióxido de carbono. Al no tener clorofila, su biología está regulada principalmente por los tipos de nutrientes de los sustratos sobre los que crecen, además de las condiciones climáticas ambientales.

La presencia de hongos en diferentes regiones o su distribución en los sustratos que provocan el crecimiento, difieren en composición, alterando y modificando su metabolismo para producir una amplia variedad de compuestos (Vega *et al.*, 2007). Los hongos se caracterizan por una forma de nutrición: la absorción heterótrofa. La producción de enzimas extracelulares permite el acceso a sustratos macromoleculares que son difíciles de degradar por otros organismos. Muchas de estas enzimas también se utilizan en procesos industriales. Estos organismos son especialmente adecuados para la obtención de enzimas con fines biotecnológicos, debido a su fácil cultivo y su alta eficiencia productiva (Levin & Forchiassin, 2006).

Se han aislado varias proteínas de hongos, como la hipsina, una forma de proteína inactivadora de ribosomas (RIP). Esta proteína exhibe actividad antiproliferativa contra células leucémicas de ratón, así como contra las células leucémicas y del hígado humano. Además, se ha aislado un péptido similar a la ubiquitina (ULP) del hongo *Calvatia caelata*, que provoca reducción en la viabilidad de las células de mama. Una ULP de *Agrocybe cylindracea* mostró actividad

antiproliferativa frente a células de leucemia y de hepatoblastoma. Las ULP de *Calvatia caelata* parecen exhibir una actividad antiproliferativa más fuerte que las ULP de *Agrocybe cylindracea*. Las lectinas TML-1 y TML-2 de *Tricholoma mongolicum* mostraron actividad antiproliferativa en células p815 de mastocitoma de ratón. La lectina de *Pleurotus eous* inhibió la proliferación celular de hepatoma HepG2. La lacasa de *Agrocybe cylindracea* inhibió la proliferación de células de hepatoma HepG2 y células de cáncer de mama (Hu et al., 2011; T. Ng y Wong, 2013). En la literatura se han descrito varias lacasas de hongos, sin embargo, sólo se conoce que *Agrocybe cylindracea* contiene lacasas con actividad antiproliferativa (T. B. Ng y Wong, 2013). La actividad antitumoral de las lacasas y las peroxidasa probablemente se deba a la presencia de quinonas naturales producidas por la oxidación del fenol. Las células tumorales son abundantes en NAD(P)H-quinona oxidoreductasa (DT-diaforasa), que convierte las quinonas en sustancias citotóxicas. Algunos agentes antineoplásicos, como la geldanamicina, se basan en la activación selectiva de quinonas y moléculas similares a quinonas como agentes citotóxicos en las células tumorales (T. B. Ng y Wong, 2013).

A este respecto, recientemente se ha observado que *Agrocybe* aff. *pediades* tiene potenciales propiedades antineoplásicas relacionadas con la expresión de enzimas de tipo lacasa, como se describirá más adelante. *Agrocybe* aff. *pediades* es un organismo saprótrofo, descomponedor de sustratos vegetales complejos, que promueve la fertilidad del suelo y que forma parte del grupo de organismos importantes en el reciclaje de materia orgánica y en los ciclos biogeoquímicos (Santos et al., 2021). Se puede encontrar en hierba, céspedes, pastizales y otros tipos de sustratos. Además, es un hongo muy apreciado por su comestibilidad, por lo que ha sido estudiado desde un punto de vista médico debido a sus biocomponentes activos, responsables de ejercer efectos antimicrobianos y antivirales (Acharya et al., 2017).

La localización de este hongo en el país ha sido reportada en la Ciudad de México, asociado con gramíneas; en Baja California Norte, en Michoacán y en Tlaxcala. En este último Estado, un representante de esta especie, el cual se extiende en una superficie muy pequeña que ha sido

desarrollada para fines agrícolas, aparece en un bosque de sabino o *Juniperus*. Sin embargo, poco se conoce sobre la diversidad fúngica de este tipo de bosques, teniendo como consecuencia que los trabajos enfocados en evidenciar la importancia de las especies fúngicas para el desarrollo de nuevos modelos con potencial biotecnológico son escasos (Ortega Ávila, 2018).

1.9 Enzimas lacasas y su uso biotecnológico

Las lacasas son miembros de la familia de las enzimas oxidoreductasas multi cobre, que se caracterizan por poseer átomos de cobre en su centro activo. Las lacasas se encuentran en hongos, plantas, bacterias e insectos y catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, incluidos fenoles, cetonas, fosfatos, ascorbato, aminas y lignina (Mehra *et al.*, 2018). También son biocatalizadores industriales atractivos y, por lo tanto, las relaciones entre sus estructuras específicas y funciones asociadas son de gran interés, en particular para guiar el diseño de nuevas lacasas para propósitos personalizados (Zhao *et al.*, 2014).

Las lacasas son glicoproteínas diméricas o tetraméricas, con cuatro átomos de cobre por monómero (figura 9). Estos átomos de cobre se agrupan en tres sitios de óxido-reducción, denominados centros de cobre de tipo T1, T2 y T3, que se diferencian en función de sus propiedades espectroscópicas y paramagnéticas (Blánquez Moya, 2015; Wu *et al.*, 2014).

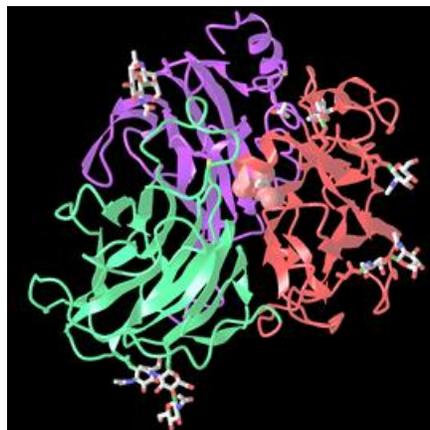


Figura 8. Estructura tridimensional de una lacasa fúngica

Centro de cobre Tipo 1 (T1): también denominado cobre azul, presenta una intensa absorción electrónica a 600 nm, lo que confiere el color azul característico a estas lacasas en estado oxidado. Numerosos estudios han determinado los potenciales del centro de cobre T1 de distintas lacasas mediante estudios potenciométricos. Así, las lacasas se han clasificado en tres grupos: a) de bajo potencial redox, con valores inferiores a 470 mV (plantas y bacterias), b) medio redox, entre 470 y 710 mV (ascomicetos y basidiomicetos) y c) de alto potencial redox, superiores a 710 mV (la mayoría producidos por basidiomicetos) frente al electrodo normal de hidrógeno (Wu *et al.*, 2014).

Centro de cobre Tipo 2 (T2): este centro de cobre está coordinado con dos histidinas y una molécula de agua, muestra afinidad por aniones como Flúor (F), Nitrógeno (N) y Copernicio (Cn), que actúan como inhibidores de la enzima (Blánquez Moya, 2015).

Centro de cobre Tipo 3 (T3): se trata de un centro binuclear formado por dos átomos de cobre acoplados antiferromagnéticamente. Cada átomo está coordinado por tres histidinas y un puente hidroxilo. Presenta un máximo de absorción a 330 nm. El centro de cobre T2 se encuentra estratégicamente localizado cerca del centro de cobre tipo 3, formando un centro trinuclear T2/T3 donde tiene lugar la reducción molecular del oxígeno a agua. Estudios realizados con lacasas de bajo potencial redox han determinado valores de potencial redox para el centro T2 de unos 400 mV. Asimismo, para lacasas de bajo y alto potencial redox, los valores de potencial de oxidorreducción del par de cobres de sus centros T3 se estimaron en 480 y 780 mV, respectivamente (Blánquez Moya, 2015) (figura 9).

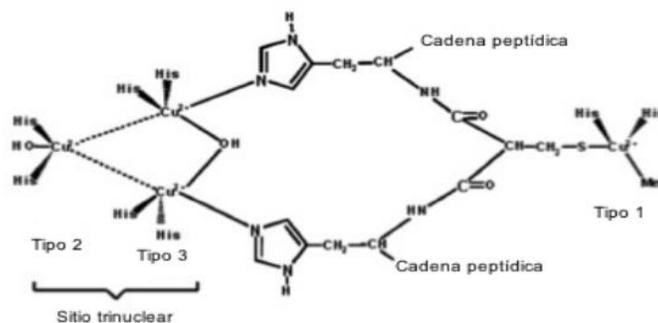


Figura 9. Sitio activo de las lacasas (obtenido de Jiménez Serna, 2016)

Se han descrito otras lacasas atípicas reducidas del cobre 1 (Cu1) y denominadas lacasas amarillas o lacasas blancas. Las lacasas amarillas son el resultado de la unión de compuestos aromáticos de la degradación de la lignina a las lacasas azules durante el crecimiento fúngico. La consecuencia es una reducción de los cobres T1 y T2 del centro activo y, por tanto, la desaparición del color azul típico. Las lacasas blancas poseen un átomo de cobre en lugar de los cuatro de las lacasas azules, dos átomos de zinc y uno de hierro por cada molécula proteica (Blánquez Moya, 2015a).

En general, las lacasas son más estables a pH alcalino que a pH ácido. También, pueden inactivarse por pérdida de átomos de cobre, condiciones proteolíticas o desnaturalizantes, etc. Las lacasas permanecen activas en un rango de pH 3-10 y un rango de temperatura de 5 -55 °C (Ramírez *et al.*, 2003).

El ciclo catalizado por la lacasa muestra un mecanismo propuesto de reducción y reoxidación de sitios de cobre. El sustrato reduce el sitio T1 del “intermedio nativo”, transfiriendo electrones al grupo trinuclear, como se observa en la figura 10 (Jiménez Serna, 2016).

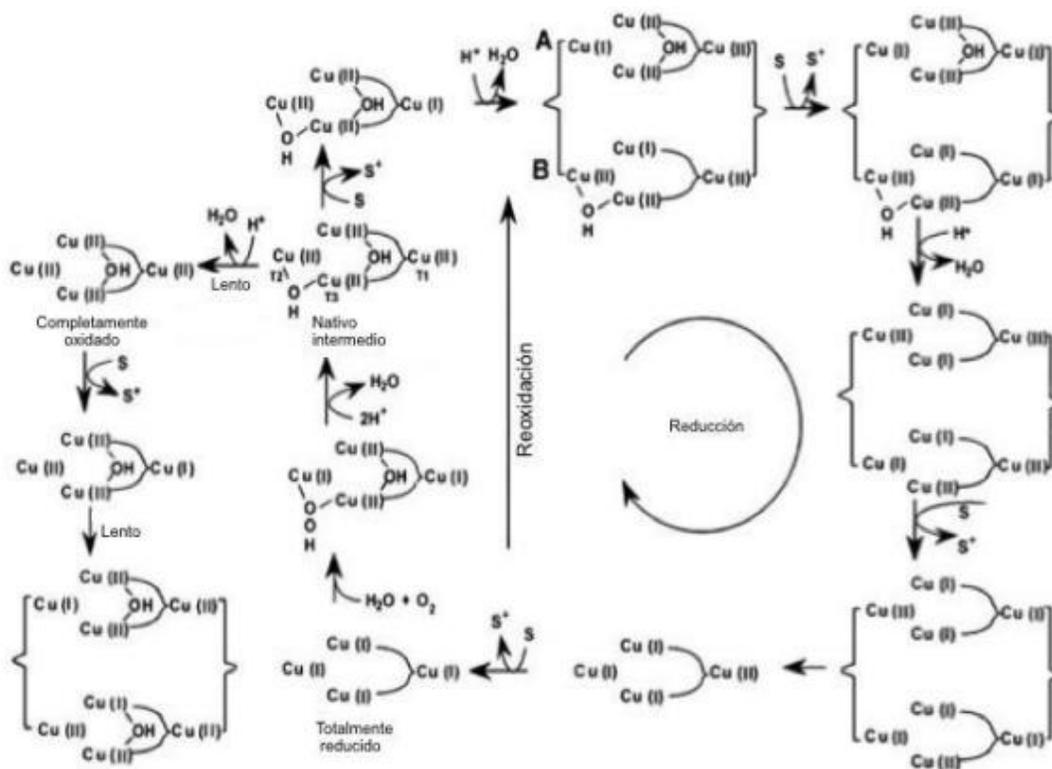


Figura 10. Mecanismo de acción de las lacasas (obtenido de Jiménez Serna, 2016)

Se han realizado investigaciones tanto con las lacasas azules como blancas para comprobar si presentan efectos antiproliferativos en células cancerosas. Algunas lacasas muestran actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer como, por ejemplo: cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer renal, melanoma, cáncer cervical, leucemia y cáncer de pulmón (Guest y Rashid, 2016; Hu et al., 2011; Matuszewska, Karp, Jaszek, Janusz, Osińska-Jaroszuk, et al., 2016; Wu et al., 2014).

I.2 Antecedentes

El primer registro de actividad antiproliferativa de la lacasa se remonta a 2006. A partir del 2010 se demostró que ocho nuevas lacasas de ocho basidiomicetos diferentes tenían actividades antiproliferativas, principalmente contra líneas celulares de cáncer de mama y carcinoma de hígado. En 2011, Hu *et al.*, purificaron una lacasa del cuerpo fructífero comestible de *Agrocybe cylindracea* con actividad inhibidora de la transcriptasa inversa del VIH-1 ($IC_{50} = 12.7 \text{ M}$) y con actividad antiproliferativa frente a células HepG2 ($IC_{50} = 5.6 \text{ M}$) y células MCF7 ($IC_{50} = 6.5 \text{ M}$). Esta lacasa tiene una nueva secuencia N-terminal y una masa molecular de 58 kDa (en el rango de la mayoría de otras lacasas de hongos). El pH óptimo fue 3-4 y la temperatura óptima de 50 °C. Además, la actividad de las lacasas mostro diferencias de un sustrato a otro. En 2013, Wellington *et al.*, realizaron un estudio de una lacasa comercial, Suberase® de Novozymes, para catalizar la síntesis de benzo [b] furanos 5,6-dihidroxiados y derivados de catecol. Los resultados, en algunos casos fueron, similares o mejores que los obtenidos por otras síntesis enzimáticas, químicas o electroquímicas. Los derivados sintetizados se examinaron frente a líneas celulares de cáncer renal (TK10), melanoma (UACC62), mama (MCF7) y cervicouterino (HeLa). Los análisis mostraron que los efectos citostáticos de los benzo [b] furanos 5,6-dihidroxiados fueron más efectivos contra la línea celular de cáncer de melanoma (UACC62), con varios compuestos que exhibieron potentes actividades inhibidoras del crecimiento ($GI_{50} = 0,77-9,76 \text{ } \mu\text{M}$). Entre ellos, dos compuestos mostraron una actividad superior a la del agente anticancerígeno etopósido ($GI_{50} = 0,89 \text{ } \mu\text{M}$). Estos resultados fomentan la realización de estudios adicionales sobre los benzo [b] furanos 5,6-dihidroxiados para su posible aplicación en la terapia contra el cáncer. En 2014, Wu *et al.*, evaluaron una nueva lacasa aislada del caldo de fermentación del hongo *Pleurotus cornucopiae*, mostró actividad inhibidora de la transcriptasa inversa del VIH-I y efectos anti proliferativos en las células tumorales. Esta lacasa, con una masa molecular de 67 kDa, fue purificada mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. Su actividad se observó notablemente

inhibida por Fe^{3+} y Hg^{2+} , mientras que fue estimulada por Cu^{2+} y Pb^{2+} . Además la lacasa, inhibió la proliferación de las células de hepatoma HepG2 y de cáncer de mama MCF-7, así como la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-I, con valores IC^{50} de 3.9, 7.6 y 3.7 μM , respectivamente. En el mismo año, Zhao *et al.* realizaron un estudio sobre una nueva lacasa con potentes actividades antiproliferativas e inhibidoras de la transcriptasa inversa del VIH-1, obtenida a partir de micelio del hongo *Coprinus comatus*. Para ello, aislaron y purificaron la lacasa mediante un procedimiento que incluía tres pasos de cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa, CM-celulosa y Q-Sepharosa) y un paso de filtración en gel en Superdex 75 mediante cromatografía líquida rápida de proteínas. La lacasa obtenida mostro una potente capacidad para suprimir la proliferación de las líneas celulares tumorales HepG2 y MCF7, e inhibió la transcriptasa inversa (RT) del VIH-1 con valores de IC_{50} de 3.46 M, 4.95 M, y 5.85 M, respectivamente, lo que sugiere que es una proteína con potencial anti patogénica. En 2016, se realizó una revisión bibliográfica sobre las lacasas y su posible aplicación en el campo de la terapéutica, especialmente contra el cáncer (Charles Guest & Rashid, 2016).

Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo responsable de esta actividad. Varias lacasas han demostrado su capacidad para degradar estrógenos, y actualmente se están utilizando en estrategias para tratar la contaminación ambiental. Esta propiedad podría ser clave para prevenir el desarrollo del cáncer. En 2021, Sondhi *et al.*, llevaron a cabo un estudio en el que aislaron una nueva lacasa blanca de *Bacillus sp.* MSK-01 a la que denominaron MSKLAC. La lacasa MSK se purificó y caracterizó en detalle, la cual presenta un peso molecular de 32 kDa. Esta lacasa es una enzima altamente termoestable, con una temperatura óptima de 75 °C y puede conservar más del 50% de actividad incluso tras incubarse a 100 °C. MSKLAC demuestra estabilidad en presencia de la mayoría de los iones metálicos y tensioactivos evaluados. Además, se evaluó su efecto sobre una línea celular de cáncer de pulmón y se observó que inhibe el crecimiento de dicha línea. Las características catalíticas de esta lacasa difieren de las lacasas de hongos, como *Agrocybe aff.*

pediades, una cepa local del estado de Tlaxcala, lo que plantea del de interés de investigar si también presenta actividad antiproliferativa en células de cáncer de pulmón.

I.3 Preguntas de investigación

¿Cuál es el efecto de la lacasa extracelular de *Agrocybe aff. pediades* sobre la proliferación de células cancerosas de pulmón A549?

¿En qué medida es específico el efecto antiproliferativo de esta lacasa sobre las células cancerosas A549?

I.4 Hipótesis

La lacasa de *Agrocybe aff. pediades* exhibirá una afinidad suficiente por el 17 β -estradiol producido por las células de cáncer de pulmón A549, lo que permitirá su degradación e inhibirá la proliferación de esta línea celular sin afectar la tasa de crecimiento de las células normales de fibroblastos de la línea LL29.

I.5 Justificación

La presente investigación tiene como objetivo determinar el potencial de una lacasa de *Agrocybe aff. pediades* como un agente antiproliferativo para el tratamiento de cáncer de pulmón, utilizando un modelo *in vitro*. Este tipo de cáncer se asocia con la exposición a contaminación ambiental, resultado del incremento de la actividad antropogénica en los últimos años, lo que ha llevado a un incremento en la manifestación de enfermedades oncológicas. Diversos estudios han demostrado que los distintos tipos de lacasas presentan actividad antiproliferativa en células cancerosas, aunque de manera diferencial dependiendo del tipo de cáncer. Por lo tanto, esta investigación pretende aportar información sobre el potencial de una lacasa extracelular semipurificada de *Agrocybe aff. pediades* sobre células cancerosas, con el fin de corroborar su actividad antiproliferativa. Dado que esta, es una especie local, su uso podría favorecer un mayor aprovechamiento de este organismo en la biotecnología y la medicina.

I.6 Objetivos

6.1 Objetivo general

- ❖ Evaluar el efecto antiproliferativo de extractos crudos enzimáticos con actividad lacasa extracelular y de la lacasa extracelular semipurificada de *Agrocybe aff. pediades* sobre células de cáncer de pulmón de la línea A549, así como su ausencia de efecto citotóxico sobre la viabilidad de células normales de la línea LL29.

6.2 Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar el extracto crudo enzimático extracelular de cultivos líquidos de *Agrocybe aff. pediades* y las fracciones obtenidas mediante cromatografía rápida de proteínas (FPLC) utilizando columnas de intercambio iónico y filtración en gel. Se evaluará la actividad lacasa para determinar el grado de purificación en términos de actividad enzimática y se probará su efecto dosificado sobre la línea de células de cáncer de pulmón A549.
- ❖ Determinar el potencial antiproliferativo de los extractos caracterizados evaluando su actividad proliferativa sobre la línea de células de cáncer de pulmón A549. Para evaluar el efecto citotóxico de los extractos caracterizados sobre la línea de fibroblastos LL29, con el fin de demostrar la ausencia de efectos indeseables sobre células normales.

II. Metodología

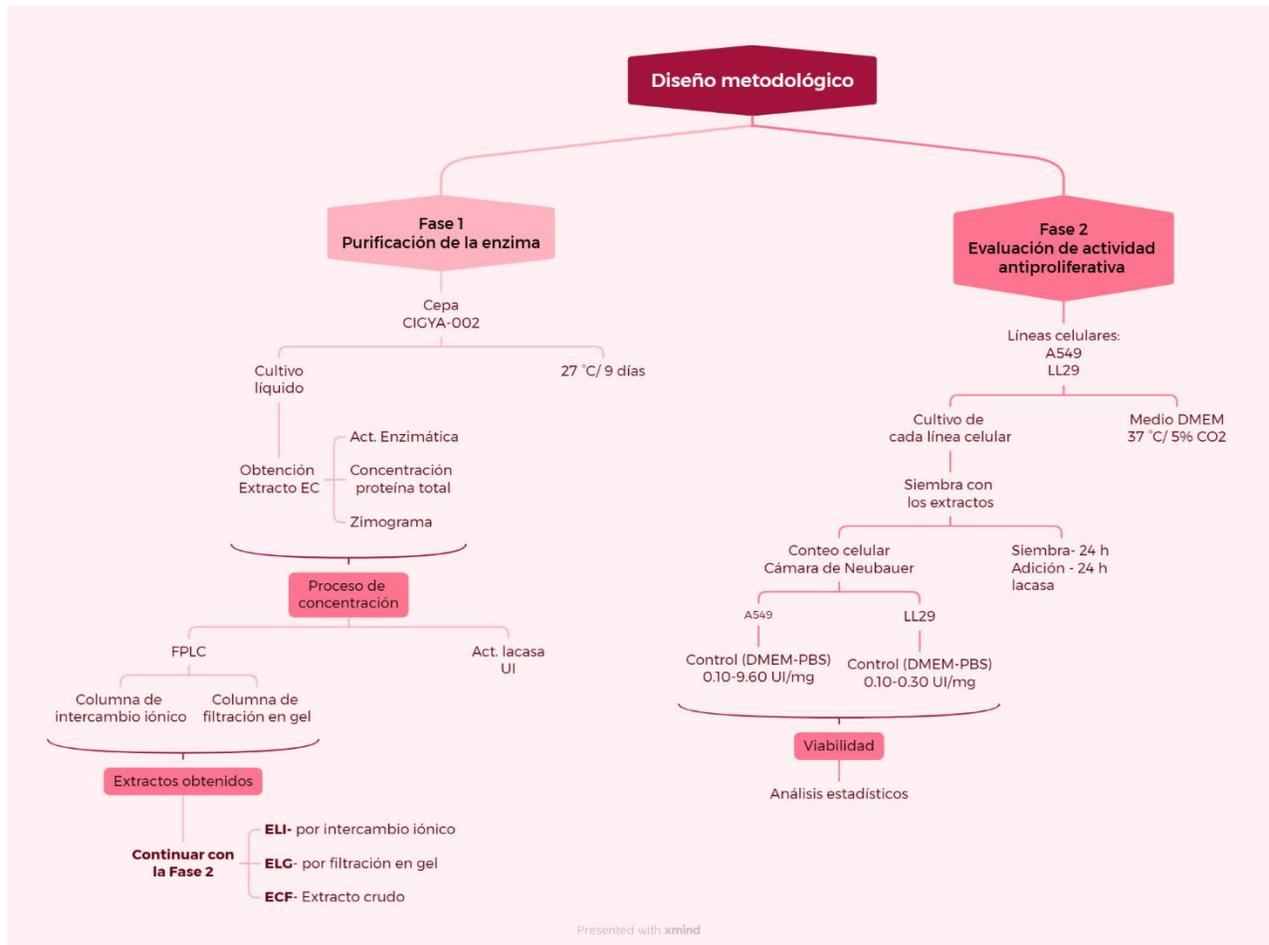


Figura 11. Diseño metodológico del proyecto

El diseño metodológico consistió en dos fases: la purificación de la lacasa y la evaluación de la actividad antiproliferativa. Abreviaturas: **EC**- Extracto crudo; **FPLC**- Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas; **UI**- Unidades Internacionales; **ELI**- Extracto Lacasa Iónico; **ELG**- Extracto Lacasa Gel; **ECF**- Extracto Crudo Filtrado; **A549**- línea celular humana derivada de un carcinoma pulmonar de células no pequeñas; **LL29**- línea celular de fibroblastos pulmonares derivados de tejido pulmonar humano con fibrosis pulmonar idiopática, **DMEM**- Medio Eagle modificado de Dulbecco y **PBS**- Solución salina de Buffer de Fosfatos.

II.1 Organismo de estudio

Se utilizó la cepa CIGYA-002 de *Agrocybe aff. pediades* conservada en medio extracto de malta (EMA) a 4 °C. Pertenece a la colección de cepas del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente. Este organismo cuenta con registro en la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CM-CNRG 700).

II.2 Propagación de las cepas

La cepa fue cultivada en cajas de Petri con 20 mL de medio agar extracto de malta (EMA), utilizando como inóculo cuatro cilindros de agar de 1 cm de diámetro, colonizado con micelio e incubado a 24 °C durante nueve días.

II.3 Obtención de los extractos de lacasa

El medio de cultivo líquido empleado para el crecimiento del hongo fue un medio mineral con glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (preparación en el anexo 1). El cultivo se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 250 mL del medio líquido, incubado con agitación orbital constante de 115 rpm, a 30 °C, durante 9 días (tiempo en el cual se ha reportado que el hongo ya se encuentra en la fase estacionaria y la actividad enzimática lacasa es la más alta en este medio) (Torres-González, 2017). Se llevaron a cabo diferentes métodos de filtración por separación de tamaño mediante porosidad, permitiendo fraccionar y eliminar interferencias en la obtención del extracto con la enzima. Al final se realizó una ultrafiltración con una membrana (Sartocon® Slice 200 and Sartocon Slice Hydrosart®UF) equipada para la obtención de enzimas en diferentes concentraciones. Esto permitió que se obtuviera un extracto concentrado de forma más eficiente.

II.4 Determinación enzimática de los extractos y zimografía

Para evaluar la actividad enzimática extracelular se utilizó el extracto crudo enzimático extracelular (ECEE), midiendo el cambio de absorbancia asociada a la oxidación del sustrato, 2,6-dimetoxifenol DMP (2 mM) en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 6.5) a 468 nm, utilizando un espectrofotómetro marca JENWAY 6305 UV/Vis. La cuantificación de la actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI), definiéndose una UI como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol de DMP en producto por minuto. La actividad enzimática se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Enzimática} = \frac{\frac{\text{Absorbancia}}{\text{minuto}} * \text{Volumen total de la mezcla}}{\text{Tiempo total} * \text{Coeficiente molar} * \text{Volumen de enzima}}$$

Para la cuantificación de la actividad lacasa se empleó un blanco de calibración que constó de 200 μ L de agua destilada estéril y 800 μ L de DMP en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 6.5). La mezcla de reacción consistió en 200 μ L de ECEE y 800 μ L de DMP. La reacción se incubó durante 4 minutos a 39 °C y se midió la absorbancia a 468 nm (Sharma *et al.*, 2016). Se cuantificó la proteína total en el ECEE, empleando el método de Bradford (Bradford, 1976), siguiendo el protocolo para microplaca de Bio Rad; en un volumen de 150 μ L de la muestra de ECEE, al que se le adicionaron 150 μ L del reactivo de Bradford 1x. Esta mezcla se agitó por pipeteo. Posteriormente, se midieron los valores de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro digital ultravioleta marca Thermo Scientific Multiskan GO. El blanco consistió en 150 μ L de agua destilada estéril y 150 μ L de reactivo de Bradford 1x, al cual se le aplicó el mismo procedimiento. Para la curva patrón se emplearon distintas concentraciones de albúmina bovina diluida en agua destilada y se continuó con el mismo procedimiento (ver anexo 2).

Para determinar la presencia de isoenzimas o isoformas de enzimas con actividad lacasa en el extracto de cultivo de *A. aff. pediades* se realizaron ensayos de zimografía. Se realizó una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones semi-desnaturalizantes. La

muestra se aplicó en geles del sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad) y se sometió a una corriente de 120 V durante 1.25 h. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada durante 1 h, cambiando el agua cada 15 min para eliminar el SDS. Finalmente, los geles se incubaron en soluciones 2 mM del sustrato (DMP) (Téllez-Téllez *et al.*, 2012).

II.5 Purificación de las lacasas de *Agrocybe aff. pediades*

Para realizar la purificación de las enzimas con actividad lacasa producidas por *A. aff. pediades* primero se concentró el ECEE correspondiente al tiempo de cultivo en el cual se detecta mayor actividad lacasa específica. Para este protocolo se preparó un volumen de 2 L de extracto y se realizó una filtración en papel filtro Whatman número 4 de 125 mm de diámetro, colocado en un embudo Buchner de cerámica, para la separación del extracto líquido de la biomasa; después se hizo una filtración a través de una membrana de 45 µm de acetato de celulosa de 47 mm de diámetro, conectado a un equipo de filtro de microfibra Sartorius Stedim Biotech y posteriormente se utilizó la ultrafiltración para la separación de proteínas del extracto enzimático utilizando una membrana Hydrosart con un límite de peso molecular de 30 kDa, a temperatura ambiente (30 ± 2 °C). Se utilizó un conjunto de casete UF de flujo cruzado Sartocou Slice 200 para la separación por membrana con una membrana Hydrosart (0,02 m² área de superficie, M/s Sartorius stedim biotech). La presión transmembrana se ajustó a 3 mbar. El extracto se bombeó a través del sistema usando una bomba peristáltica a 60 rpm (Watson Marlow 323) que permitió hacer el bombeo de circulación para las fracciones mayores a 30 kDa y fracciones menores a 30 kDa. Finalmente se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 mM (un inhibidor de proteasas, para asegurar que las lacasas no se degraden). En cada uno de los procesos descritos anteriormente se realizó la medición tanto de actividad enzimática como de la cuantificación de proteínas totales del ECEE.

5.1 Cromatografía de intercambio iónico

La purificación de la enzima con actividad lacasa se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando el sistema BioLogic Chromatography Systems BioRad (FPLC), acoplado a una columna de 16 mL (Econo-Column 10 BioRad), empacada con resina UNOSphere Q Strong Anion Exchange Media. Para la programación del protocolo de purificación se empleó el software BioLogic DuoFlow Software Versión 5.3. Se cargaron 200 µL de muestra en la columna y se empleó un flujo de 1 mL por minuto, se utilizó buffer A (buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.5) y buffer B (buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.5 con KCl 1M), se programó un gradiente isocrático de 0 a 100% de buffer B y se colectaron muestras de 1 mL. Las fracciones proteicas consecutivas que presentaban actividad lacasa se unieron y se concentraron. Dependiendo del volumen, se determinó el método para concentrar las fracciones ya fuera por una celda de ultrafiltración equipada con una membrana de 30 kDa (Stirred Ultrafiltration Cell) conectado a nitrógeno para filtrar bajo presión o con tubos concentradores Millipore Amicon TM Ultra-15 de 10000 MWCO (Merck TM), centrifugando a 2000 rpm hasta lograr la mayor concentración de enzima posible.

5.2 Cromatografía por filtración en gel

Para obtener una mejor purificación de los extractos se empleó cromatografía por filtración en gel, utilizando el mismo sistema BioLogic Chromatography Systems BioRad (FPLC), acoplado a una columna de 16 mL (Econo-Column 10 BioRad), empacada con resina Sephadex G-75. Para la programación del protocolo de purificación se ocupó el software BioLogic DuoFlow Software Versión 5.3. Se cargaron 3 mL de muestra en la columna y se empleó un flujo de 1 mL por minuto, utilizándose buffer A (buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.5) y colectándose muestras de 1 mL. Las fracciones proteicas que presentaban actividad lacasa se unieron y se concentraron con tubos concentradores Millipore Amicon TM Ultra-15 de 10000 MWCO (Merck TM), centrifugando a 2000 rpm hasta lograr la mayor concentración de enzima posible.

II.6 Líneas celulares

Las células **A549** provienen de una célula epitelial que se aisló del pulmón de un hombre blanco de 58 años con carcinoma pulmonar mientras que las células **LL29** son fibroblastos de pulmón derivados de tejido pulmonar humano con fibrosis pulmonar idiopática. Ambas son líneas comerciales provenientes de ATCC.

En los dos casos fue necesario descongelar las células mediante un baño maría a 37 °C, adicionar 1 mL de medio (preparación en el anexo 1) a los tubos de criocongelación y traspasar el líquido a tubos de 15 mL con 5 mL de medio para centrifugar a 1200 rpm durante 12 min a temperatura ambiente. Después, se resuspendió el pellet en 1 mL de medio, el cual se colocó en la caja para crecer (a la que, previamente, se habían añadido 5 mL de medio). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con recambio de medio óptimo cada 2 a 3 días.

II.7 Ensayo de actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales y determinación de IC₅₀

Para el ensayo se realizó un diagrama de placa con las respectivas unidades de actividad lacasa de los extractos enzimáticos, una guía que se puede observar en la figura 12, en la que cada extracto queda identificado (forma de estrella).

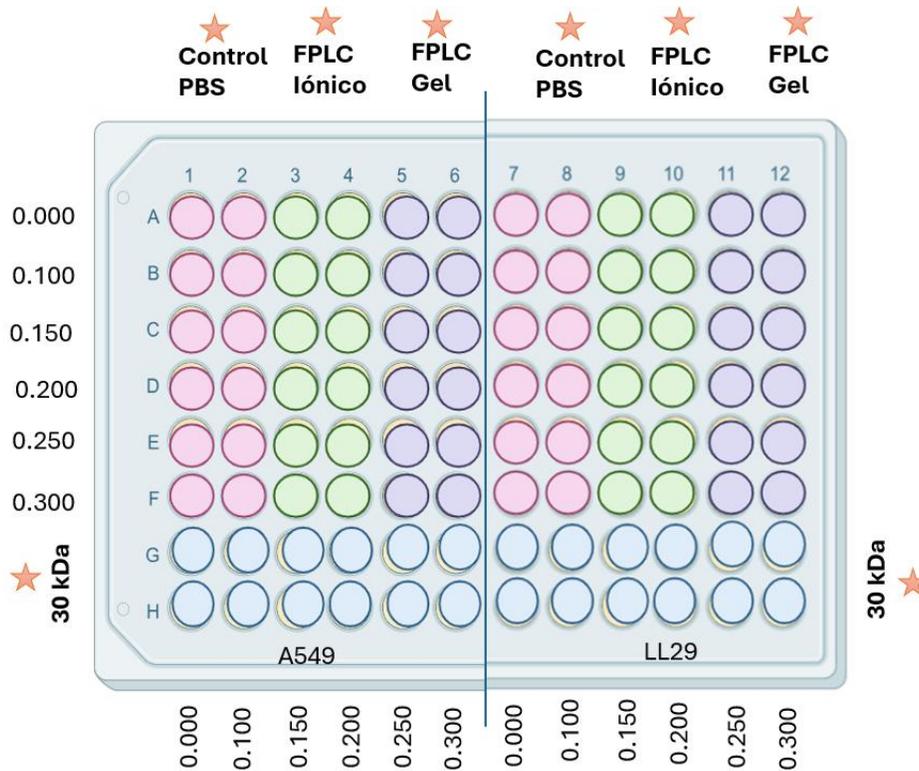


Figura 12. Esquema de placa para el cultivo de células en las diferentes unidades de actividad lacasa de los extractos enzimáticos, con su respectiva réplica

Para el ensayo antiproliferativo se cultivaron células de cáncer de pulmón en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), penicilina 100 UI/mL y estreptomicina 100 mg/L. Posteriormente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una concentración final de 2×10^6 células/pocillo y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5 % (v/v) de CO₂. A continuación, se añadieron concentraciones crecientes del extracto enzimático (0.100, 0.150, 0.200, 0.250 y 0.300 UI/mg) en medio DMEM completo a los pocillos y se incubó durante 24 h. Posteriormente, se agregaron 10 µL de una solución de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazolio (MTT) (5 mg/mL) en cada pocillo, seguido de incubación durante 4 h. El MTT formado en el fondo del pocillo se disolvió con 100 µL de solución de solubilización durante la noche y se midió la absorbancia de la microplaca con el uso de un Lector

ELISA a 550-600 nm con el Microplate Data Acquisition and Analysis software, versión SoftMax Pro-6.0 con una referencia longitud de onda de >650 nm. (ver anexo 4) (Mosmann, 1983).

II.8 Conteo celular

La cámara de Neubauer se utilizó para contar células en un volumen conocido de líquido. La muestra fue homogeneizada para asegurar la distribución uniforme de las células, posteriormente, se colocaron 10 μ L de la suspensión de células en la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer fue colocada en un microscopio invertido (modelo 9909960) y se enfocó el campo de visión usando el objetivo de baja magnificación (10x), para explorar toda el área cuadrículada (figura 13).

Para el recuento de las células, se contaron las células que estaban dentro o en el borde de las líneas y para el cálculo de recuento total se utilizó el número de células contadas en las cuadrículas y considerando el factor de dilución (1:10,000); se calculó el recuento total de células por volumen de muestra.

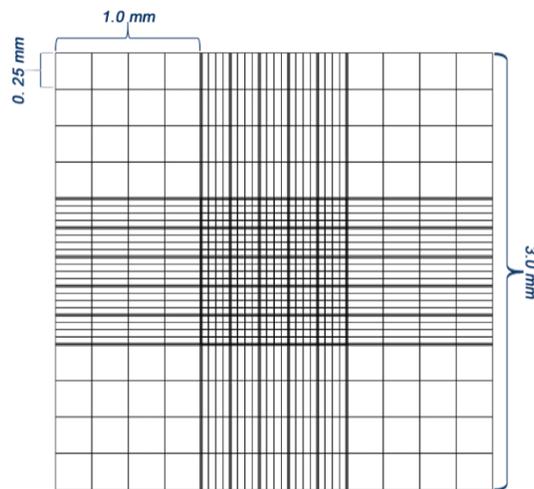


Figura 13. Cuadrantes de la cámara de Neubauer para el conteo de las células

II.9 Análisis estadísticos

Determinación IC₅₀: el análisis fue utilizado para determinar la concentración en la que la mortalidad de las células inducidas por la lacasa fue del 50% (IC₅₀) por el uso de un algoritmo de regresión de máxima verosimilitud.

Todos los valores se mostraron como la media \pm SEM de tres réplicas de experimentos. Se determinó la normalidad utilizando la prueba Kolmogorov-Smirnov, se analizaron las diferencias entre los grupos en todos los experimentos. La diferencia significativa fue determinada mediante ANOVA, las comparaciones entre medias se analizaron mediante la prueba *post hoc* de Bonferroni. Los análisis estadísticos fueron efectuados en GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA). Se consideraron valores significativos $P < 0.05$.

III RESULTADOS

III.1 Caracterización del extracto crudo enzimático extracelular de cultivos líquidos de *A. aff. pediades*

1.2 Purificación de las enzimas lacasa de *Agrocybe aff. pediades*

Después de obtener el extracto mediante diversos métodos de filtración por separación de tamaño y el proceso de ultrafiltración, se obtuvo un extracto crudo enzimático con un volumen de 50 mL. A partir de este extracto, se realizaron inyecciones en el FPLC. Cabe señalar que se conservó una muestra de este extracto sin inyectar al FPLC para llevar a cabo pruebas antiproliferativas y de viabilidad el cual se denominó **ECF**.

Después del análisis que se realizó en el sistema BioLogic Chromatography Systems BioRad (FPLC) y con las características descritas en el punto 7.5 de la metodología, se obtuvo como resultado un cromatograma (figura 14), que permite observar la dinámica de interacción entre la fase estacionaria de la columna de 16 mL (Econo-Column 10 Biorad), empacada con resina UNOSphere Q Strong Anion Exchange Media y la muestra.

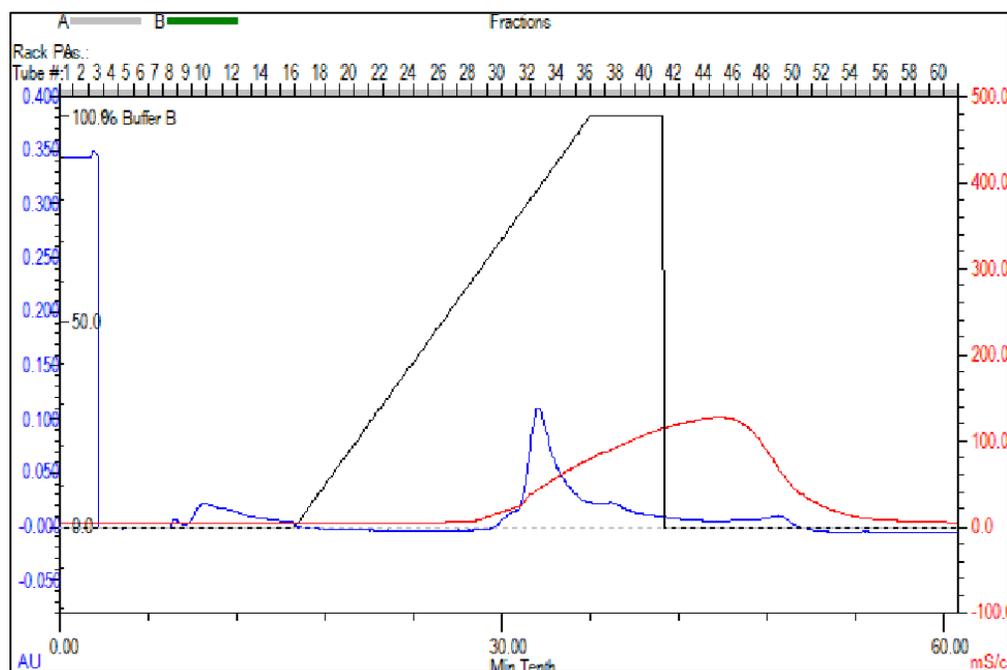


Figura 14. Cromatograma obtenido del FPLC

En el cromatograma se observa la interacción de la muestra al ser inyectada en la columna marcada por la absorbancia (línea azul) y al estar en la fase móvil en el aumento de gradiente (línea negra) lo que permitió el monitoreo de la enzima para su recolección por fracciones.

Con base en el cromatograma de todas las fracciones obtenidas durante la corrida, se observó un cambio de absorción en la fracción número 10, lo que indica la pérdida de proteínas en la columna. Sin embargo, al medir la actividad enzimática de esa fracción, se confirmó que la lacasa aún se mantenía en la columna, como se evidenció por el cambio de absorción que ocurrió entre las fracciones 31 al 36 donde se incorporó el buffer b, aumentando las sales al 50 %. Dado que la lacasa permaneció en la columna, se realizaron más pruebas para recolectar fracciones con actividad enzimática. Cada prueba consistió en la inyección de 200 µL de extracto concentrado.

1.2.1 Cromatografía de intercambio iónico

La purificación en columna de intercambio iónico mostró una disminución de la actividad enzimática del extracto, siendo no tan eficiente como método para la purificación; los datos se pueden verificar en la tabla 5. En la figura 15 se pueden observar las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática en el gradiente de interacción de la columna.

Tabla 5. Programa de purificación de la lacasa de *Agrocybe aff. pediades* por Intercambio iónico (ELI)

Etapa	Actividad enzimática UI (1ml)	Volumen (mL)	Actividad total (UI/mL)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
Lisado crudo	5.16	1800	9288	1	100
Ultrafiltración (30 kDa)	15.19	45	718.65	0.08	7.74
Cromatografía de intercambio iónico	0.75	15	11.25	0.00	0.12
Ultrafiltración (10 kDa)	0.22	5	1.10	0.00	0.01

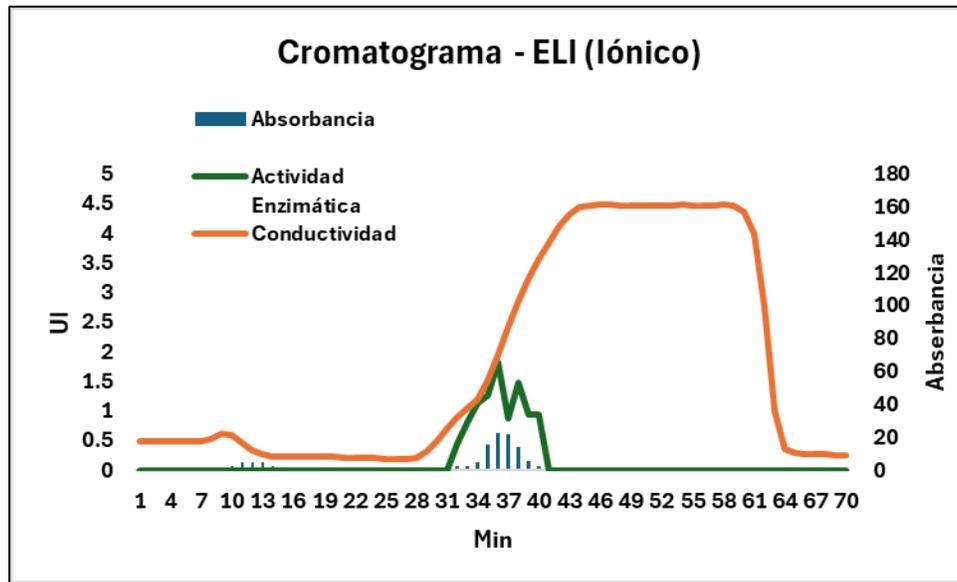


Figura 15. Cromatograma de la lacasa en columna de intercambio iónico

Se puede observar que a partir del minuto 31 comienza a aumentar la absorbancia (azul) indicando la interacción del extracto con la columna y en comparación el aumento igual de la actividad enzimática (línea verde) y que aproximadamente en el minuto 41- 42 ya no existe esa interacción en el gradiente.

En la figura 15 se presenta el cromatograma obtenido a partir de la inyección del extracto en el FPLC. Se observa que a partir de la fracción (minuto) 31 comienza un incremento de actividad enzimática, en congruencia con la absorbancia que de igual manera incrementa. Este efecto termina en la fracción número 40 en ambos casos (tanto en absorbancia como en actividad enzimática). Sin embargo, al concentrar las fracciones con mayor actividad enzimática utilizando los tubos Amicon® Ultra- 15 de 10 kDa, se observó una disminución de la actividad en lugar de un aumento. Por lo tanto, basándose en las pruebas realizadas con la columna de 16 mL (Econo-Column 10 Bio rad), empacada con resina UNOSphere Q Strong Anion Exchange Media, y al confirmar que la lacasa permanecía en esta conducta, se rediseñó el protocolo para utilizar una columna de filtración en gel Sephadex G-75, con el objetivo de obtener una enzima purificada y con mayor actividad enzimática.

1.2.2 Cromatografía por filtración en gel

La purificación en columna de filtración en gel permitió obtener la enzima con mayor presencia de actividad enzimática (tabla 6). En el cromatograma (figura 16) se observa la presencia de la enzima antes del pico de absorbancia más alto, lo que sugiere la existencia de otras proteínas de tamaño similar a la lacasa (55 kDa). Sin embargo, fue posible realizar la separación por tamaño, teniendo en cuenta la medición de la actividad enzimática.

Tabla 6. Programa de purificación de la lacasa de *Agrocybe aff. pediades* por Filtración en gel (ELG)

Etapas	Actividad enzimática UI (1 ml)	Volumen (mL)	Actividad total (UI/mL)	Purificación (veces)	Recuperación (%)
Lisado crudo	3.45	800	2760	1	100
Ultrafiltración (30 kDa)	12.82	40	512.80	0.19	18.58
Cromatografía de filtración en gel	8.64	10	86.40	0.03	3.13
Ultrafiltración (10 kDa)	12.09	5	60.45	0.02	2.19

En el cromatograma resultante del FPLC con inyección del extracto, se observó un incremento de la actividad enzimática a partir de la fracción número 12, hasta un descenso en la fracción número 20, observándose mayor actividad enzimática en las fracciones 16 – 20, que presentan una baja absorbancia.

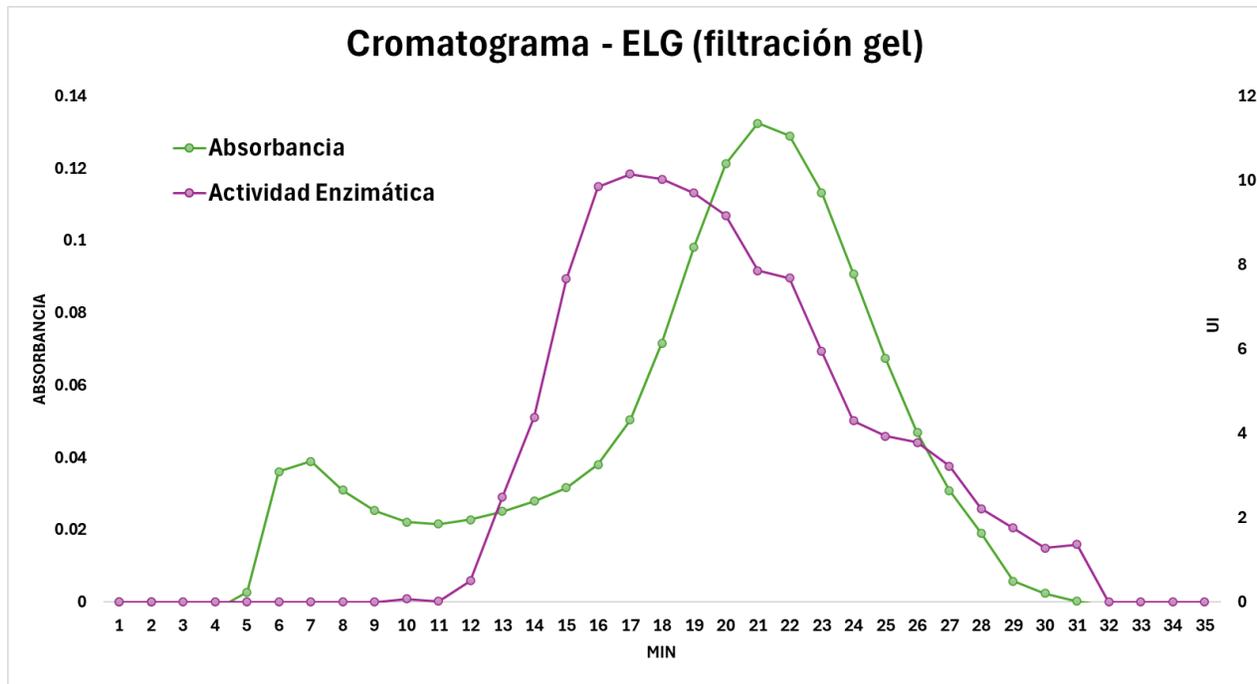


Figura 16. Cromatograma de la lacasa de las fracciones eluidas en la filtración en gel

Se observa solo el cambio de absorbancia durante la inyección de muestra (línea verde) y como la medición de actividad enzimática (línea rosa) es antes del incremento que marca la absorbancia lo que muestra que hay presencia de otras proteínas de un peso mayor que no permite obtener como tal la lacasa pura.

1.2.4 Determinación enzimática de los extractos

Al final se obtuvieron tres extractos, que se denominaron **ELI** (semipurificado, obtenido por columna de intercambio iónico y suspendido en buffer de fosfatos), **ELG** (semipurificado, obtenido por columna de filtración en gel y suspendido en buffer de fosfatos) y **ECF** (extracto crudo, obtenido por membrana de 30 kDa). Se determinaron conforme a su actividad enzimática (tabla 7) en cada etapa que se fraccionaron.

Tabla 7. Determinación enzimática y proteica del **ECF**

Etapa	Actividad Enzimática (UI)	Cuantificación proteínas (mg)	Actividad específica (UI/mg)

Lisado	5025	4.76	1055.67
Separación biomasa	5325	5.26	1012.36
Filtrado membrana 45 μm	5430	5.26	1032.32
Ultrafiltración	384.75	8.59	44.79

Cada etapa de separación (fragmentación) se evaluó la actividad enzimática como la cuantificación de proteína hasta obtener el extracto ECF y a partir de este se hicieron las inyecciones al FPLC

Para determinar la presencia de isoenzimas o isoformas de enzimas con actividad lacasa en el extracto de cultivo de *A. aff. pediades* se realizaron ensayos de zimografía (figura 17) y para determinar las diferentes proteínas contenidas se realizó una tinción de plata con el kit Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific™, número 24612) y el kit Silver Stain Plus™ (Bio-Rad, #161-0449) (figura 17).

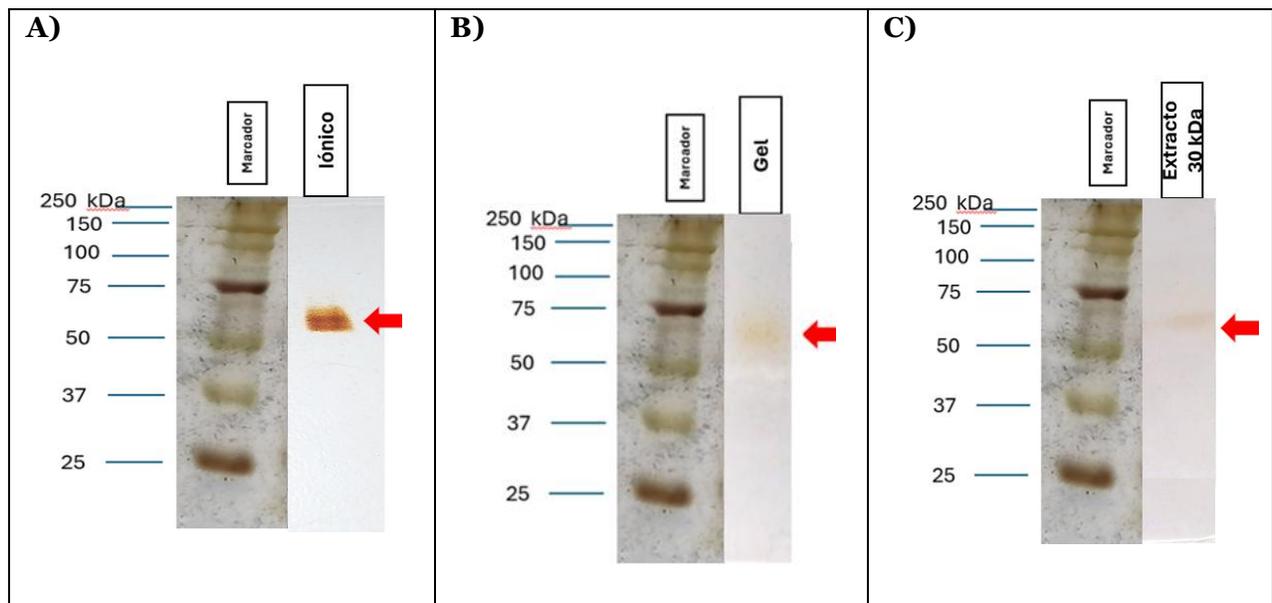


Figura 17. Zimogramas de la lacasa de *Agrocybe aff. pediades* de los diferentes extractos

Las bandas marcadas por las flechas indican la presencia de la lacasa en cada uno de los extractos, además, se puede observar en la figura 17A dos bandas (presencia de dos isoenzimas).

El zimograma se observaron dos isoenzimas (figura 17A), con un peso molecular de aproximadamente 66-67 kDa, sin embargo, por la cercanía de una a la otra no es posible determinar el peso de ambas, del extracto obtenido del FPLC acoplado a la columna de intercambio iónico. En comparación del extracto obtenido del FPLC acoplado con una columna por filtración en gel (figura 17B), donde se logra observar solo una banda (isoenzima) muy tenue, con un peso molecular de igual a 66-67 kDa. En el extracto obtenido por una membrana de porosidad de 30 kDa (figura 17C) se observó una banda (isoenzima) muy tenue con un peso molecular igual de 66-67 kDa aproximadamente.

Como se mencionó anteriormente, para confirmar las diferentes proteínas contenidas, se tiñeron geles de poliacrilamida con sales de plata (ya que permite detectar proteínas según su tamaño y movilidad, siendo altamente sensible para cantidades pequeñas). Se encontró la presencia de dos bandas en cada uno de los extractos, con peso molecular de 67.48 kDa y 62.04 kDa respectivamente confirmando la presencia de la lacasa en los extractos (señalados con flechas). En la figura 18C se pueden observar más bandas debido a que el extracto no ha pasado por un proceso de purificación por el FPLC.

A)	B)	C)
-----------	-----------	-----------

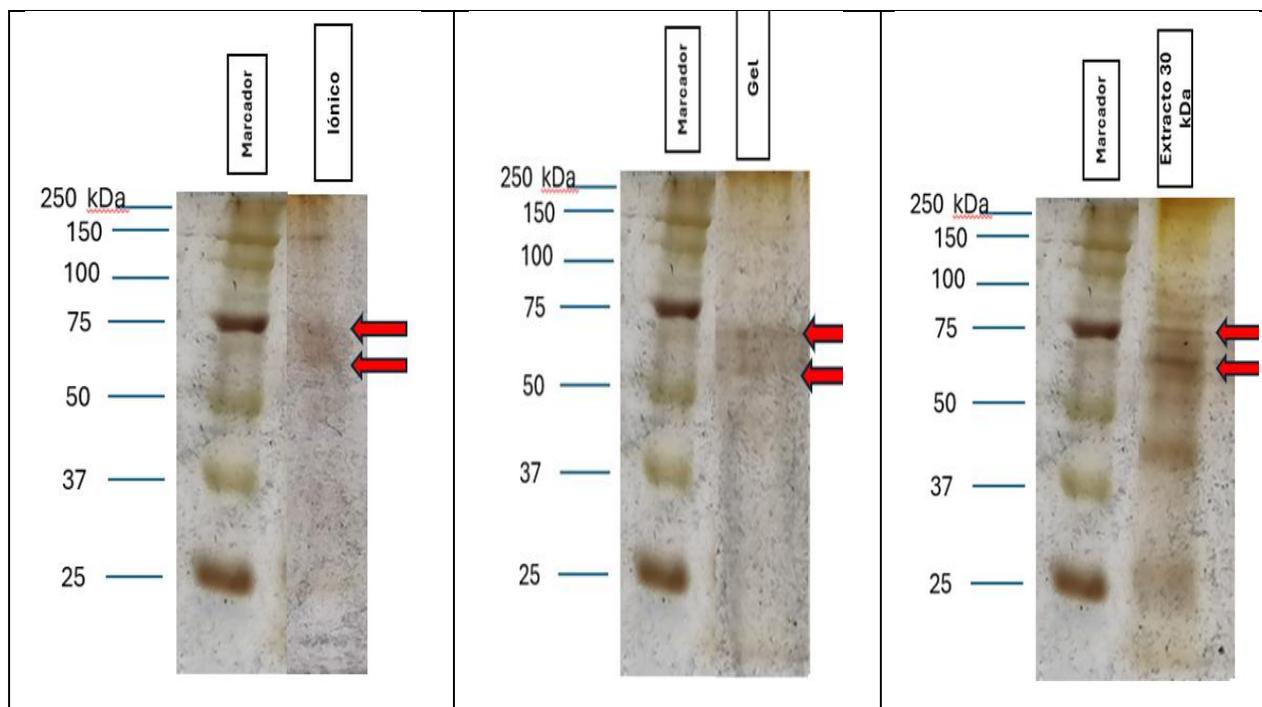


Figura 18. Tinción de gel de poliacrilamida en plata en cada etapa de purificación del ECEE

Se pueden observar dos bandas teñidas señaladas con las flechas en los extractos que llevaron un proceso de purificación parcial en el FPLC y más bandas en el extracto crudo (ECF) dando comparación de presencia de más proteínas.

1.3 Ensayo de actividad antiproliferativa de los extractos caracterizados en línea celular con cáncer de pulmón A549

Para el ensayo de actividad antiproliferativa se utilizaron los extractos mencionados en el apartado de la metodología. Con base en el esquema de placa (figura 12) se realizó la siembra de las células, tomando en consideración y siguiendo el apartado de la metodología 7.7 y observando el ejemplo de la siembra en la figura 19.

Siembra A549 y LL29	Adición de la lacasa
----------------------------	-----------------------------

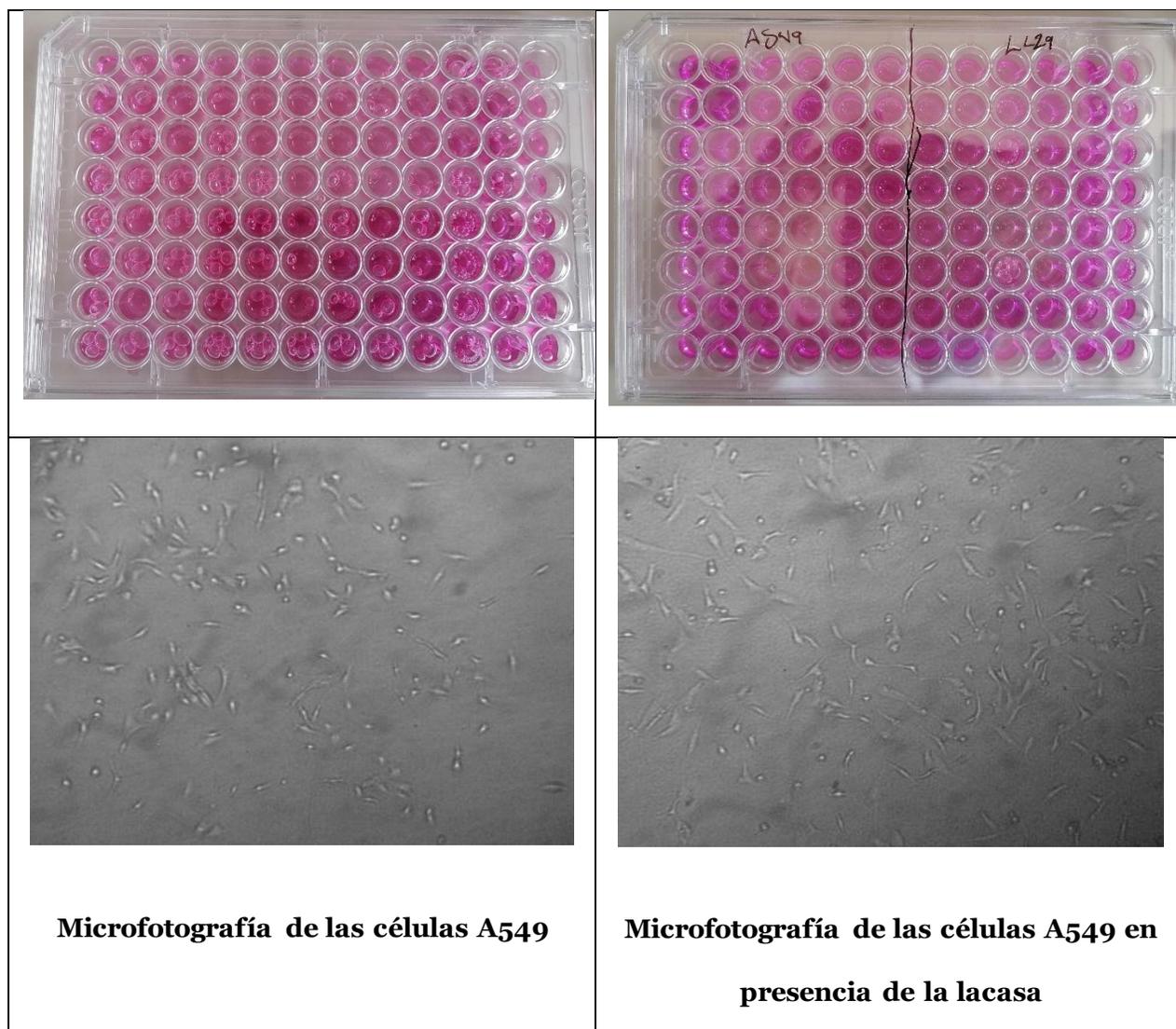


Figura 19 . Fotografía de la placa con las células sin y con los extractos

1.4 Viabilidad celular y conteo

Para la viabilidad celular se empleó el ensayo de MTT, que consiste en la medición de actividad metabólica de las células, mediante la adición de una solución de MTT (generalmente a una concentración de 0.5 mg/mL) en cada pocillo. Posteriormente se incubaron las células con el reactivo MTT durante 3-4 horas a 37 °C. Durante este tiempo, las células viables metabolizan el MTT, formando cristales de formazán púrpura. Después de la incubación, se añadió la solución de

solubilización para proceder a su incubación y poder medir la absorbancia de la placa a 570 nm (figura 20).

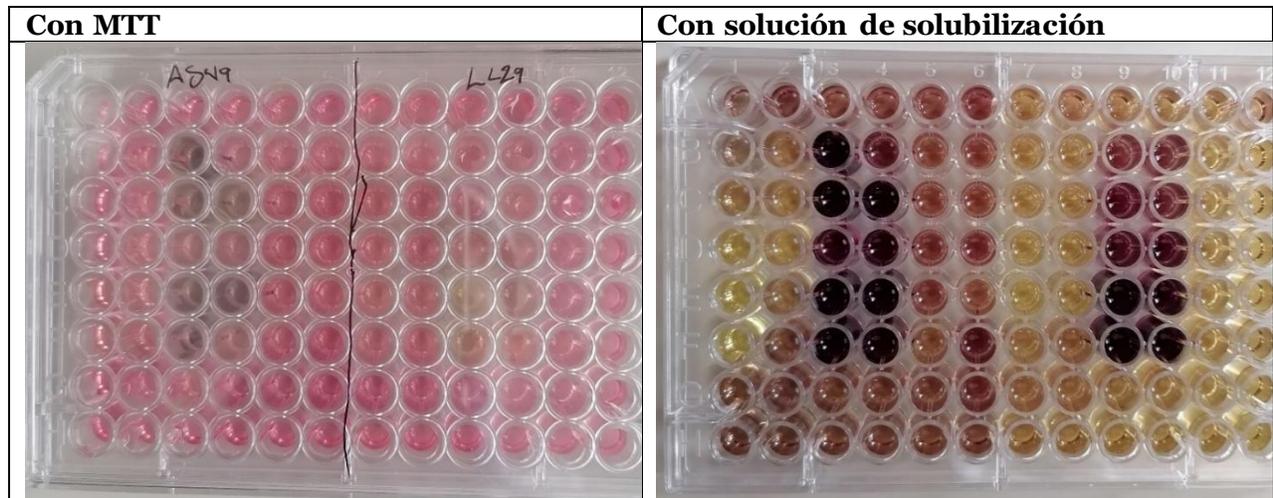


Figura 20. Placa en el ensayo MTT (viabilidad celular)

Para calcular la viabilidad celular se empleó la medición de absorbancia en un lector de placa Elisa, usando el programa SoftMax® Pro-6 Microplate Data Acquisition and Analysis Software, Molecular Devices con la programación de medición de absorbancia recomendada para la metodología del ensayo MTT (Anexo 2). Posteriormente se realizaron los cálculos de viabilidad por cada pocillo.

Con base en los resultados obtenidos de viabilidad celular, se realizó el cálculo del porcentaje de antiproliferación, para determinar la presencia de una respuesta inhibitoria de los diferentes extractos con las distintas unidades de actividad lacasa probadas (figura 21 y 22).

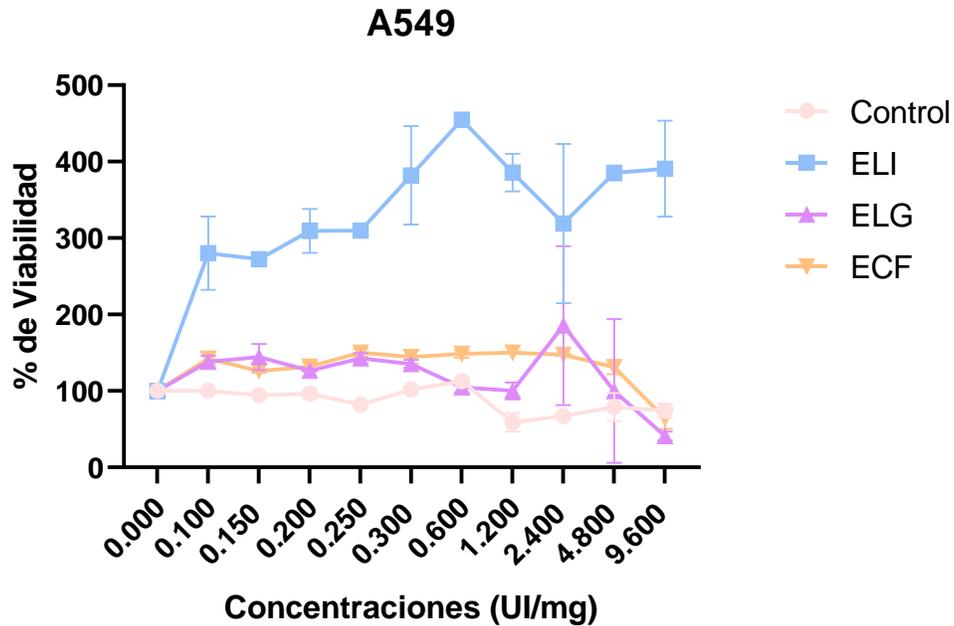


Figura. 21 Gráfica para determinar el IC₅₀ de cada uno de los extractos con las células A549

En la figura 21 indica cómo se comporta la línea de tendencia de cada extracto observando un comportamiento no lineal y que al calcular el IC₅₀ de cada uno no es posible ya que, se obtienen algunos valores ambiguos (ELI: ~0.3891, ELG: ~75343, ECF: ~226244), el único que se permite medir es el control con un valor de IC₅₀ de 8.997. Por lo que, se comprueba la diferencia significativa de cada extracto por separado como se muestra en la figura 22.

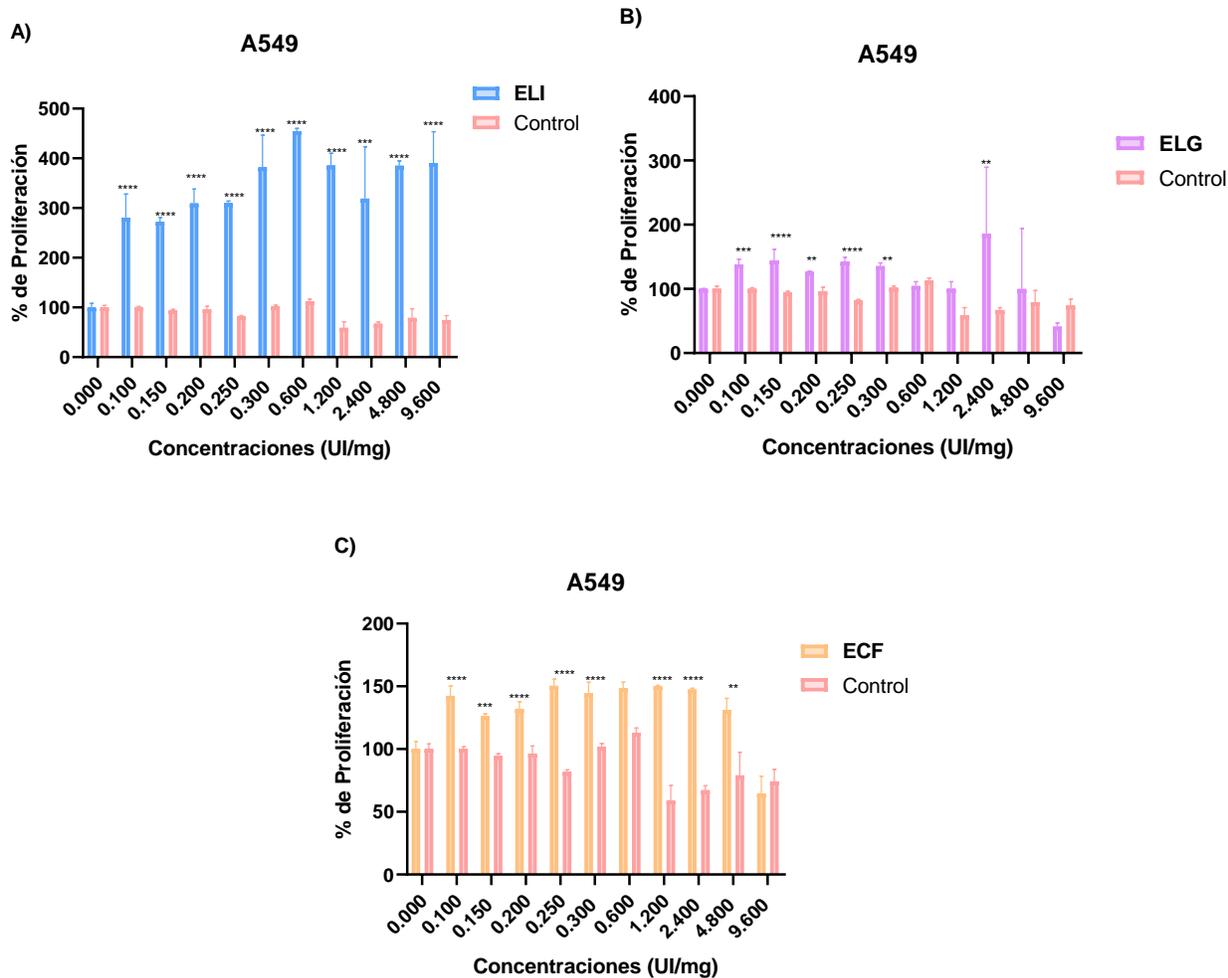


Figura 22. Pruebas presuntivas de la línea celular A549 en cada uno de los extractos tratados Gráfica A) Extracto **ELI** en presencia de las células cancerosas de pulmón a diferentes concentraciones iniciales de 0.10- 0.30 y posterior un aumento logarítmico de 0.60-9.60. Mediante un análisis de ANOVA con (post hoc de Bonferroni) se muestra diferencias significativas <math><0.0001</math> (****) y 0.0005 (**). Gráfica B) Extracto **ELG** en presencia de las células cancerosas de pulmón a diferentes concentraciones iniciales de 0.10- 0.30 y posterior un aumento logarítmico de 0.60-9.60. Mediante un análisis de ANOVA se muestra diferencias significativas <math><0.0001</math> (****), 0.0004 (***), 0.0031 (**), 0.0013 (**), y 0.0098 (**). Gráfica C) Extracto **ECF** en presencia de las células cancerosas de pulmón a diferentes concentraciones iniciales de 0.10- 0.30 y posterior un aumento logarítmico de 0.60-9.60. Mediante un análisis de ANOVA se muestra diferencias significativas <math><0.0001</math> (****), 0.0003 (***), y 0.0013 (**).

En la figura 22 (A) se muestra el efecto sobre las células A549 de la presencia de los diferentes extractos con actividad de lacasa (0.100-0.300 UI/mg). Se observó un efecto proliferativo de las células en presencia del extracto ELI, al mostrar un incremento del porcentaje de viabilidad de las

células A549, alcanzando casi el 400%, en comparación con los extractos ELG y ECF, que presentan un porcentaje de viabilidad menor al 200% con respecto al extracto ELI; pero mayor al 100% de proliferación. Con base en los resultados que se obtuvieron con las unidades de actividad lacasa de 0.100-0.300 UI/mg, decidió utilizarse extractos con mayor número de unidades de actividad (0.600-9.600 UI/mg) para complementar la prueba presuntiva, observándose proliferación con el extracto ELI, en comparación con los extractos ELG y ECF, en los que ya se logra observar un efecto antiproliferativo, a partir de 9.600 UI/mg de actividad lacasa (figura 22B y figura 22C). Esto sugiere que si se añadieran mayores unidades de actividad podría continuar la visualización del efecto antiproliferativo, lo que se probó con extractos de 20 UI/mg con solo dos réplicas (datos no mostrados). Mediante un análisis de ANOVA con (post hoc de Bonferroni) indica que existe una diferencia significativa al comparar el control con el extracto ELI de <0.0001 (****) y 0.0005 (***). El extracto ELG presenta diferencias significativas de <0.0001 (****), 0.0004 (***), 0.0031 (**), 0.0013 (**) y 0.0098 (**) y el extracto ECF presenta diferencias significativas de <0.0001 (****), 0.0003 (***) y 0.0013 (**).

Sin embargo, para comprobar que los extractos no presentaran un efecto citotóxico para las células se probaron también con las células LL29, en concentraciones de actividad lacasa de 0.100-0.300 UI/mg (figura 23 y 24).

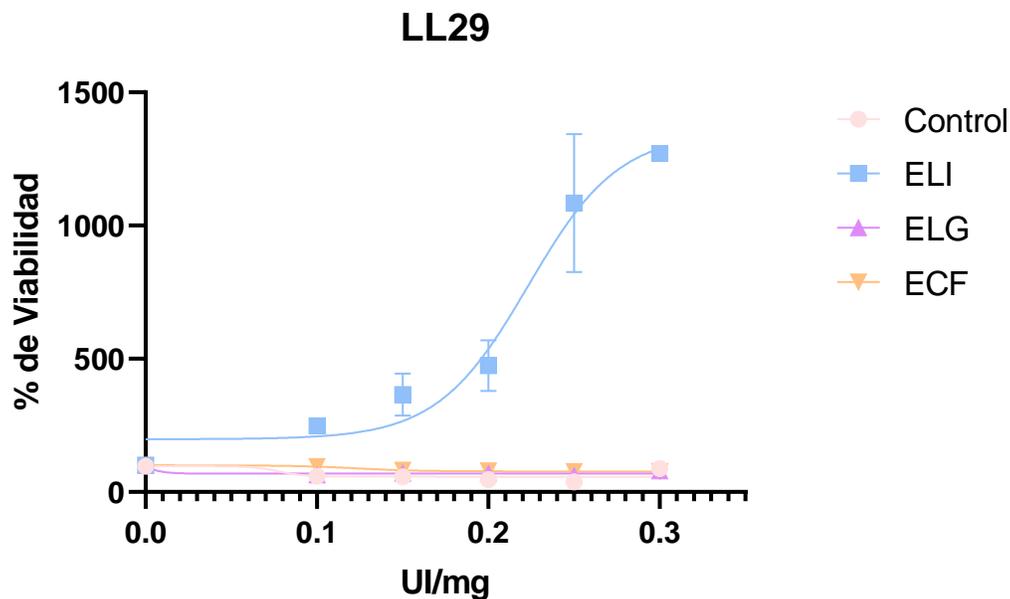
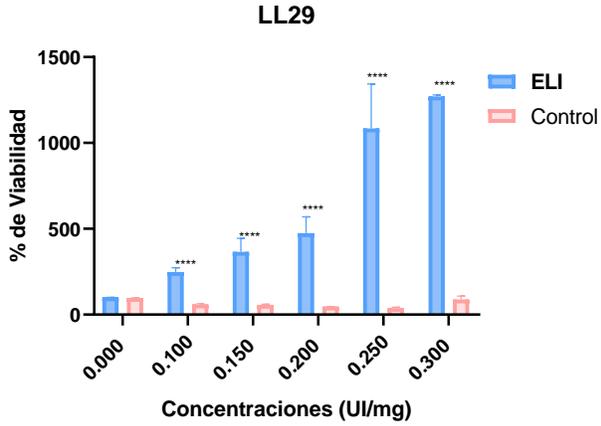


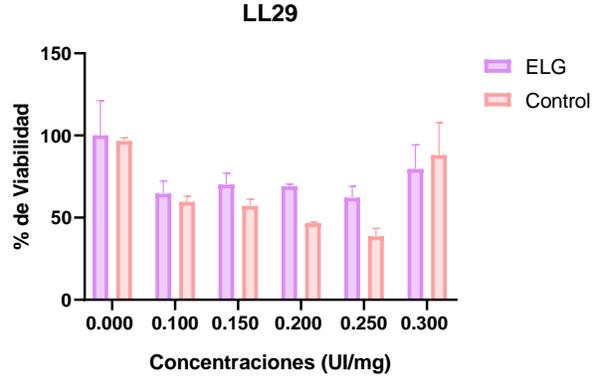
Figura. 23 Gráfica para determinar el IC50 de cada uno de los extractos con las células LL29

Se puede observar en la figura 23, cómo se comporta la línea de tendencia de cada extracto como en la figura 21 pero en este caso se observa un comportamiento lineal no esperado del extracto ELI permitiendo tener un valor de IC50 de 1.672, también para ECF se obtiene un valor de IC50 de 1.329, sin embargo para el extracto ELG y el control se obtienen valores ambiguos (ELG: ~0.9298, Control: ~1.197), de igual manera, se comprueba la diferencia significativa de cada extracto por separado como se muestra en la figura 24.

A)



B)



C)

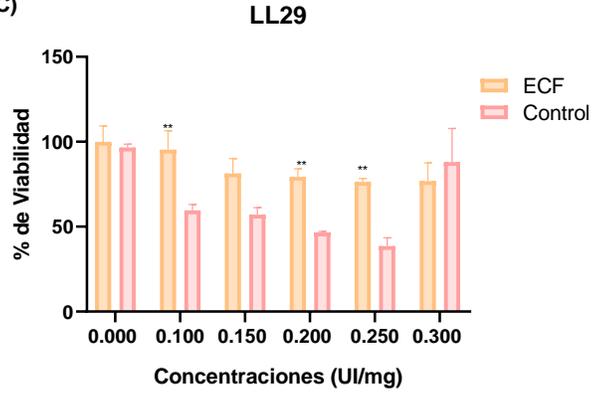


Figura 24. Prueba presuntiva de la línea celular LL29 en cada uno de los extractos

Gráfica A) Extracto **ELI** en presencia de las células de fibroblastos pulmonares a diferentes concentraciones de 0.10- 0.30. Mediante un análisis de ANOVA con (post hoc de Bonferroni) se muestra diferencias significativas de <0.0001 (****). Gráfica B) Extracto **ELG** en presencia de las células de fibroblastos pulmonares en concentraciones de 0.10- 0.30. Mediante un análisis de ANOVA se muestra que no existen diferencias significativas. Y en la gráfica C) Extracto **ECF** en presencia de las células de fibroblastos pulmonares en concentraciones de 0.10- 0.30. Mediante un análisis de ANOVA se muestra diferencias significativas 0.0033 (**), 0.0055 (**) y 0.0016 (**).

Al realizar las pruebas con las células LL29 se observa un efecto proliferativo corroborando la ausencia de un efecto citotóxico en presencia de los diferentes extractos (figura 24A). Del mismo modo, el extracto ELI presentó un efecto proliferativo en las células LL29 e incluso mayor que con las células A549, como se observaba en la figura 22A. En la figura 24B y figura 24C se corrobora la

ausencia de un efecto citotóxico hacia las células LL29. Los análisis estadísticos mediante ANOVA con (post hoc de Bonferroni) comprobaron que existe una diferencia significativa con el extracto ELI de <0.0001 (****) en todas las unidades de actividad lacasa probadas. En el caso del extracto ECF se muestra diferencia significativa 0.0033 (**), 0.0055 (**) y 0.0016 (**), en comparación con el extracto ELG que no muestra diferencia significativa.

Cabe mencionar que se realizó también un análisis de correlación de Pearson (anexo 4), pero al no tener los valores de manera lineal indica que no existe una correlación adecuada entre las concentraciones y el comportamiento de la enzima en presencia de las células, por ello es importante encontrar las concentraciones necesarias para llevar a cabo este análisis. Además, mediante microfotografías, se observaron los cambios morfológicos de las líneas celulares al estar expuestas a las unidades de actividad lacasa en un rango entre 0.100 - 0.300 UI/mg durante un periodo de exposición de 0 a 24 h. Los resultados por exposición de cada extracto, tanto en la línea celular A549 y LL29, se reportan en el anexo 5.

IV. DISCUSIÓN

IV. 1 Purificación de la lacasa producida por *Agrocybe aff. pediades*

La purificación de enzimas en hongos es un tema relevante en la biotecnología debido al potencial que presentan, para el caso de las lacasas tienen aplicaciones industriales, la biorremediación, tratamiento de aguas residuales, la biosíntesis de productos farmacéuticos, entre otros. El proceso de purificación de enzimas lacasas fúngicas presentan varios desafíos, principalmente relacionados con la heterogeneidad y la actividad proteica de la enzima, además, la expresión de lacasas en cultivos fúngicos pueden ser variables, y las enzimas son propensas a desnaturalización durante los procesos de extracción y purificación. Para obtener lacasas puras de hongos existen diferentes métodos que se han implementado para purificar las proteínas, desde la utilización de algunas sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Othman *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2014), acetona (Sondhi *et al.*, 2021) e incluso el uso de una técnica de partición acuosa de dos fases utilizando polietilenglicol y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ramírez *et al.*, 2003a), como también implementar la cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad (FPLC) con uso de diferentes columnas tanto de intercambio iónico, como de columnas por filtración en gel (Aza *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2011; Matuszewska, Karp, Jaszek, Janusz, Osińska-Jaroszuk, *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). Para purificar la enzima lacasa del organismo *Agrocybe aff. pediades* se inició implementando el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con una saturación al 40 y 80 %, sin embargo se presentó pérdida de actividad enzimática al intentar concentrar el extracto, ya que al ser una técnica un poco versátil, que se utiliza para concentrar, separar y purificar proteínas, es posible que se presenten interferencias que ocasionen pérdida de la enzima. Por ello, se implementaron métodos de separación por tamaño por medio de ultrafiltración (Khaire & Gogate, 2018), permitiendo lograr concentrar el extracto a un tamaño mayor de 30 kDa de porosidad y de una menor porosidad de 100 kDa, conservando la actividad enzimática para ser inyectado en el FPLC, con el cual se logró llevar a cabo una semipurificación de enzima lacasa. Sin embargo, se necesita implementar otra alternativa de purificación que permita obtener una mayor producción

de la lacasa con una actividad enzimática alta y que se pueda conservar durante un tiempo más prolongado. La purificación de la enzima lacasa producida por *Agrocybe aff. pediades* se llevó a cabo mediante un proceso de purificación por FPLC y una filtración en gel, lo que permitió observar el perfil de elución de las proteínas presentes en el EECE. En un cromatograma se pudo identificar que la mayor actividad enzimática aparecía antes del pico de absorbancia, lo que favoreció la obtención de mayor cantidad de enzima, al concentrar las fracciones seleccionadas. Sin embargo, no fue suficiente para purificar completamente la enzima. Con los resultados obtenidos se corrobora la información reportada por (González-González *et al.*, 2023) respecto a la presencia de dos isoenzimas en las condiciones del medio mineral. Cabe resaltar que falta caracterizar correctamente las isoenzimas encontradas ya que solo las condiciones de purificación permitieron caracterizarlas mediante su actividad enzimática, pero falta describir a fondo las características que presentan (Acharya *et al.*, 2017; Aza *et al.*, 2021; Blánquez Moya, 2015; Olajuyigbe y Fatokun, 2017; Othman *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2003). Esto porque muchos hongos producen varias isoenzimas de lacasas con diferentes propiedades catalíticas como fue nuestro caso que en el extracto denominado ELI había la presencia de dos isoenzimas algunas investigaciones como en las de Bertrand *et al.*, 2015 y Othman *et al.*, 2018 mencionan que múltiples isoformas de lacasas producidas por el mismo organismo implican que puedan tener mayor flexibilidad y/o adaptación a entornos en constante cambio, esto puede favorecer al comportamiento de proliferación en las células, sin embargo, es muy importante hacer un estudio más complejo de las isoenzimas, desde el contenido de carbohidratos al ser provenientes de una enzima glicoproteína, el pH de ambas, sus secuencias N-terminales, entre otros parámetros que nos van a permitir indagar más sobre el comportamiento de éstas (Dong & Zhang, 2004).

Otro punto importante es implementar un método para purificar completamente la lacasa y la conservación de las isoenzimas, ya que para los ensayos de actividad antiproliferativa se requiere tener una cantidad apropiada de cada isoforma completamente purificada (para estudiar su

comportamiento y estructura) y poder determinar el efecto antiproliferativo que presentan incluso si las isoenzimas puedan tener diferentes mecanismos de acción.

IV. 2 Actividad antiproliferativa de la lacasa producida por *Agrocybe aff. pediades*

La actividad antiproliferativa de enzimas fúngicas hace énfasis en su capacidad para inhibir el crecimiento y la proliferación de células, esta propiedad hace de mayor interés para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, las enzimas que han mostrado esta capacidad son las lacasas ya que al generar radicales libres o al alterar el equilibrio redox celular pueden inducir el daño oxidativo en las células, lo que pueden llevar a la inhibición de su proliferación algunas investigaciones como las de Charles Guest y Rashid, 2016; Matuszewska, Karp, Jaszek, Janusz, Osińska-Jaroszuk, et al., 2016; Wu et al., 2014 y Zhao et al., 2014 han reportado este comportamiento relacionado con la degradación inclusive de un derivado de los estrógenos (17 β -estradiol) concluyendo que son capaces de degradar eficazmente el 17 β -estradiol y asimismo, ejerce citotoxicidad en las células de cáncer dependientes de hormonas al disminuir la disponibilidad y evitar la unión del 17 β -estradiol con su receptor. Sin embargo, con los resultados obtenidos con la lacasa obtenida a partir de *Agrocybe aff. pediades* no podemos identificar esta relación ya que la lacasa no logró mostrar un efecto antiproliferativo adecuado frente a la línea celular A549, podemos tener un acercamiento a su actividad antiproliferativa con concentraciones de actividad de lacasa mayores a 9.60 UI/mg, que si tomamos a comparación con las concentraciones reportadas en la investigación de Sondhi *et al.*, (2021), quienes probaron en la misma línea celular pero con una lacasa bacteriana, ellos requirieron de menor cantidad de enzima para presentar un efecto antiproliferativo de la enzima. Esto da indicios de que para el uso de las lacasas fúngicas se requieren más unidades de actividad enzimática para esta línea celular, por ello, es importante implementar otra línea celular en la que previamente se hayan probado lacasas de organismos fúngicos, como los estudios que ya se han reportado (Charles Guest & Rashid, 2016; Matuszewska, Karp, Jaszek, Janusz, Osińska-Jaroszuk, et al., 2016; Wu et al., 2014; Zhao et al., 2014) que

trabajaron con más de una línea celular y que nos permitirá tener una comparación del efecto de esta lacasa obtenida a partir de *Agrocybe aff. pediades* con respecto a otras lacasas fúngicas que presentaron un efecto similar. Además de, estudiar más sobre el mecanismo de acción de la enzima lacasa para la degradación de uno de los derivados del estrógeno (17 β -estradiol) como se ha descrito anteriormente (Chauhan *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019; Chmelová *et al.*, 2024), ya que el aumento del 17 β -estradiol ha generado incremento en las tasas, tanto de incidencia como de mortalidad para el cáncer pulmonar (Liang y Shang, 2013; Locia Espinoza *et al.*, 2013; Maitra *et al.*, 2022; Rodríguez-Lara *et al.*, 2018).

Por lo que, al no poder verificar la relación con la degradación del 17 β -estradiol con los datos que obtenemos rechazamos la hipótesis de la afinidad de la lacasa de *Agrocybe aff. pediades* por el 17 β -estradiol será la adecuada para degradarlo e inhibir su proliferación en la línea celular A549, para poder aceptar la hipótesis requerimos encontrar las concentraciones adecuadas para observar la actividad antiproliferativa de la lacasa e inclusive manejar más controles como un fármaco (tamoxifeno) ya que presenta un mecanismo similar a la lacasa como se ha reportado en (Conroy *et al.*, 2007; Ferrando-Climent *et al.*, 2015).

Por otra parte, descubrimos otro comportamiento sobre un posible efecto proliferativo que se presentó a unidades de actividad enzimática menores a 300 UI/mg, este fenómeno podría deberse a que la lacasa está promoviendo la descomposición de compuestos tóxicos o la liberación de nutrientes esenciales que favorecen el crecimiento de las células, también se implica la capacidad de la enzima para promover el crecimiento y la división celular esto porque se facilitan procesos metabólicos esenciales para el crecimiento celular, y que se podrían implementar una investigación con el objetivo de determinar la capacidad regenerativa de esta enzima, mediante modificaciones de los factores de crecimiento o con la regulación de señales celulares que promuevan la división y la supervivencia celular, que pudieron verse implicados al lograr estar presentes las dos isoenzimas (Aza *et al.*, 2021). Es muy importante como ya se comentó en los trabajos de Bertrand *et al.*, 2015 y Othman *et al.*, 2018 el investigar más sobre las características que presentan las isoenzimas del

extracto ELI que permitieron este comportamiento proliferativo aún en las células LL29, lo que igual es importante es poder comprobar la ausencia como tal de un efecto citotóxico ya que las unidades enzimáticas utilizadas fueron menores a 0.30 UI/mg y el comienzo de un posible efecto antiproliferativo se presenta a partir de 9.60 UI/mg, es importante mencionar que lo ideal es con las concentraciones adecuadas donde se observe ya un comportamiento antiproliferativo para descartar un efecto citotóxico. Ya que en los resultados se observa un incremento de viabilidad donde los valores son de 400% a 500% relacionados con la actividad de la lacasa, esto puede indicar que la actividad catalítica de la lacasa es mucho mayor de lo esperado en condiciones normales. Es decir, por cada cantidad de sustancia activa presente, la lacasa está llevando a cabo una cantidad de reacciones oxidativas mucho mayor que lo que se preveía inicialmente en comparación con otras fuentes de lacasa. Este tipo de exceso de actividad podría reflejar que la enzima tiene una eficiencia mucho mayor de lo anticipado, que podría deberse a una mutación genética en el hongo que aumenta su capacidad para producir lacasa, o a un condicionamiento ambiental (como nutrientes, temperatura o pH) que favorece su actividad. Ahora, si estos valores se refieren a la dosis de la sustancia activa, podría estar relacionado con un incremento en la cantidad de lacasa activa presente en la muestra. Es posible que el hongo esté generando una concentración muy alta de lacasa debido a condiciones de cultivo muy favorables, lo que lleva a una producción en exceso de la enzima. Sin embargo, los valores de 400% a 500% aún deben ser interpretados con cautela, si los valores de viabilidad están relacionados con el número de células o la vitalidad biológica del hongo en cuestión, esto podría indicar que la sustancia activa está favoreciendo un crecimiento excesivo o una mayor viabilidad de las células del hongo o de un cultivo celular. Es decir, la sustancia podría estar aumentando la supervivencia o la multiplicación de los microorganismos productores de lacasa, lo que podría ser útil en procesos de producción industrial de esta enzima.

Además, es necesario tomar en consideración posibles cambios en la superficie de la lacasa para mejorar su estabilidad y, potencialmente, tanto su capacidad para inhibir la proliferación como para promoverla, sin afectar negativamente su actividad enzimática. Esto es algo que ha sido

implementado en algunos trabajos (Chauhan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2024; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2015), abriendo la posibilidad de una nueva área de aplicación regenerativa con mayor potencial. La presencia de la lacasa con actividad proliferativa y antiproliferativa puede ser visto como un doble filo, dependiendo del contexto y de las condiciones del entorno pueden actuar de manera diferente desde tratamiento de enfermedades para desarrollar terapias anticancerígenas o inmunosupresoras como se planteaba al comienzo del proyecto o con un tratamiento regenerativo como se encontraron los resultados, por supuesto nos quedan muchas más dudas que se plantean como posibles perspectivas.

V. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos a partir de la enzima lacasa semipurificada en este trabajo se puede concluir que la lacasa comienza a mostrar un comportamiento antiproliferativo contra la línea celular A549 a partir de concentraciones mayores a 9.60 UI/mg, pero que aun así no es posible comprobar con certeza ya que se necesitan más pruebas. Sin embargo, en la aplicación de concentraciones menores a 0.30 UI/mg se observó un comportamiento contrario cuando la lacasa se purificó por medio de intercambio iónico (ELI), en comparación de los otros extractos probados (ELG y ECF). Esto por la presencia de las dos isoenzimas en el extracto que pudo permitir esta característica, aunque para poder confirmar esto se requiere de una caracterización más profunda de las isoformas de la lacasa. Ya que los valores entre 400% y 500% en la producción o actividad de lacasa sugieren que el hongo está produciendo una cantidad de esta enzima mucho mayor de lo anticipado, lo cual podría deberse a una sobreactividad de la enzima en condiciones experimentales favorables, a un efecto de concentración de la sustancia, o incluso a un fenómeno de sobreproducción no caracterizado previamente. Sin embargo, para interpretar estos valores correctamente, es fundamental verificar los procedimientos experimentales y asegurar que no haya factores que estén influyendo en las mediciones de manera no esperada.

Por otro lado, no se presenta un efecto citotóxico en células normales (LL29) pero solo en los extractos (ELG y ECF) ya que al analizar el extracto ELI si presenta una tendencia de citotoxicidad, por eso, es muy importante realizar los análisis en concentraciones más altas, cabe mencionar que este efecto dual refleja la complejidad de las enzimas fúngica, que pueden ser utilizadas en aplicaciones de investigación biomédica, permitiendo tener la oportunidad de comprobar un efecto regenerativo en lugar de antiproliferativo.

VI. PERSPECTIVAS

- Emplear un método de purificación que favorezca la obtención de la lacasa completamente pura y que presente una mayor cantidad de extractos con actividad enzimática.
- Realizar pruebas con dosis mayores a 20 UI/mg, para confirmar el efecto antiproliferativo de la lacasa y probar las mismas dosis en las células LL29 para verificar la ausencia de un efecto citotóxico en presencia de concentraciones altas.
- Llevar un control de otra línea celular ya probada en la lacasa fúngicas (HepG2 y MCF7), para comparar ambos resultados expuestos, para favorecer la característica antiproliferativa.
- Realizar una prueba para confirmar la degradación del 17β -estradiol por la lacasa.
- Tratar de obtener la secuencia de la lacasa para poder producirla de manera sintética y que se pueda obtener una mayor cantidad con una actividad enzimática alta.

VII. REFERENCIAS

- Acharya, K., Sikder, R., & Dutta, A. K. (2017). *Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extracto de metanol de un hongo comestible Agrocybe pediades*. 8.
- Anzules, Í. del C. P., & Castro, D. W. M. (2022). Contaminación ambiental. *RECIMUNDO*, 6(2), Article 2. [https://doi.org/10.26820/recimundo/6.\(2\).abr.2022.93-103](https://doi.org/10.26820/recimundo/6.(2).abr.2022.93-103)
- Arpicco, S., Dosio, F., Stella, B., & Cattel, L. (2011). Anticancer Prodrugs: An Overview of Major Strategies and Recent Developments. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(18), 2346–2381.
- AWG. (2019). *Grupo de Trabajo sobre el “Antropoceno” | Subcomisión de Estratigrafía Cuaternaria*. <http://quaternary.stratigraphy.org/working-groups/anthropocene/>
- Aza, P., Molpeceres, G., Ruiz-Dueñas, F. J., & Camarero, S. (2021). Heterologous Expression, Engineering and Characterization of a Novel Laccase of *Agrocybe pediades* with Promising Properties as Biocatalyst. *Journal of Fungi*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jof7050359>
- Barcellos-Hoff, M. H., Lyden, D., & Wang, T. C. (2013). The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 13(7), 511–518. <https://doi.org/10.1038/nrc3536>
- Barrales-Cureño, H. J., & Montoya, R. de la R. (2014). Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol. *Bioteología Vegetal*, 14(1), Article 1. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/23>
- Benedí, J., & Gómez Del Río, M. Á. (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*, 20(2), 60–65.

- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, M. R. (2015). Caracterización bioquímica y molecular de isoformas de lacasa producidas por el hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor* en condiciones de cultivo sumergido. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.009>
- Blánquez Moya, A. (2015). *Caracterización y función biológica de la lacasa producida por “Streptomyces ipomea” CECT 3341: Aprovechamiento de su potencial oxidativo para la degradación de contaminantes ambientales.* <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/22644>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Calderón-Garcidueñas, L., Medina-Cortina, J. H., & Mora-Tiscareño, A. (2012). Impacto de la contaminación ambiental en el niño clínicamente sano. *Acta Pediátrica de México*, 33(3), 142–147.
- Cano-Estrada, A., & Romero-Bautista, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 75–80. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000100011>
- Charles Guest, T., & Rashid, S. (2016). Anticancer Laccases: A Review. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2324-9110.1000153>
- Chauhan, P. S., Kumarasamy, M., Sosnik, A., & Danino, D. (2019). Enhanced Thermostability and Anticancer Activity in Breast Cancer Cells of Laccase

- Immobilized on Pluronic-Stabilized Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(43), 39436–39448. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11877>
- Chen, M., Waigi, M. G., Li, S., Sun, K., & Si, Y. (2019). Fungal laccase-mediated humification of estrogens in aquatic ecosystems. *Water Research*, 166, 115040. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115040>
- Chmelová, D., Ondrejovič, M., & Miertuš, S. (2024). Laccases as Effective Tools in the Removal of Pharmaceutical Products from Aquatic Systems. *Life*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/life14020230>
- Clark, J. W., & Longo, D. L. (2019). *Capítulo 102e: Biología de la célula cancerosa*. 29.
- Clofent, D., Culebras, M., Loor, K., & Cruz, M. J. (2021). Contaminación ambiental y cáncer de pulmón: El poder carcinogénico del aire que respiramos. *Archivos de Bronconeumología*, 57(5), 317–318. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.05.031>
- Coe, N. M., Hess, M., Yeung, H. W., Dicken, P., & Henderson, J. (2004). “Globalizing” Regional Development: A Global Production Networks Perspective. *Transactions of the Institute of British Geographers*, 29(4), 468–484.
- Conroy, O., Sáez, A. E., Quanrud, D., Ela, W., & Arnold, R. G. (2007). Changes in estrogen/anti-estrogen activities in ponded secondary effluent. *Science of The Total Environment*, 382(2), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.033>
- Cuéllar Luna, L., Maldonado Cantillo, G., Suárez Tamayo, S., del Puerto Rodríguez, A., Romero Placeres, M., Cuéllar Luna, L., Maldonado Cantillo, G., Suárez Tamayo, S., del Puerto Rodríguez, A., & Romero Placeres, M. (2021). Estratificación del riesgo de muerte por enfermedades no transmisibles asociado a la contaminación ambiental en Cuba. *MEDISAN*, 25(6), 1394–1410.

- De La Rosa-Pérez, D. A., Teutli-León, M. M. M., & Ramírez-Islas, M. E. (2007). Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(3), 129–138.
- Dong, J. L., & Zhang, Y. Z. (2004). Purification and Characterization of Two Laccase Isoenzymes from a Ligninolytic Fungus *Trametes gallica*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 34(2), 179–194. <https://doi.org/10.1081/PB-120030876>
- Dosio, F., Stella, B., Cerioni, S., Gastaldi, D., & Arpicco, S. (2014). Advances in anticancer antibody-drug conjugates and immunotoxins. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 9(1), 35–65. <https://doi.org/10.2174/15748928113089990045>
- Ellis, E. C. (2015). Ecology in an anthropogenic biosphere. *Ecological Monographs*, 85(3), 287–331. <https://doi.org/10.1890/14-2274.1>
- Encinas Malagón, M. D. (2011). *Medio Ambiente y Contaminación. Principios básicos*. La autora. <https://doi.org/10/16784>
- Ferrando-Climent, L., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Vicent, T., Sarrà, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2015). Tratamiento biológico no convencional a base de *Trametes versicolor* para la eliminación de fármacos anticancerígenos recalcitrantes en aguas residuales hospitalarias. *Chemosphere*, 136, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.051>
- Folke, C., Biggs, R., Norström, A., Reyers, B., & Rockström, J. (2016). Social-ecological resilience and biosphere-based sustainability science. *Ecology and Society*, 21(3). <https://doi.org/10.5751/ES-08748-210341>

- Fortes, R. C., & Novaes, M. ^a R. C. G. (2011). The effects of *Agaricus sylvaticus* fungi dietary supplementation on the metabolism and blood pressure of patients with colorectal cancer during post surgical phase. *Nutrición Hospitalaria*, 26(1), 176–186.
- Gaviria G, C. F., Benavides C, P. C., & Tangarife, C. A. (2011). Contaminación por material particulado (PM_{2,5} y PM₁₀) y consultas por enfermedades respiratorias en Medellín (2008-2009). *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 29(3), 241–250.
- González-González, P., Gómez-Manzo, S., Tomasini, A., Martínez y Pérez, J. L., García Nieto, E., Anaya-Hernández, A., Ortiz Ortiz, E., Castillo Rodríguez, R. A., Marcial-Quino, J., & Montiel-González, A. M. (2023). Laccase Production from *Agrocybe pediades*: Purification and Functional Characterization of a Consistent Laccase Isoenzyme in Liquid Culture. *Microorganisms*, 11(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030568>
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., Petrella, F., Spaggiari, L., & Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Guest, T., & Rashid, S. (2016). Anticancer Laccases: A Review. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 05. <https://doi.org/10.4172/2324-9110.1000153>
- Guzmán, N. A., & Restrepo, F. de la H. (2008). Contaminación Del Aire Domiciliario Y Enfermedades Respiratorias (infección Respiratoria Aguda Baja, Epoc, Cáncer De Pulmón Y Asma): Evidencias De Asociación. *Revista de la Facultad de Medicina*, 56(1), 54–64.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Hausman, D. M. (2019). What Is Cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, 62(4), 778–784. <https://doi.org/10.1353/pbm.2019.0046>
- Hernández-Garcés, A., Reynosa-Valladares, M., Hernández- Bilbao, F., Canciano-Fernández, J., Hernández-Garcés, A., Reynosa-Valladares, M., Hernández- Bilbao, F., & Canciano- Fernández, J. (2019). Emisión de contaminantes atmosféricos procedentes de centrales azucareros santiagueros. *Tecnología Química*, 39(2), 390–402.
- Hsu, L.-H., Chu, N.-M., & Kao, S.-H. (2017). Estrogen, Estrogen Receptor and Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1713. <https://doi.org/10.3390/ijms18081713>
- Hu, D. D., Zhang, R. Y., Zhang, G. Q., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2011). A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common *Agrocybe cylindracea*. *Phytomedicine*, 18(5), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.07.004>
- Jiménez Serna, A. M. (2016). *Aplicación de etapas enzimáticas (lacasaxilanas) para la obtención de pulpa química de bagazo de caña*. <https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/2770>
- Jørgensen, P. S., Folke, C., & Carroll, S. P. (2019). Evolution in the Anthropocene: Informing Governance and Policy. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 50(1), 527–546. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024621>

- Khaire, R. A., & Gogate, P. R. (2018). Intensified recovery of lactose from whey using thermal, ultrasonic and thermosonication pretreatments. *Journal of Food Engineering*, 237, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.027>
- Küpeli Akkol, E., Genç, Y., Karpuz, B., Sobarzo-Sánchez, E., & Capasso, R. (2020). Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. *Cancers*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/cancers12071959>
- Laza Loaces, D., Rodríguez Luis, I., & Sardiña Cabrera, G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(3), 0–0.
- Levin, L. N., & Forchiassin, F. (2006). *Aplicaciones biotecnológicas de los hongos lignocelulolíticos*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/30556>
- Li, H., Wilhelm, M., Baumbach, C. M., Hacker, M. C., Szardenings, M., Rischka, K., Koenig, A., Schulz-Kornas, E., Fuchs, F., Simon, J. C., Lethaus, B., & Savković, V. (2024). Laccase-Treated Polystyrene Surfaces with Caffeic Acid, Dopamine, and L-3,4-Dihydroxyphenylalanine Substrates Facilitate the Proliferation of Melanocytes and Embryonal Carcinoma Cells NTERA-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms25115927>
- Liang, J., & Shang, Y. (2013). Estrogen and cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, 225–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>
- Liu, J., Mooney, H., Hull, V., Davis, S. J., Gaskell, J., Hertel, T., Lubchenco, J., Seto, K. C., Gleick, P., Kremen, C., & Li, S. (2015). Sustainability. Systems integration for global sustainability. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6225), 1258832. <https://doi.org/10.1126/science.1258832>

- Locia Espinoza, J., Hernández Aguilar, M. E., Aranda Abreu, G. E., Rojas Durán, F., Manzo Denes, J., Coria Ávila, G. A., Yerena Aguilar, C. E., & Soto Cid, A. H. (2013). El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *eNeurobiología*, 4(8), 1. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7718057>
- Maitra, R., Malik, P., & Mukherjee, T. K. (2022). Targeting Estrogens and Various Estrogen-Related Receptors against Non-Small Cell Lung Cancers: A Perspective. *Cancers*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/cancers14010080>
- Matuszewska, A., Karp, M., Jaszek, M., Janusz, G., Osińska-Jaroszuk, M., Sulej, J., Stefaniuk, D., Tomczak, W., & Giannopoulos, K. (2016). Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncology Letters*, 11(3), 2009–2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4220>
- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., Simental-Martínez, J., & Rito-Palomares, M. (2015). Aldehyde PEGylation of laccase from *Trametes versicolor* in route to increase its stability: Effect on enzymatic activity. *Journal of Molecular Recognition*, 28(3), 173–179. <https://doi.org/10.1002/jmr.2405>
- Mehra, R., Muschiol, J., Meyer, A. S., & Kepp, K. P. (2018). A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35633-8>
- Miguel-Pérez, G., Maya, G., Flores-Márquez, A. R., Amador-Muñoz, O., Villalobos-Pietrini, R., Eguía-Aguilar, P., Pérezpeña-Díazconti, M., & Arenas-Huertero, F. (2013). Efectos de la contaminación del aire en células humanas de pulmón. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 107–115.

- Miguel-Soca, P. E., Herrera, A., León, D., Márquez, H., & Rodríguez, H. (2007). *El cáncer una enfermedad genética*. 11.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Motta, F., Gershwin, M. E., & Selmi, C. (2021). Mushrooms and immunity. *Journal of Autoimmunity*, 117, 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>
- Musial, C., Zaucha, R., Kuban-Jankowska, A., Konieczna, L., Belka, M., Marino Gammazza, A., Baczek, T., Cappello, F., Wozniak, M., & Gorska-Ponikowska, M. (2021). Plausible Role of Estrogens in Pathogenesis, Progression and Therapy of Lung Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020648>
- Ng, T. B., & Wong, J. H. (2013). Fungal proteins with antiproliferative and anticancer activities. *Protein and Peptide Letters*, 20(4), 433–438. <https://doi.org/10.2174/092986613805290363>
- Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ijms22168661>
- Olajuyigbe, F. M., & Fatokun, C. O. (2017). Caracterización bioquímica de una lacasa extremadamente estable y versátil en pH de *Sporothrix carnis* CPF-05. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.037>

- Ortega Ávila, R. (2018). *Aislamiento, identificación, crecimiento in vitro y conservación de basidiomicetos saprótrofos de un bosque de Juniperus del estado de Tlaxcala*. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Elshafei, A. M., & Hassan, M. M. (2018). Purificación y caracterización bioquímica de dos isoformas de lacasa aisladas de *Agaricus bisporus* CU13 y su potencia en la decoloración de tintes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.043>
- Ou, J. Y., Kirchhoff, A. C., & Hanson, H. A. (2020). Air Pollution across the Cancer Continuum: Extending Our Understanding of the Relationship between Environmental Exposures and Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 29(10), 1876–1879. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1588>
- Peña-López, R. de la, & Remolina-Bonilla, Y. A. (2016). Cáncer. *Gaceta Médica de México*, 152(S1), 63–66.
- Pritchett, N., Spangler, E. C., Gray, G. M., Livinski, A. A., Sampson, J. N., Dawsey, S. M., & Jones, R. R. (2022). Exposure to Outdoor Particulate Matter Air Pollution and Risk of Gastrointestinal Cancers in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiologic Evidence. *Environmental Health Perspectives*, 130(3), 036001. <https://doi.org/10.1289/EHP9620>
- Ramírez, N. E., Vargas, M. C., Ariza, J. C., & Martínez, C. (2003). Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, V(2), 64–72.

- Ravelo Rodríguez, R., López Hernández, M., Gutiérrez García, R., & Valladares Parrilla, F. J. (2012). Papel de los neumocitos II en un modelo experimental de lesión pulmonar aguda. *Majorensis: Revista Electrónica de Ciencia y Tecnología*, 8, 21–31. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4731967>
- Rodríguez-Lara, V., Báez-Saldaña, R., Peña-Mirabal, E., Vázquez-Manríquez, M. E., González-Sánchez, I., Antonio, M., Esparza-Silva, A. L., & Fortoul, T. I. (2015). *Estrógenos y su influencia en el cáncer pulmonar*. 8.
- Rodríguez-Lara, V., Hernández-Martínez, J.-M., & Arrieta, O. (2018). Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications. *Journal of Thoracic Disease*, 10(1), 482–497. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.12.61>
- Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>
- Santos, da S. S., Araújo, C. L., & Pascholati, G. L. F. (2021). Diversity of saprotrophic filamentous fungi on *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Brazilian pine). *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1489–1501. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00531-1>
- Sondhi, S., Kaur, R., & Madan, J. (2021). Purification and characterization of a novel white highly thermo stable laccase from a novel *Bacillus* sp. MSK-01 having potential to be used as anticancer agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.082>
- Steffen, W., Rockström, J., Richardson, K., Lenton, T. M., Folke, C., Liverman, D., Summerhayes, C. P., Barnosky, A. D., Cornell, S. E., Crucifix, M., Donges, J. F.,

- Fetzer, I., Lade, S. J., Scheffer, M., Winkelmann, R., & Schellnhuber, H. J. (2018). Trajectories of the Earth System in the Anthropocene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(33), 8252–8259. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810141115>
- Télez-Télez, M., Sánchez, C., Díaz, R., & Díaz-Godínez, G. (2012). Zymogram patterns of extracellular laccases of *Pleurotus* species grown on non-inducer agar medium. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(3), 383–388. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1665-27382012000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Tenías Burillo, J. M., & Ballester, F. (2002). Evidencias sobre la relación entre la contaminación atmosférica y las enfermedades del sistema circulatorio. *Gaceta Sanitaria*, 16, 12–28.
- van Rhijn, N., & Bromley, M. (2021). The Consequences of Our Changing Environment on Life Threatening and Debilitating Fungal Diseases in Humans. *Journal of Fungi*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jof7050367>
- Vega, J. Z., C, C. P., Angulo, A., Torres, O., & Santafé, G. (2007). Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia Et Technica*, XIII(33), 329–332.
- Wang, J.-J., Lei, K.-F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *European Review*. <https://www.europeanreview.org/article/15270>
- World. (2022). *Cáncer*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

- Wu, X., Huang, C., Chen, Q., Wang, H., & Zhang, J. (2014). A novel laccase with inhibitory activity towards HIV-I reverse transcriptase and antiproliferative effects on tumor cells from the fermentation broth of mushroom *Pleurotus cornucopiae*: A laccase from *Pleurotus cornucopiae*. *Biomedical Chromatography*, 28(4), 548–553. <https://doi.org/10.1002/bmc.3068>
- Zhao, S., Rong, C.-B., Kong, C., Liu, Y., Xu, F., Miao, Q.-J., Wang, S.-X., Wang, H.-X., & Zhang, G.-Q. (2014). A Novel Laccase with Potent Antiproliferative and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Mycelia of Mushroom *Coprinus comatus*. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/417461>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios

Medio mineral mínimo en glucosa

- 5 g/L glucosa
- 1 g/L Extracto de levadura
- 2 g/L $(\text{KH}_2\text{PO}_4)^2$
- 0.5 g/L KCl
- 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Medio celular para 50 mL

- 44 mL de Medio DMEM (con alto contenido de glucosa (4.5 g/L) con L-glutamina filtrada estéril (Capricorn Scientific)
- 1 mL Antibiótico
- 5 mL suero fetal bovino

Anexo 2. Curva patrón de albumina

	0 µg	1.5 µg	3 µg	5.5 µg	6 µg	8.5 µg	10 µg
Albumina (µL)	0	15	30	55	60	85	100
Agua (mL)	10	9.85	9.70	4.95	9.40	9.15	9.00



Anexo 3. PROTOCOLO MTT

1. Preparar solución stock de 5 mg/mL de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) en PBS.
Solución de trabajo 0.5 mg/mL (10 uL por cada 100 uL de medio)
2. Preparar solución de solubilización: 10% SDS en 0.01 M HCl
 - a. Considerar densidad de 1.2 g/mL
 - b. HCl 37% = 37g por cada 100 mL de agua
 - c. HCl PM = 36.46 g/mol/L
 - d. Molaridad 37% HCl = $0.36 \text{ g/mL} \times 1.2 \text{ g/mL} = 0.432 \text{ g/mL} = 432 \text{ g/L}$
 - e. $1 \text{ M} = 36.46 \text{ g/mol/L}$, $432 \text{ g/L} = 11.848 \text{ M}$
 - f. Para 100 mL de solución de solubilización se agregan 10 g de SDS y 0.084 mL (84 μL) de HCL en Agua milliQ

2. Procedimiento:

Cell Proliferation Kit II (XTT) flow chart

Step	Procedure	Vol./well	Time	Temp. (°C)
	Perform tissue culture using 96 well microtiter plates (tissue culture grade, flat-bottom)	100 μl	24–96 h	37°C
1	Add MTT labeling reagent and incubate in a humidified atmosphere	10 μl	4 h	37°C
2	Add solubilization solution and incubate in a humidified atmosphere	100 μl	overnight	37°C
3	Evaluate microtiter plate with the use of an ELISA reader at 550–600 nm with a reference wavelength of > 650 nm	–	–	–

Anexo 4 Análisis de correlación de Pearson

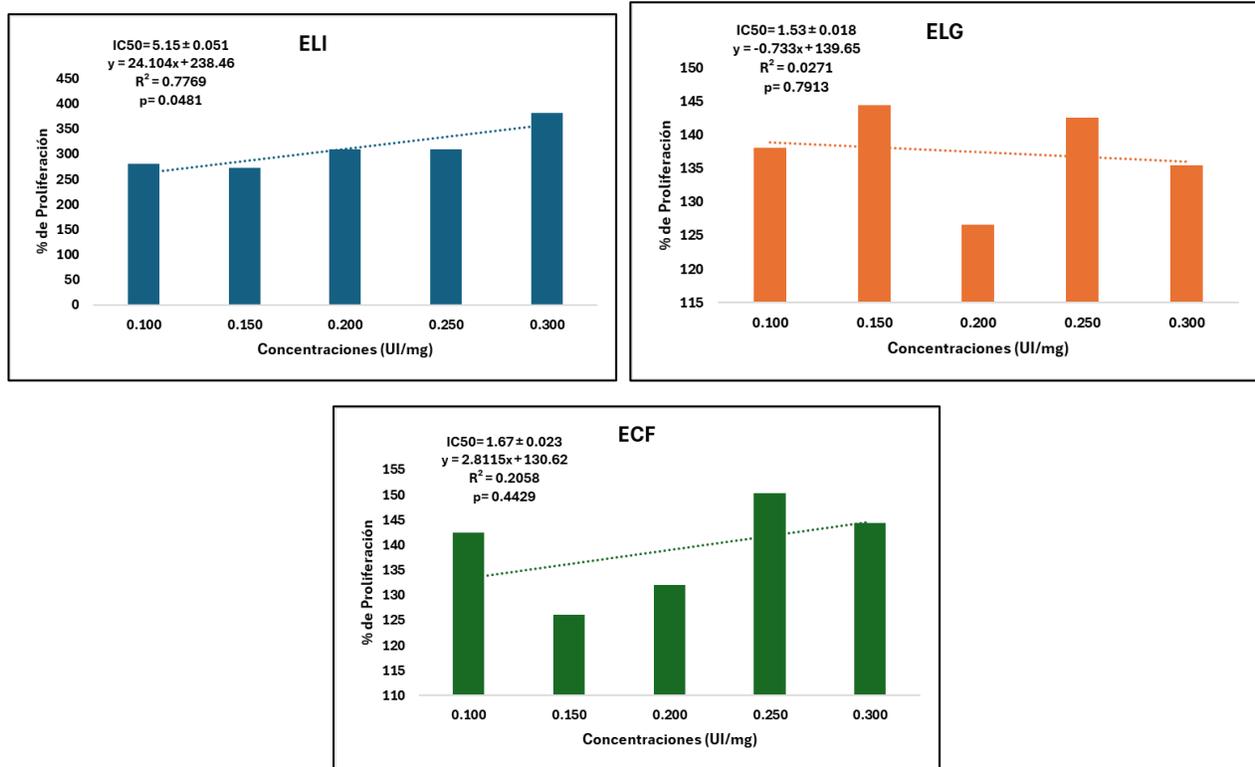


Figura 25. Correlación de concentraciones 0.10-0.30 UI/mg en línea celular A549 en los diferentes extractos

Extracto **ELI** (gráfica azul) en presencia de las células A549 a diferentes concentraciones de 0.10-0.30 UI/mg. por medio de una prueba de Pearson que si existe una correlación con un valor de $p=0.0481$. En el extracto **ELG** (gráfica naranja) en presencia de las células A549 la prueba de Pearson nos indica que no existe una correlación entre la proliferación de las células con respecto a las concentraciones que se ocuparon. Y para el extracto **ECF** (gráfica verde) en presencia de las células A549 igual nos indica la prueba de Pearson que no existe una correlación entre la proliferación de las células con respecto a las concentraciones de 0.10- 0.30 UI/mg.

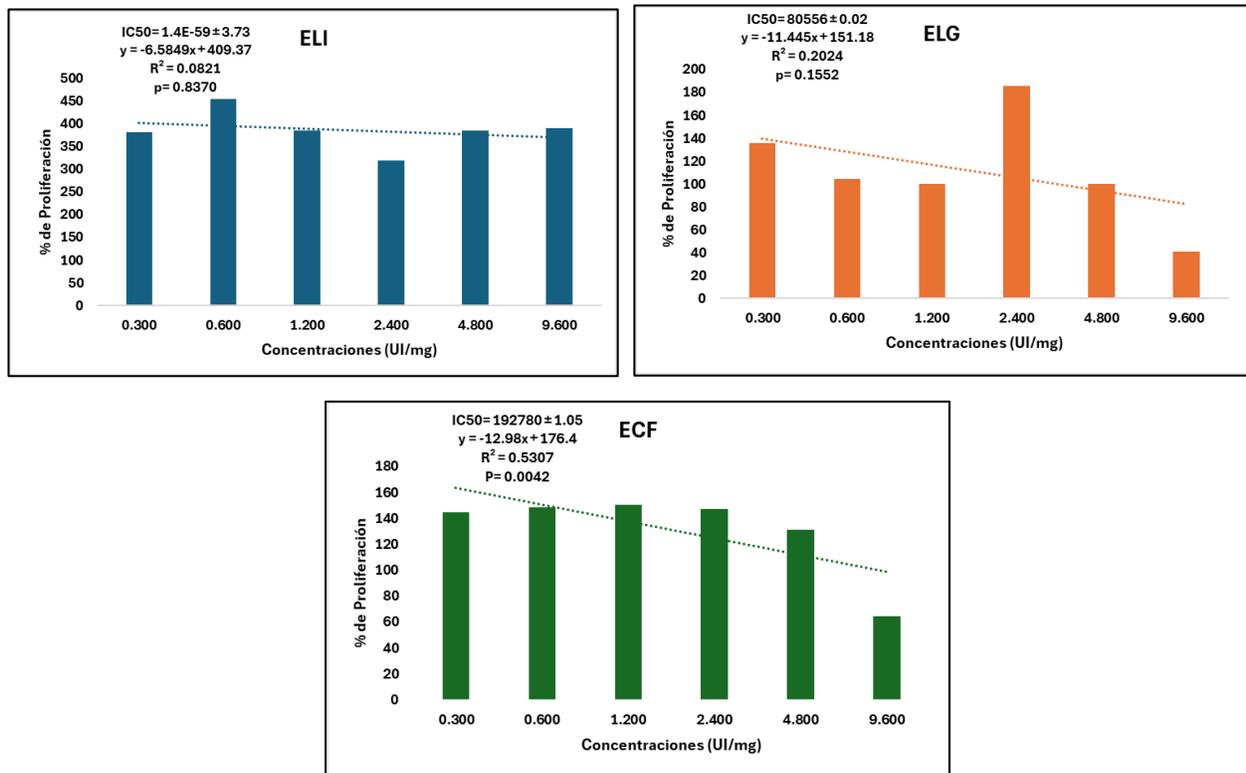


Figura 26. Correlación de concentraciones 0.30-9.60 UI/mg en línea celular A549 en los diferentes extractos

Extracto **ELI** (gráfica azul) en presencia de las células A549 a diferentes concentraciones de 0.30-9.60 UI/mg. por medio de una prueba de Pearson que no existe una correlación con respecto a la proliferación de las células con respecto a las concentraciones. En el extracto **ELG** (gráfica naranja) en presencia de las células A549 la prueba de Pearson nos indica que tampoco existe una correlación entre la proliferación de las células con respecto a las concentraciones que se ocuparon. Y para el extracto **ECF** (gráfica verde) en presencia de las células A549 igual nos indica la prueba de Pearson que si existe una correlación con un valor de $p=0.0042$.

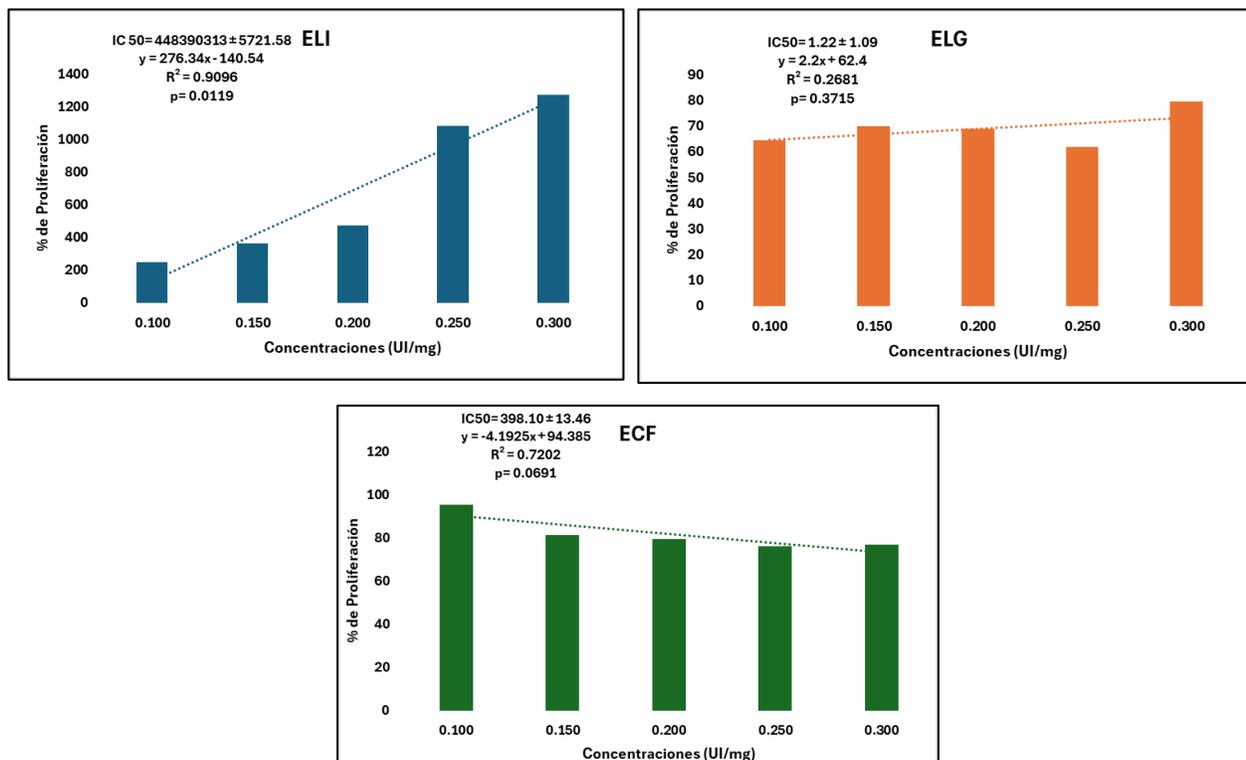


Figura 27. Correlación de concentraciones 0.10-0.30 UI/mg en línea celular LL29 en los diferentes extractos

Extracto **ELI** (gráfica azul) en presencia de las células LL29 a diferentes concentraciones de 0.10-0.30 UI/mg. por medio de una prueba de Pearson que si existe una correlación con un valor de $p=0.0119$. En el extracto **ELG** (gráfica naranja) en presencia de las células LL29 la prueba de Pearson nos indica que no existe una correlación entre la proliferación de las células con respecto a las concentraciones que se ocuparon. Y para el extracto **ECF** (gráfica verde) en presencia de las células LL29 igual nos indica la prueba de Pearson que no existe una correlación entre la proliferación de las células con respecto a las concentraciones de 0.10- 0.30 UI/mg.

Anexo 5 Fotografías de las células en distintas condiciones

Tabla 8. Fotografías de las células expuestas con el extracto ELI a las diferentes dosis en un periodo de 0 a 24 h

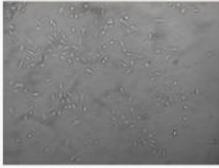
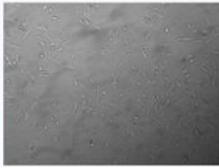
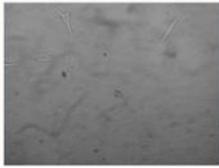
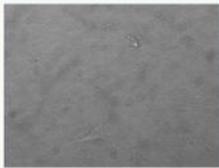
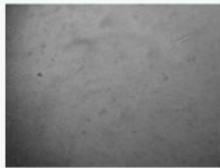
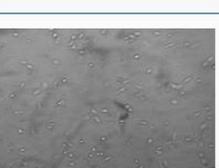
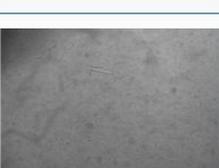
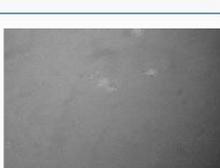
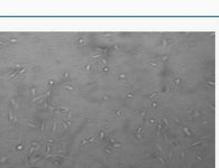
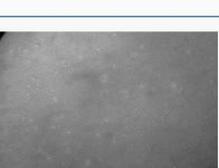
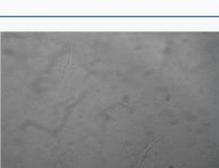
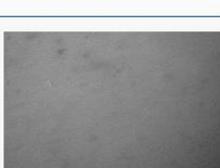
	A549		LL29	
	0 h	24 h	0 h	24 h
0.000 UI				
0.100 UI				
0.150 UI				
0.200 UI				
0.250 UI				
0.300 UI				

Tabla 9. Fotografías de las células expuestas con el extracto ELG a las diferentes dosis en un periodo de 0 a 24 h

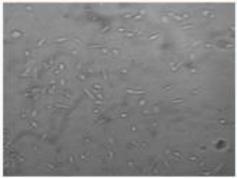
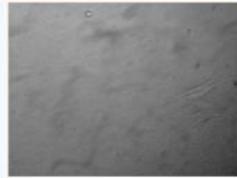
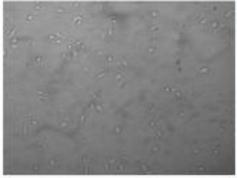
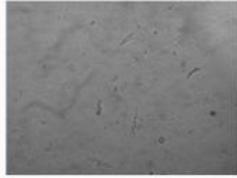
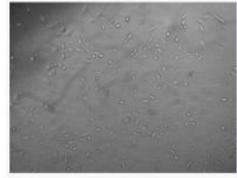
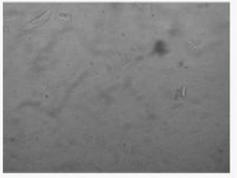
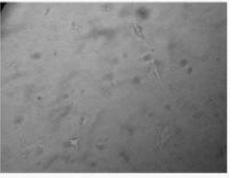
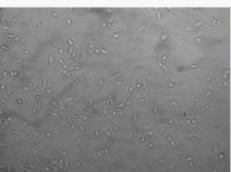
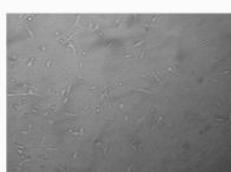
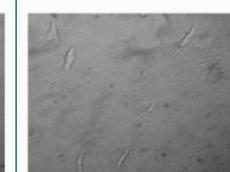
	A549		LL29	
	0 h	24 h	0 h	24 h
0.000 UI				
0.100 UI				
0.150 UI				
0.200 UI				
0.250 UI				
0.300 UI				

Tabla 10. Fotografías de las células expuestas con el extracto ECF a las diferentes dosis en un periodo de 0 a 24 h

	A549		LL29	
	0 h	24 h	0 h	24 h
0.000 UI				
0.100 UI				
0.150 UI				
0.200 UI				
0.250 UI				
0.300 UI			