



**Instituto Politécnico Nacional**



**Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía**

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Especialidad en Terapéutica Homeopática

**Efecto de *Lentinula edodes* a dosis homeopáticas, en un modelo murino de melanoma**

**Tesis**

Que para obtener el diploma de

**Especialidad en Terapéutica Homeopática**

Presenta

**Laura Lorena Aguilar Cruz**

Directoras de Tesis:

**M. en C. Lorena García Morales**

**D. en C. María Esther Ramírez Moreno**

Marzo 2012



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 25 de agosto del 2010

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMyH en su sesión ordinaria No. 7 celebrada el día 25 del mes de Agosto 2010 conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Aguilar</u>	<u>Cruz</u>	<u>Laura Lorena</u>							
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>							
Con registro:									
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">A</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">6</td> <td style="padding: 2px 5px;">5</td> <td style="padding: 2px 5px;">6</td> </tr> </table>			A	1	0	0	6	5	6
A	1	0	0	6	5	6			

Aspirante de: La Especialidad en Terapéutica Homeopática

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
"Efecto de *Lentinula edodes* a dosis homeopáticas, en un modelo murino de melanoma".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

El melanoma, siendo un cáncer de piel que aumenta dramáticamente su incidencia en México, se convierte en un blanco para la búsqueda de opciones terapéuticas. Siendo descritas en el hongo *Lentinula edodes* propiedades anti-cancerígenas, mediante este proyecto se probará la acción Terapéutica que puede tener a dosis homeopáticas.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
M. en C. Lorena García Morales y la D. en C. María Esther Ramírez Moreno.

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
ENMH - SEPI - Laboratorio de Biomedicina Molecular I  
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
 M. en C. Lorena García Morales

  
 D. en C. María Esther Ramírez Moreno.

  
 Aspirante  
  
 Aguilar Cruz Laura Lorena

  
 Presidente del Colegio  
  
 D. en C. César Augusto Sandoval Reyes López



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 10:00 horas del día 14 del mes de febrero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.N.M. y H. para examinar la tesis titulada:

"Efecto de *Lentinula edodes* a dosis homeopáticas, en un modelo murino de melanoma".

Presentada por el alumno:

Aguilar Cruz Laura Lorena  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

A	1	0	0	6	5	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Especialidad en Terapéutica Homeopática

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

M. en C. Lorena García Morales

D. en C. María Esther Rámirez Moreno

D. en C. Laurence Marchat Marchau

D. en C. Marcos A. De Nova Ocampo

M. en C. Beatriz E. Gallo Olivera

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. César Augusto Sandoval Reyes López

SECRETARÍA DE  
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
Y HOMEOPATIA  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México D.F. el día 5 del mes de Marzo del año 2012, el (la) que suscribe Laura Lorena Aguilar Cruz alumno (a) del Programa de Especialidad en Terapéutica Homeopática con número de registro A100656, adscrito a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M. en C. Lorena García Morales y la D. en C. María Esther Ramírez Moreno y cede los derechos del trabajo intitulado EFEECTO DE *Lentinula edodes* A DOSIS HOMEOPÁTICAS EN UN MODELO MURINO DE MELANOMA, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [dralauralorena@gmail.com](mailto:dralauralorena@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Laura Lorena Aguilar Cruz

Nombre y firma

## Agradecimientos

*Finalmente ha llegado el momento de enfrentarme al que quizá sea el capítulo más complicado de este trabajo. Resulta difícil sintetizar en unas breves líneas mi enorme gratitud hacia todas aquellas personas que me han ayudado y han compartido conmigo la ilusión de este proyecto.*

*A mis padres, por apoyarme incondicionalmente en todas mis locuras. Detrás de este logro están los consejos llenos de amor y sabiduría que me han brindado. Ustedes mejor que nadie saben que este trabajo es la culminación de un sueño que ha durado más de 10 años. ¡Lo logramos papitos!*

*A mi hermanita Nina, gracias por haber sacrificado tu tiempo para que yo no perdiera el mío, tú te diste cuenta del trabajo que costó esta tesis, espero que sirva de ejemplo y que algún día hagas la tuya. Te digo un secreto, cuando sea grande quiero ser como tu.*

*A la M. en C. Lorena García Morales, es muy difícil ser objetiva al hablar de una gran amiga, gracias por creer en mi, por depositar su confianza en nuestro honguito, por el apoyo, esmero y dedicación en la elaboración de este proyecto, por compartir sus conocimientos, por su heroica paciencia, por honrarme cada día con su trato cercano y afecto, pero sobre todo porque supo trasmitirme su ilusión para despertar en mí el "amor" por la investigación. Y ahora sí: al infinito y más allá...*

*A la D. en C. María Esther Ramírez Moreno, por sus siempre acertados consejos, su amable supervisión y por facilitarme todo lo que estaba a su alcance.*

*A la D. en C. Mónica A. De Nova Ocampo, por sus comentarios, aportaciones y por el tiempo dedicado a la revisión y mejora de este trabajo.*

*A la D. en C. Laurence Marchat Marchau y la M. en C. Beatriz E. Gallo Olvera, por todo el empeño y tiempo dedicado a este trabajo.*

*A mis amigos Rosario y Pablo, por caminar a mi lado, en esta que fue una gran aventura.*

*A mi palino Polito, por las porras y el apoyo. Soy tu fan.*

*A la Tuna femenina de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, por brindarme el espacio para relajarme e inyectarme de energía para poder continuar con este hermoso trabajo.*

*A mis ratoncitos, en especial a karolo, speedy y colmillo blanco.*

## Resumen

Palabras clave: Melanoma, *Lentinula edodes*, dosis homeopáticas.

La creciente estadística mundial de morbi-mortalidad ocasionada por el cáncer de piel lo hace un grave problema de salud. En México la incidencia de melanoma maligno ha aumentado hasta en un 500% en los últimos años y se espera que estas tendencias continúen hasta el año 2020. Hasta el momento la terapia convencional no ofrece un mejor pronóstico a los pacientes que lo padecen por lo que es importante la búsqueda de terapias alternativas. Al hongo *Lentinula edodes* se le han atribuido propiedades antivirales, antibacteriales, antiinflamatorias, antiparasitarias, antifúngicas, pero sobretodo antitumorales, debido a sus activos entre los que se encuentran el lentiniano, inductor de interferón, ergosterol, entre otros, sin embargo no existen reportes de su efecto a dosis homeopáticas, por lo que en este trabajo se realizó la inducción de melanoma en ratones C57BL/6 por inoculación intradérmica de la línea celular B16-F0 ofreciéndoles como tratamiento a *L. edodes* en dosis homeopáticas 6CH y 12CH. Como resultado se observó que el mejor efecto antitumoral lo tiene el grupo tratado con *L. edodes* a la 12 CH. Esta aseveración se corroboró por un análisis estadístico, mediante la prueba T de Student para muestras independientes, los resultados estadísticamente significativos fueron obtenidos por el grupo *L. edodes* 12CH comparado con el grupo *L. edodes* 6CH ( $P= 0.04376$ ) y por el grupo *L. edodes* 12 CH comparado con el grupo control negativo (alcohol homeopático) ( $P=0.00003$ ). El efecto antitumoral se comprobó mediante un análisis histopatológico, a partir de biopsias tomadas en todos los grupos, esto demostró que los tejidos obtenidos por los ratones que conformaron el grupo de *L. edodes* 12CH no presentaron ninguna evidencia de células neoplásicas.

## **Abstract**

Key Words: Melanoma, *Lentinula edodes*, homeopathic doses.

The increasing global statistics of the morbi-mortality caused by the skin cancer makes it a serious health problem. In Mexico, the cases of malignant melanoma have increased up to a 500% in the last years and it is expected these tendencies continue until 2020. Until this moment the conventional therapies do not offer a better forecast to the patients who have it, therefore it is important to look for alternative therapies. The following proprieties; antivirals, antibacterials, anti-inflammatory, antiparasit, antifungal are attributed to the fungus *Lentinula edodes*, specially the antitumor due to its actives, some of them are the lentinian, inductor of interferon, ergosterol , among others; however, there are no reports of its effects in homeopathic doses, therefore in this work it was realized the induction of melanoma in mice C57BL/6 by the intradermic inoculation of the cellular line B16-F0, offering them as a treatment the *L. edodes* in homeopathic doses 6CH and 12CH. As a result it was observed that the better antitumor effect it has the group treated with the *L. edodes* 12CH. This assertion was corroborated by a statistical analysis, by means of Student T test for independents samples. The statistically significant results were obtained by the group 12CH compared with the group *L. edodes* 6CH (P= 0.04376) and by the group *L. edodes* 12 CH compared with the group negative control (homeopathic alcohol) (P=0.00003). The antitumoral effect was double checked by a histopathological analysis, from biopsies taken in all groups, this fact proved that the tissues obtained from these murinus do not show any evidence of neoplastic cells.

## ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VI
INTRODUCCIÓN	1
Cáncer	5
Características generales del cáncer	9
Melanoma	11
Etiopatogenia del melanoma	15
Cuadro clínico del melanoma	18
Diagnóstico del melanoma	23
Tratamiento del melanoma	30
Pronóstico del melanoma	33
Hongo <i>Lentinula edodes</i>	34
Morfología, composición y Taxonomía	35
ANTECEDENTES	39
JUSTIFICACIÓN	44
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS PARTICULARES	45
METODOLOGÍA	47
RESULTADOS	64
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIÓN	85
PERSPECTIVAS	86
ANEXOS	87
Reactivos	87
NOM-062 ZOO-1999	89
BIBLIOGRAFÍA	91



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Esquema histológico de las tres capas que conforman la piel	2
Figura 2.-Formación de enlaces covalentes entre dos bases de timinas adyacentes localizadas en la misma hebra de DNA por radiación ultravioleta	15
Figura 3.-Reparación luminosa. Participación de la enzima fotoliasa en la reparación de dímeros de timina	16
Figura 4.-Reparación Obscura	17
Figura 5.-Imagen clínica de Melanoma lentigo maligno	18
Figura 6.-Imagen clínica de Melanoma de extensión superficial	19
Figura 7.-Melanoma nodular	19
Figura 8.-Melanoma acral lentiginoso	20
Figura 9.-Imagen de lesión pigmentaria con señalización de la regla ABCD para el diagnóstico de Melanoma	21
Figura 10.-Niveles de Clark	29
Figura 11.-Morfología de un hongo macromiceto	35
Figura 12.-Fotografía del hongo <i>Lentinula edodes</i> tomada por D. W. Smith	36
Figura 13.-Efecto de los extractos de los hongos: <i>G.lucidum</i> , <i>G. frondos</i> , <i>H. erinaceus</i> y <i>L. edodes</i> , sobre la viabilidad celular de las células de carcinoma de piel CH72	40
Figura 14.-Efecto de extracto de <i>L. edodes</i> (4 $\mu$ l / ml) sobre la viabilidad de las células de cáncer de piel CH72 y células epidérmicas murinas sanas C50	41
Figura 15.-Estrategia experimental	46

Figura 16.-Certificado de autenticidad de la cepa de <i>L. edodes</i> utilizada en este estudio	48
Figura 17.-Pesaje de <i>L. edodes</i>	49
Figura 18.-Maceración de <i>L. edodes</i>	50
Figura 19.-Obtención de la Tintura de <i>L. edodes</i>	50
Figura 20.-Obtención de la 1ª centesimal Hahnemanniana	51
Figura 21.-Obtención de la 2ª Centesimal Hahnemanniana	51
Figura 22.-Obtención de la 3ª centesimal Hahnemanniana	52
Figura 23.-Esquema de grupos experimentales	56
Figura 24.-Fotografía de toma de biopsia	58
Figura 25.- Corte histológico 20x que muestra melanoma epitelióide infiltrado a musculo esquelético	74
Figura 26.-Corte histológico 20x que muestra células correspondientes a melanoma con un patrón fusocelular pigmentado	74
Figura 27.-Corte histológico 20x que muestra melanoma con un patrón nodular	75
Figura 28.-Corte histológico 10x que muestra melanoma con patrón epitelióide y necrosis tumoral en un 45%	76
Figura 29.-Corte histológico 10x que muestra piel y anexos sin evidencia de células neoplásicas	77
Figura 30.-Corte histológico 10x que muestra macrófagos escasos con pigmento melánico (melanófagos) sin evidencia de células neoplásicas	78

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.-Evolución de la ganancia de peso del grupo control positivo	65
Gráfico 2.-Evolución de la ganancia de peso del grupo control negativo	65
Gráfico 3.- Evolución de la ganancia de peso del grupo 6CH de <i>L. edodes</i>	66
Gráfico 4.- Evolución de la ganancia de peso del grupo 12CH de <i>L. edodes</i>	67
Gráfico 5.-Promedio de pesos por los 4 grupos experimentales en 31 días	67
Gráfico 6.- Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en los 4 grupos experimentales	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Mortalidad reportada por tipo de cáncer en el año 2007 según la OMS	5
Tabla 2.-Promedios de volúmenes tumorales por grupo experimental	68
Tabla 3.-Evolución del desarrollo tumoral en 31 días del grupo control negativo	70
Tabla 4.-Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en el grupo control positivo	70
Tabla 5.-Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en el grupo <i>L. edodes</i> 6CH	71
Tabla 6.-Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en el grupo <i>L. edodes</i> 12CH	71
Tabla 7.-Resultados de la prueba T de Student	72
Tabla 8.-Concentrado de diagnósticos histopatológicos	78

# INTRODUCCIÓN

## Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, deriva del ectodermo que da origen a la epidermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, uñas y melanocitos, y del mesodermo que origina tejido conectivo, músculo piloerector vasos y células de Langerhans y de la dermis. Un individuo de peso y estatura medios está cubierto de 1.85 metros cuadrados de piel, la cual pesa alrededor de 4 kg, y mide 2.2 mm de espesor. Lo anterior equivale al 6% del peso corporal. Hablando de su composición química contiene agua en un 70%, minerales como el sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; carbohidratos como glucosa; lípidos, en especial colesterol, proteínas como colágena y queratina. Histológicamente se distinguen la epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1) (Arenas, 2005).

La epidermis es un epitelio plano, estratificado, queratinizado, formado del interior a la superficie por cinco estratos que a continuación se mencionan:

- 1.-Basal o germinativo: constituida por una hilera de células cilíndricas basófilas, los queratinocitos. Aquí se inicia la proliferación de estos últimos, unidos entre sí por desmosomas, y a la membrana basal por hemidesmosomas. Cada cinco a diez queratinocitos se intercalan células dendríticas (melanocitos, y células de Langerhans) y no dendríticas (células de Merkel).
- 2.-Espinoso o de Malpighi: compuesto por varias capas de células poliédricas unidas entre sí por puentes intercelulares o desmosomas.
- 3.-Granuloso: consta de células con granulaciones de queratohialina (precursores de la queratina).
- 4.-Lúcido: Sólo se presenta en piel muy gruesa, como la de palmas y plantas; está formado por eleidina.

5.- Córneo: es muy grueso en las palmas y plantas, integrado por células muertas aplanadas y sin núcleo, que contienen una proteína fibrilar, la queratina (Arenas, 2005).

La dermis se clasifica en superficial o papilar, media o reticular, y profunda. Está compuesta de tejido conectivo, vasos, nervios y anexos cutáneos.

La hipodermis o tejido celular subcutáneo está formada por lóbulos de adipocitos, que son células redondas con núcleo periférico y citoplasma lleno de lípidos. El complejo pilosebáceo consta del folículo piloso, el pelo, el músculo erector o arrector del pelo y la glándula sebácea (Arenas, 2005).

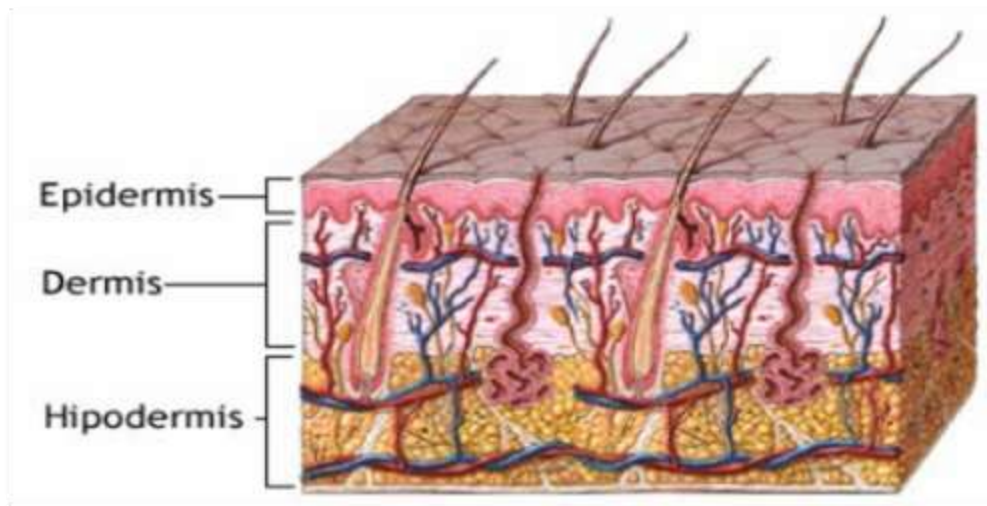


Figura 1: Corte histológico que delimita las 3 capas que conforman la piel. Tomado de <http://homepage.mac.com/penagoscorzo/udla/somato/piel.html>

Las principales funciones que desempeña la piel son las siguientes:

1. Queratínica: Ésta se origina en los queratinocitos que forman la capa basal y que al emigrar a la superficie en tres a cuatro semanas, se compactan para producir la capa córnea de queratina, de donde se desprenden de manera continua.

El queratinocito está formado por 72 a 80% de agua, y el resto de aminoácidos, principalmente cisteína; pierde su contenido hídrico de manera progresiva; en la capa granulosa tiene 10%, y en la córnea solo 2%, con lo cual la cisteína se transforma en cistina, principal componente de la queratina, fibroproteína con alto contenido de azufre, con cierta afinidad por las grasas, resistente a ácidos y álcalis débiles, así como a enzimas, y mala conductora de las radiaciones.

2. Melánica: Es efectuada por los melanocitos que se encuentran en la capa basal, y en cuyos melanosomas se elabora el pigmento melanina, formado por: eumelanina (de color café-negro), feomelanina (de color amarillo-rojo), un grupo de melaninas de tipo mixto, así como por un grupo de pigmentos endógenos diferentes, como hemoglobina, oxihemoglobina y carotenos; la formación de la melanina se inicia a partir de tirosina, que por acción de la tirosinasa se transforma en dioxifenilalanina (DOPA); ésta se convierte por oxidación en DOPA-quinona y, finalmente, en melanina. La cantidad de melanocitos es igual en todas las razas, pero los melanosomas son de mayor tamaño y más abundante en la negra; se rige por la hormona estimulante del melanocito (MSH), producida por la hipófisis. La síntesis de melanina, el pigmento que le da color a la piel, ojos y pelo, está regulada genéticamente; no se conoce con certeza su función; se piensa que protege contra las radiaciones.
3. Sudoral: Está regulada por el sistema nervioso central (SNC), en el hipotálamo; la efectúan las glándulas sudoríparas ecrinas y apócrinas. El sudor es un líquido que contiene 99% de agua y 1% de sólidos, en la forma de cloruros de sodio y potasio, y productos orgánicos como la urea; tiene importancia como regulador del metabolismo, el equilibrio de líquidos y electrolitos, y de la temperatura; así mismo, sirve como protección o barrera.

4. Sebácea: Está regida por productos gonadales y se inicia en la adolescencia; depende de la acción de las glándulas sebáceas, que elaboran ácidos grasos esterificados (50%), ácidos grasos saturados y no saturados (20%), así como colesterol y otras sustancias, como fosfolípidos y vitamina E (5%). El sudor y el sebo constituyen el manto ácido, emulsión que actúa como cosmético natural. La evaporación del sudor o transpiración insensible proporciona el manto gaseoso; estos dos estratos epicutáneos dan suavidad, elasticidad, protección y evitan fricciones o roces. La falta o abundancia de estos elementos origina los diferentes tipos de piel.
5. Sensorial o perceptiva: Se efectúa por corpúsculos de sensibilidad poco específica, pero se han relacionado como sigue: los de Meissner, con el tacto; de Krause, con el frío; de Pacini, con la presión profunda, y de Ruffini, con la sensación térmica. Muy importantes son las terminaciones nerviosas que se sitúan en la dermis y que son nociceptivas, una función sensorial indispensable para la vida (Arenas, 2005).

Como todos los órganos del cuerpo humano, la piel puede verse afectada por un sin número de patologías de diferente índole como por ejemplo el cáncer.

## Cáncer

Las estadísticas más recientes según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 1), revelan que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, en el año 2007 se le atribuyeron 7,9 millones de defunciones distribuidas de la siguiente manera:

Tipo de Cáncer	Número de Defunciones
Pulmón	1,4 millones
Estómago	866 000
Hígado	653 000
Colon	677 000
Mama	548 999
Piel	65 000

Tabla1.-Mortalidad reportada por tipo de cáncer en el año 2007 según la OMS.  
Tomado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>

La OMS, estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre los años 2005 al 2015. La frecuencia de los diversos tipos de cáncer varía según el sexo, aproximadamente el 30% de las defunciones por cáncer son prevenibles; también se reportó que el consumo del tabaco es el principal factor de riesgo de cáncer. Se pronostica que las muertes debidas al cáncer a nivel mundial sigan aumentando, y se calcula que serán 12 millones para el año 2030. Aproximadamente el 72% de las defunciones por cáncer ocurridas en 2007 se registraron en países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2007).



En nuestro país datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) del año 2007 reportaron que en la República Mexicana el cáncer representó la tercer causa de muerte entre las mujeres (35,303 defunciones, 15.4%) mientras que en los hombres fue la cuarta (33,509 muertes, 11.8%). Durante este año se registró que los tres principales tipos de cáncer que causaron defunciones en los pacientes del sexo femenino fueron en primer lugar el de mama con una incidencia de 13.8%; en segundo lugar se encuentra el cáncer cervicouterino con una incidencia del 12.1% y por último el de hígado con una incidencia del 7.6%. En los pacientes correspondientes al sexo masculino, en primer lugar se reportaron muertes debidas al cáncer de próstata con una incidencia del 15.7%, en segunda posición se localiza el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón con una incidencia del 14% y en tercer lugar el de estómago con una incidencia del 9%. De 1998 a 2007 se observó que las defunciones por tumores malignos tendieron a incrementarse, siendo las mujeres las que presentaron los porcentajes más altos en este periodo. Si bien el cáncer de piel no es de los primeros en afectar la morbi-mortalidad de la población mundial, su incidencia está en aumento. En México, según datos reportados en el primer consenso nacional de expertos en melanoma que se llevó a cabo en la ciudad de Cuernavaca, Morelos en el año 2005, en nuestro país, de los diferentes tipos histológicos existentes de cáncer de piel, merece especial atención el melanoma debido a su alta mortalidad. La afección de grupos en edad productiva lo convierte en una neoplasia difícil de estudio y manejo (AJCC, El comité estadounidense conjunto sobre el cáncer, 2010).

En los tres últimos decenios el melanoma ha aumentado su frecuencia en varios lugares del mundo hasta en un 400%. En la República Mexicana la situación es preocupante, ya que en la clínica de melanoma del Instituto Nacional de Cancerología este aumento también ha sido evidenciado, con un aumento de casi el 500% en los últimos años, y se espera que estas tendencias continúen hasta el año 2020 (Alfeirán *et al.*, 2005).

Las causas de este aumento en la incidencia del melanoma se cree que pueden deberse a:

1. El aumento en la exposición solar intermitente, provocado por las actividades recreativas al aire libre a mayor altitud o en regiones subtropicales, lo que se pone en evidencia por el aumento de la incidencia de melanoma en zonas usualmente fotoprotegidas como el tronco y las extremidades, mientras que no existe aumento de este tumor en regiones usualmente expuestas.
2. Aumento en la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre.
3. Aumento en el diagnóstico o cambios en los criterios diagnósticos, con un mayor índice de sospecha tanto en la población general como en los trabajadores de la salud, resultando en mayores índices de detección de melanoma o en la detección de melanomas en etapas más tempranas.

Respecto al cáncer de piel, los más comunes surgen de las células de la epidermis, encontrándose en orden de frecuencia según estadísticas de la OMS 2007, de la siguiente manera:

- Carcinoma de células basales: Tiene una frecuencia del 60% de los tumores de piel, es una neoplasia epitelial maligna local, formada por células parecidas a las basales, y con un estroma fibroso, con localización preferentemente centrofacial, caracterizada por lesiones polimorfas bien limitadas con un borde acordonado, muchas veces pigmentadas, de crecimiento lento; casi nunca genera metástasis.
- Carcinoma de células escamosas, o también llamado carcinoma epidermoide: Se encuentra en segundo lugar con una frecuencia del 19% dentro de los cánceres de piel. Es una neoplasia cutánea maligna, derivada de las células de la epidermis o sus anexos; se caracteriza por lesiones vegetantes, verrugosas o ulceradas que predominan en cabeza y extremidades, de crecimiento rápido, y que pueden establecer metástasis en ganglios regionales y otros órganos.

- Melanoma: Es la forma más seria de cáncer de piel, siendo este una neoplasia maligna que se origina en melanocitos epidérmicos, dérmicos o de epitelio de mucosas. Afecta piel en un 90%, ojos en un 9% y mucosas en un 1%, donde produce una neoformación pigmentada, plana o exofítica que es curable durante la etapa inicial, pero que sin tratamiento adecuado, es de rápido avance y establece metástasis linfáticas y hematógenas que suscitan mortalidad alta afectando a todas las razas y a ambos sexos. Se registra de los 20 a los 60 años de edad.

En nuestro país el melanoma cutáneo representa el 7.9% entre los tumores de piel y el 77.1% de los pacientes afectados, corresponde a estratos socioeconómicos medio bajo y bajo (Alfeirán *et al.*, 2005).

## **Características generales del cáncer**

El cáncer aparece como consecuencia de las fallas en los mecanismos que regulan el crecimiento y la proliferación celular, puede desarrollarse a partir de cualquier tejido en cualquier órgano. Ésta pérdida de la regulación celular que da origen a la mayoría de los cánceres se debe a daños de origen genético (Lodish, 2005).

El cáncer es desencadenado por lesiones genéticas no letales o mutaciones, que aparecen en el curso de la vida durante la exposición a carcinógenos, los cuales incluyen ciertos químicos, virus y radiación ultravioleta. Estas mutaciones aparecen principalmente en las células somáticas, en rara ocasión en las de la línea germinal; sin embargo, algunas mutaciones hereditarias de la línea germinal incrementan la posibilidad de la aparición de algún tipo de cáncer en cualquier momento. Existe el riesgo de que estos dos tipos de mutaciones lleguen a asociarse para causar cáncer, como resultado, los procesos de su formación denominados oncogénesis o tumorogénesis surgen como consecuencia de la interacción de la genética y del medio ambiente (Lodish, 2005).

Los principales objetivos de las lesiones genéticas, son tres clases de genes reguladores: los protooncogenes que estimulan el crecimiento, los genes supresores del cáncer que inhiben el crecimiento y los genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis. Además de estas tres clases de genes, existe una cuarta categoría de ellos, que regula la reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA) dañado porque influyen indirectamente sobre la proliferación o la supervivencia celular a través de mecanismos de reparación (Robbins, 2000).

Según Hanahan y Weinberg (2000) para que el cáncer llegue a desarrollarse, las células tumorales deben adquirir ciertas características que darán origen al fenotipo completo del cáncer más destructivo:

1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento
2. Inestabilidad a las señales de anticrecimiento
3. Evasión de la apoptosis
4. Potencial replicativo ilimitado
5. Invasión tisular y metástasis
6. Angiogénesis sostenida

Las células cancerosas adquieren un impulso para proliferar que no requiere una señal inductora externa; no logran percibir las señales que restringen la división celular y continúan viviendo cuando deberían morir. Una célula cancerosa puede asemejarse a un tipo particular de célula normal de división rápida, pero ella y su progenie tienen y adquieren una inmortalidad inapropiada. Para alcanzar cierto tamaño, los tumores deben obtener irrigación sanguínea y suelen lograrla mediante la señalización que induce el crecimiento de los vasos; a medida que el cáncer avanza, el tumor se convierte en un “órgano” anormal, cada vez mejor adaptado para el crecimiento y la invasión de los tejidos circundantes (Lodish, 2005).

Cabe mencionar que existen dos tipos de tumoraciones, las benignas y las malignas, diferenciándose principalmente por su capacidad de invasividad y de diseminación; mientras que los benignos se componen de células que se asemejan a las células normales y pueden funcionar como ellas, añadiendo que se encuentran en los tejidos donde se originaron, delimitados por lo general por una capsula fibrosa. Los tumores malignos crecen y se dividen más rápidamente que las células normales y no mueren en el tiempo previsto, aumentando su velocidad de proliferación que trae como consecuencia la invasión de estas células a los tejidos circundantes, entran a la circulación y establecen áreas secundarias de proliferación y metástasis (Robbins, 2000).

## Melanoma

Es un tumor derivado de la proliferación de melanocitos atípicos con o sin la capacidad de producir pigmento, caracterizado por su gran capacidad de metástasis. Produce una neoformación cutánea pigmentada, plana o exofítica, se presenta principalmente en piel, pero se puede presentar en otros órganos. Por lo general, es una enfermedad del adulto que afecta grupos en edad productiva. En los varones se presenta con mayor frecuencia en tronco y en las mujeres en extremidades inferiores (De la fuente y Candiani, 2010).

A continuación se enumeran los principales factores de riesgo para melanoma:

1. Historia de melanoma familiar o personal: cerca de 10% de los melanomas se desarrollan en un contexto de historia familiar; 50% de los melanomas se originan de *novo*, sin embargo, las lesiones que se pueden considerar precursoras son:
  - a) Nevos melanocíticos congénitos gigantes (más de 20 cm), con un riesgo de malignización durante la vida del 5 al 40%.
  - b) Nevos displásicos (adquiridos), en áreas expuestas y microscópicamente con atipias celulares. Se manifiestan más en la raza blanca y en la pubertad; tiene un riesgo de 6% de evolucionar a melanoma.
  - c) Nevos melanocíticos adquiridos aparecen generalmente entre los 6 y 12 meses de edad, aumentan en tamaño y número durante la infancia y hasta la cuarta década de la vida. El riesgo relativo de desarrollar melanoma en los pacientes con más de 50 nevos es de 3,2 a 14,9 aún en ausencia de otros factores de riesgo (Gutiérrez y Cortés, 2007).

2. Exposición solar y radiación ultra violeta: el aumento en la exposición solar y la alteración de la parte alta de la atmósfera por la contaminación han producido aumento en la radiación. Las personas que no se broncean adecuadamente, que desarrollan quemaduras solares muy fácilmente o con antecedentes de quemaduras solares múltiples o severas, tienen un riesgo dos a tres veces mayor. La exposición solar intermitente se ha asociado con mayor riesgo, en particular durante la niñez. Se ha postulado que la luz solar causa inmunosupresión cutánea. El incremento en la exposición a la radiación ultravioleta es considerado un factor que ha contribuido al acrecentamiento en la incidencia de melanoma, principalmente las quemaduras solares por rayos ultravioleta B (UVB) con un rango de 290 a 320 nanómetros (De la fuente y Candiani, 2010).
  
3. Efectividad de protectores solares: los filtros solares bloquean UVB pero son menos efectivos para rayos ultravioleta A (UVA) que constituyen cerca del 95% de la energía ultravioleta del espectro solar. Los protectores solares inhiben la adaptación de la piel a la luz solar (bronceado), por lo tanto su uso puede producir exposición excesiva por parte del usuario a los UVA. Datos de laboratorio demuestran que el melanoma es producido por UVA, por lo que los bloqueadores UVB pueden ser ineficaces (De la fuente y Candiani, 2010).

Se ha establecido una clasificación que ubica al individuo según el riesgo de quemarse por la exposición solar y/o a la habilidad de broncearse, determinado por la distribución de melanocitos y el contenido de estos, que da como resultado las características fenotípicas de cada raza. Esta clasificación se conoce como los Fototipos de Fitzpatrick los cuales se describen a continuación:

#### 4. Fototipos de Fitzpatrick:

- a. Fototipo I: individuos de piel muy blanca en los que la exposición solar provoca quemaduras, sin bronceado, pertenece a personas pecosas y pelirrojas.
- b. Fototipo II: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca quemaduras, con mínimo bronceado, pertenece a personas nórdicoeuropeas y centroeuropeas.
- c. Fototipo III: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca tanto quemadura como bronceado, pertenece a personas con cabello rubio.
- d. Fototipo IV: individuos de piel blanca en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado, pertenece a personas latinas.
- e. Fototipo V: individuos de piel parda en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado, pertenece a personas árabes, asiáticas e hindúes.
- f. Fototipo VI: individuos de piel negra en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado, pertenece a personas de raza negra.

Las personas con fototipos I y II de Fitzpatrick, tienen un aumento de diez veces en la incidencia de melanoma comparado con los de raza negra, y siete veces comparados con los de raza indígena y criolla de latinoamérica. El cabello rojizo, los ojos claros y otros marcadores de daño solar aumentan el riesgo tres veces más (De la fuente y Candiani, 2010).

5.- Inmunosupresión: hay mayor riesgo de adquirir melanoma en pacientes con leucemias, linfomas, trasplantes de órganos, por infección del virus de inmunodeficiencia humana, o cualquier otra inmunosupresión patológica o medicamentosa (Sociedad Española de Oncología Médica, 2010).



6.-Algunas sustancias medicamentosas pueden inducir foto sensibilidad, erupción medicamentosa, fototoxicidad o pigmentación como: anticonceptivos orales, antibacterianos, antibióticos, antifúngicos, diuréticos, antiinflamatorios no esteroideos, antipsicóticos, antidepresivos, cardiovasculares, hipoglicemiantes, anticonvulsivantes, antihistamínicos citotóxicos, hormonas, entre otros. La mayoría de estos productos tienen un espectro de absorción mixto de rayos UVA y UVB. En ocasiones no existe otra opción terapéutica para reemplazar el medicamento foto sensibilizante, por lo que se considera el uso del protector solar como la medida de intervención preventiva más importante (Quevedo, 2010).

## Etiopatogenia de melanoma

Se asocia en un 5-10% a historia familiar. El análisis genético de las familias con síndrome de nevos displásicos ha llevado a la identificación de la alteración en el gen CDKN2A (inhibidor de la kinasa ciclino dependiente 2A) que es un gen supresor de tumor y reconocido por algunos autores como el gen de susceptibilidad a melanoma más importante en síndrome de melanoma familiar. Las mutaciones en éste permiten que las células superen el paso de revisión en G1/S dando como resultado proliferación y crecimiento anárquico de las mismas. Estas mutaciones se encuentran en 20 a 40% de las familias con susceptibilidad al melanoma. Se ha reportado que las personas que presentan alteración en el oncogén CDK4 tienen un riesgo de 69-90% más alto de presentar melanoma que la población normal (Gaviria, 2005; Gutiérrez y Cortés 2007).

Una parte importante en la aparición del melanoma son los efectos que la luz ultravioleta ejerce sobre el DNA, por ejemplo la radiación ultravioleta causa, la formación de enlaces covalentes entre dos bases de timinas adyacentes localizadas en la misma hebra de DNA (Figura 2).

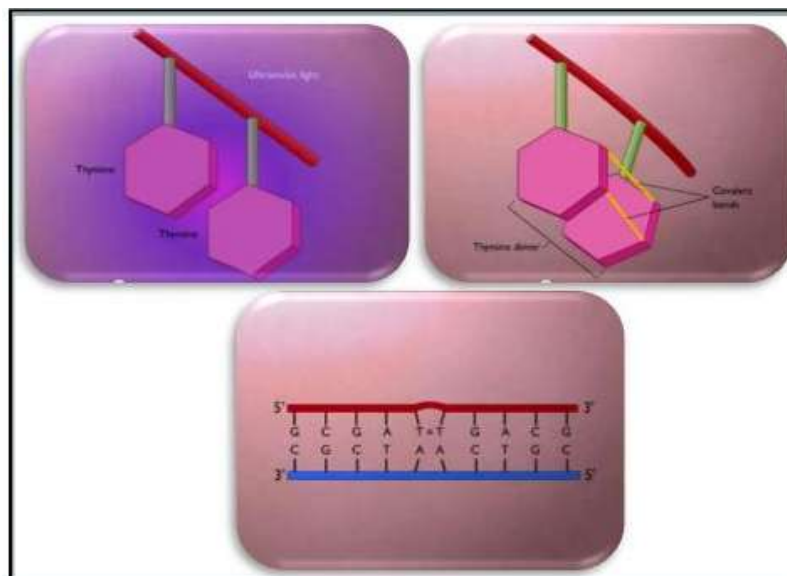


Figura 2.- Formación de enlaces covalentes por radiación ultravioleta entre dos bases de timina adyacentes localizadas en la misma hebra de DNA, tomado de <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia>.

Cuando el DNA es dañado de esta forma ya no puede replicarse o transcribirse, muchas células sin embargo son capaces de reparar este daño; por ejemplo, una enzima llamada fotoliasa puede romper los enlaces covalentes que forman los dímeros de timina, esta enzima requiere de luz visible para actuar, la usa como fuente de energía para romper los enlaces covalentes, por eso a este mecanismo se le conoce como reparación luminosa (Figura 3).

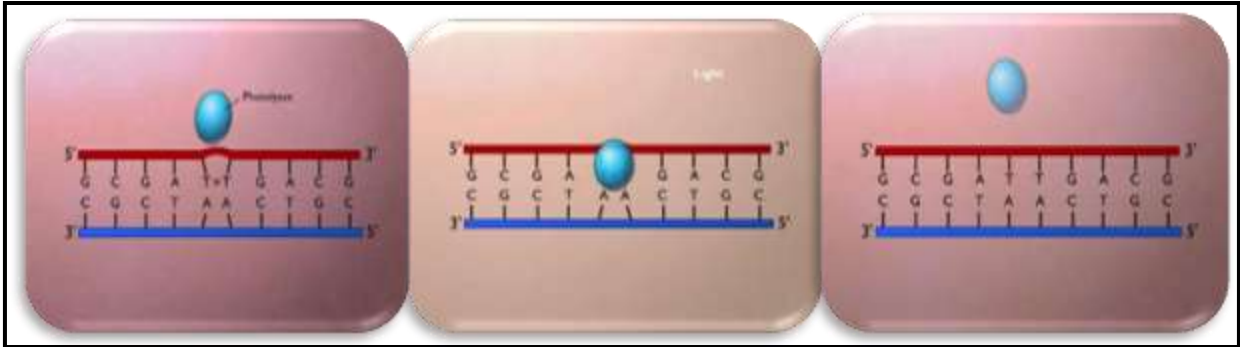


Figura 3.- Reparación luminosa. Participación de la enzima fotoliasa en la reparación de dímeros de timina, tomado de <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia>

Un segundo mecanismo de reparación involucra una enzima que separa el segmento dañado de la hebra de DNA que lo contiene, este proceso no requiere de luz, por lo que es llamado, reparación oscura, los nucleótidos escindidos son entonces reemplazados por nucleótidos añadidos por la DNA polimerasa, la DNA ligasa forma el último enlace fosfodiéster y el daño queda reparado (Figura 4). Pero cuando estos mecanismos fallan, entonces se produce el cáncer de piel (Lodish, 2005).

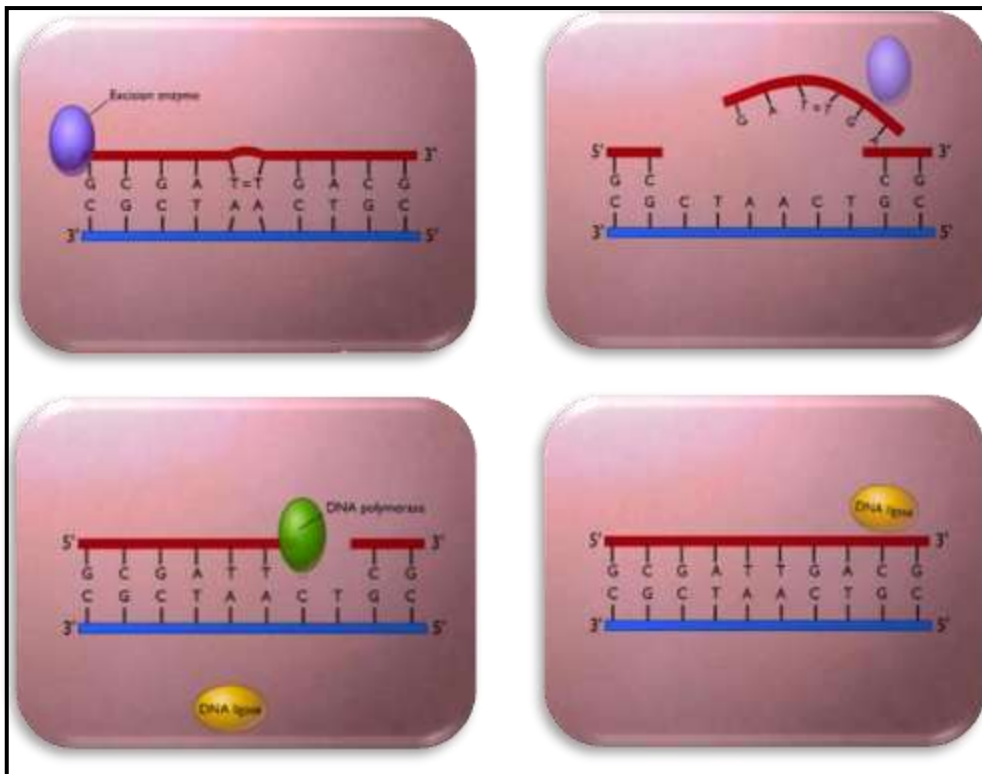


Figura 4.- Reparación oscura. Escisión de bases/nucleótidos en la reparación de dímeros de pirimidinas (timinas). Tomado de <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia>

## Cuadro clínico del melanoma

En México afecta extremidades inferiores (casi 50%), pie (43%), cabeza (23%), tronco (13%), extremidades superiores (12%) y cuello (2%). Se caracteriza por una tumoración pigmentada, que varía del color café oscuro al negro, con salida del pigmento hacia la piel circunvecina, y de bordes irregulares, el tamaño puede variar de algunos milímetros a varios centímetros; al principio la superficie es lisa; después se ulcera y se cubre de costras melicericosanguíneas; hay sensación de dolor o prurito, y lesiones satélite. La evolución es rápida y progresiva; es la neoplasia con mayor tendencia a la metástasis, que se llevan a cabo por vía linfática hacia tejidos vecinos o ganglios y por vía hematógena a vísceras, principalmente pulmones e hígado, del 0.08 al 13% se produce regresión espontánea (Arenas, 2005).

Se han descrito las siguientes variedades clínicas de melanoma:

- Melanoma lentigo maligno: Representan aproximadamente el 5% de los melanomas. Están claramente relacionados con la exposición solar de tipo constante. Afecta habitualmente a personas mayores (una a dos décadas mayores que en el melanoma de extensión superficial). Su evolución es larga antes de presentar crecimiento vertical y metástasis; sin embargo, su riesgo de producir diseminación es igual al de otros tipos de melanoma (Figura 5).



Figura 5.- a) Melanoma lentigo maligno en mejilla derecha b) Melanoma lentigo maligno en dorso nasal. Tomado de Arenas, 2005.

- Melanoma de extensión superficial: En la literatura mundial representa el 70% de los melanomas; en México, representa tan solo del 7 al 20% de estos tumores. Presenta crecimiento horizontal por un tiempo variable antes de volverse invasivo (Figura 6).



Figura 6.- a) Melanoma de extensión superficial en tórax posterior de lado izquierdo, b) Melanoma de extensión superficial en antebrazo derecho (Tomado de Arenas, 2005).

- Melanoma nodular: En México, representan la variedad más frecuente del melanoma con un 32% a un 49%. Presentan crecimiento vertical desde un inicio y son rápidamente invasivos (Figura 7).



Figura 7.- a) Melanoma nodular en planta de pie izquierdo, b) Melanoma nodular ulcerado en pierna (Tomado de Arenas, 2005).

- Melanoma acral lentiginoso. En México representan del 24% al 31% de los melanomas, en la literatura mundial representan el 8% de estos tumores. Son melanomas más comunes en personas de piel oscura, en los que predomina el componente de extensión radial y se presentan en palmas, plantas, lecho ungueal, mucosas y pene. Cuando se presenta en mucosas es de mal pronóstico ya que tiene rápido acceso a la circulación linfática (Figura 8).



Figura 8.- a) Melanoma acral lentiginoso en quinto dedo de mano derecha, b)  
Melanoma acral lentiginoso en primer dedo mano derecha  
(Tomado de Arenas, 2005).

- Melanoma de mucosas: Representan menos del 4% de los melanomas; son amelanicos hasta en un 35% de los casos, lo que hace más difícil el diagnóstico. Se presentan con mayor frecuencia cerca de las uniones mucocutáneas, aun cuando se han encontrado melanocitos en la mucosa de otros sitios tales como el esófago, el intestino delgado, vías urinarias y cavidad oral, en donde también pueden sufrir transformación maligna. Se presentan con mayor frecuencia en cabeza y cuello. Su comportamiento es agresivo, y se ha reportado que más del 85% de los melanomas de mucosas son invasivos al momento del diagnóstico (Gutiérrez y Cortés, 2007).

Ante lesiones pigmentarias difíciles de separar entre benignas y malignas, es conveniente seguir en el diagnóstico de melanoma la regla del ABCD, a la que algunos autores agregan la E.

Asimetría: no tiene forma regular definida, sus mitades no son espejos de la otra.

Bordes: Irregularidad de sus bordes.

Color: Diferentes tonalidades de la lesión, presentando varios colores en una misma que pueden ir desde el negro al pardo claro; o lesiones que cambiaron de color.

Diámetro: Lesiones nuevas mayores de 6 mm o lesiones preexistentes mayores de 2.5 cm de bordes mal definidos y con cambios.

Elevación o Ulceración: las lesiones que presentan ulceración, hemorragias o áreas elevadas indican mayor riesgo de profundidad (Figura 9) (Gaviria, 2005).



Figura 9.- Lesiones pigmentaria con señalización de la regla ABCD para el diagnóstico de Melanoma. Tomada de <http://www.aboutthehealth.com/2008/08/skin-cancer-incidence-still-unabated.html>



Todos estos cambios se aprecian mejor con microscopía de superficie, epiluminiscencia o dermatoscopia que es una técnica no invasiva, útil en el diagnóstico diferencial de las lesiones melanocíticas. Para realizarla, se requiere de un instrumento óptico llamado dermatoscopio; para hacer el examen se aplica un líquido sobre la piel (alcohol, aceite mineral o agua) de modo que se evite el reflejo de la superficie y se vuelva traslúcida la capa córnea, mejorando así la visualización de la epidermis, la unión dermoepidérmica y la dermis superficial. Con buen entrenamiento y experiencia, se pueden hacer diagnósticos acertados en un 70 a 95% de las lesiones pigmentarias (Gaviria, 2005).

Cuando una lesión presenta una de las anteriores características, está indicado realizar biopsia para confirmar su malignidad. El diagnóstico por lo tanto, es clínico y se confirma mediante biopsia excisional (Gaviria, 2005).

## Diagnóstico de melanoma

La biopsia excisional con un margen de 1 a 2 mm, orientada por el examen clínico y dermatoscópico y en algunos casos con ayuda de luz de Wood para una mejor delimitación, es la más recomendada en la extirpación de las lesiones pigmentadas para su estudio histopatológico. Antes de realizar la biopsia, el clínico debe examinar los ganglios regionales, ya que en caso de tratarse de un melanoma la inflamación reactiva de los ganglios puede resultar en falsos positivos. La biopsia debe orientarse en el sentido del drenaje linfático y, en lo posible, siguiendo las líneas de tensión de la piel. Debe preferirse el cierre directo y evitar colgajos para poder identificar recurrencias o lecho tumoral en las siguientes intervenciones. La biopsia incisional se puede llevar a cabo en las lesiones grandes sospechosas y en zonas cosméticamente problemáticas. En estos casos la muestra se debe tomar de la zona más pigmentada o de la región más elevada. Solo en aquellas lesiones muy grandes, localizadas en sitios anatómicos especiales tales como cara, pies y manos, estaría indicado realizar la biopsia incisional, en la actualidad se ha demostrado que ésta no aumenta el riesgo de extensión local o recurrencia del melanoma, pero sí de errores diagnósticos en caso de no ser tomada del sitio adecuado (Arenas, 2005).

Se siguen algunas recomendaciones para la toma de una biopsia, entre ellas incluir toda la lesión, aplicar anestesia local fuera del tumor, incluir lesiones elípticas, dejar margen de 2mm incluyendo tejido sano y hasta la fascia (Gaviria, 2005).

### Exploración de ganglios linfáticos

Una vez que se diagnostica se evalúan los ganglios que se encuentran cerca del melanoma. Por lo general, se considera el procedimiento de ganglio centinela si el grosor del melanoma es  $> 1$  mm. Si el ganglio linfático centinela resulta positivo, generalmente se recomienda que se extirpen los demás ganglios linfáticos. La resección de los ganglios linfáticos puede causar algunos efectos secundarios que pudieran ser permanentes. El que causa más molestias es el linfedema.

Para la identificación del ganglio centinela actualmente se utilizan varios métodos: la linfocintigrafía (LCG), la aplicación de azul de metileno y la detección mediante rayos GAMMA ( cámara gamma), el uso combinado de estas tres técnicas puede alcanzar una sensibilidad cercana al 100%, con azul de metileno más tecnecio disminuye la sensibilidad a un 90-95% con 5% de falsos positivos. La linfocintigrafía sola (LCG) tiene una sensibilidad del 83% y una especificidad del 93% con una tasa de falsos negativos de 7-10% (Gaviria, 2005).

### Linfadenectomía

Múltiples estudios sugieren que existe mayor sobrevida en los pacientes con diagnóstico de melanoma primario, a quienes se les realizó disección de los ganglios linfáticos de forma electiva en comparación con los pacientes a quienes se les realizó linfadenectomía terapéutica cuando presentaron ganglios clínicamente positivos. Sin embargo, por la gran morbilidad que ocasiona la linfadenectomía, es importante identificar un ganglio centinela positivo como indicación de la linfadenectomía. Es decir, se realiza cuando se encuentra ganglio centinela positivo, ganglios palpables con biopsia positiva, en lesiones con profundidad mayor a 4 mm (Gaviria, 2005).

El Comité Estadounidense Contra el Cáncer por sus siglas en inglés (AJCC) introdujo un sistema de estadificación tumor–ganglios–metástasis (TNM) (Schwartz, 2000).

### **Tumor primario (T)**

- TX: No puede evaluarse el tumor primario
- T0: No hay evidencia de tumor primario
- Tis: Melanoma in situ
- T1: Invasión de dermis papilar o 0.75 mm de grosor o menor.
- T2: Invasión de la interface dérmica papilar-reticular o 0.76 a 1.5 mm de grosor.
- T3: Invasión de la dermis reticular o 1.51 a 4.0 mm de grosor.
- T4: Invasión de tejido subcutáneo o 4.1 mm o más de grosor o lesiones satélite dentro de un área de 2 cm de cualquier melanoma primario.

## **Ganglios linfáticos regionales (N)**

- NX: No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales
- N0: No hay afección de los ganglios linfáticos regionales
- N1: Metástasis de 3 cm o menores en su dimensión mayor en cualquier ganglio linfático regional.
- N2: Metástasis de más de 3cm en su dimensión mayor en cualquier ganglio linfático regional o metástasis en tránsito.
- N2a: Metástasis de más de 3cm en su dimensión mayor en cualquier ganglio linfático regional.
- N2b: Metástasis en tránsito.
- N2c: Ambos.

## **Metástasis a distancia (M)**

- MX: No puede evaluarse la metástasis a distancia
- M0: No hay metástasis distantes conocidas.
- M1a: Metástasis a la piel, tejidos subcutáneos, o ganglios linfáticos distantes
- M1b: Metástasis viscerales.

## **Agrupamiento por etapa**

- Etapa I T1, N0, M0  
T2, N0, M0
- Etapa II T3, N0, M0  
T4, N0, M0
- Etapa III Cualquier T, N1, M0  
Cualquier T, N2, M0
- Etapa IV Cualquier T, Cualquier N, M1

El AJCC se asoció con la organización llamada los Anales de Oncología Quirúrgica para publicar una serie de editoriales para mejorar la organización de criterios para los tipos de cáncer principales de la recientemente publicada 7ª edición de la estadificación del AJCC, manual de cáncer que se centra en el

sistema de estadificación del melanoma, estas actualizaciones entraron en vigor en enero de 2010 y a continuación se mencionan sus modificaciones:

Las características clave de las nuevas recomendaciones al sistema de clasificación TNM para melanoma incluyen:

1.- Los criterios del espesor o grosor así como la ulceración del tumor continúan para definir los estratos de la categoría (T).

2.- Índice mitótico del tumor primario (histológicamente definido como mitosis/mm<sup>2</sup>) es un importante predictor adverso independiente de supervivencia. Para T1, un índice mitótico de al menos 1 mitosis/mm<sup>2</sup> sustituye al nivel de invasión como principal criterio para la definición de la subcategoría de T1b.

3.-La presencia de micrometástasis ganglionares puede ser definida por cualquiera de las técnicas de hematoxilina y eosina o tinción inmunohistoquímica (anteriormente, sólo hematoxilina y eosina podría ser usado para los propósitos de clasificación formal).

4.-No existe un umbral inferior de carga tumoral que se utilice para definir la presencia de metástasis ganglionares regionales.

En concreto, como resultado del consenso de que los volúmenes de tumor metastásico regionales < 0,2 mm de diámetro (utilizada anteriormente como el umbral para la definición de metástasis ganglionares en la 6<sup>a</sup> edición del AJCC) son clínicamente importantes, los depósitos del tumor ganglionar de cualquier tamaño deben ser incluidos en la estadificación de la enfermedad ganglionar. Un umbral basado en la evidencia más baja de metástasis ganglionares es clínicamente insignificante y no se ha definido.

5. Los estratos de la categoría (M) siguen siendo los principalmente definidos por el sitio o los sitios de metástasis a distancia: no viscerales (es decir, la piel o tejidos blandos / distancia ganglionar, M1a), pulmón (M1b), y todos los demás sitios viscerales metastásicos (M1c). Un aumento de la concentración sérica de lactato deshidrogenasa también sigue siendo un potente predictor adverso de la

supervivencia, los pacientes con este aumento son todos ellos catalogados como un M1c, sin importar el lugar o los lugares de las metástasis.

6. La supervivencia estimada para los pacientes con metástasis intralinfáticas regionales (es decir, satélites y metástasis en tránsito) es mejor que la de los pacientes restantes con enfermedad en estadio IIB. Sin embargo, como el estadio IIIB representa el ajuste estadístico más apto para este grupo, la definición actual de metástasis regionales intralinfática ha sido mantenida.

7.- El comité para la estadificación del melanoma recomendó que la característica relativamente poco común conocida como los microsatélites, definidas como cualquier nido discontinuo de células metastásicas >0,05 mm de diámetro, que están claramente separadas por dermis normal (sin fibrosis ni inflamación) del componente principal del melanoma invasivo por una distancia de al menos 0,3mm se mantienen en la categoría N2c, en gran parte porque los datos publicados en la literatura no son suficientes para justificar una revisión de las definiciones utilizadas en la 6ª edición (AJCC, El comité estadounidense conjunto sobre el cáncer, 2010).

### **Clasificación clínico-patológica de Clark**

A finales de los años 60, surgió una propuesta para clasificar el melanoma en tres tipos fundamentales en función de los rasgos clínicos y anatomopatológicos, de modo que reflejaran su patrón de crecimiento. Éstos son:

- Melanoma lentigo maligno
- Melanoma de extensión superficial
- Melanoma nodular

Además, en 1969 Clark reconoció dos fases en el desarrollo de este tumor: La denominada fase de crecimiento radial y horizontal, que se caracteriza por la proliferación de melanocitos neoplásicos en el espesor de la epidermis, sin

invasión de la dermis papilar. Esta fase se observa en el melanoma de extensión superficial, en el melanoma lentigo maligno y en el melanoma lentiginoso acral. La segunda fase, denominada de crecimiento vertical, muestra la proliferación de melanocitos originados en la epidermis que invaden la dermis papilar, reticular y/o la hipodermis. El melanoma nodular es un ejemplo básico de este patrón de crecimiento. La progresión de esta segunda fase ha permitido definir los niveles de invasión (niveles de Clark) (Figura 10) y las medidas de espesor tumoral (índice de Breslow), que son algunos de los principales parámetros histológicos que se han utilizado durante años para determinar el pronóstico de estos tumores los niveles de invasión definidos por Clark y sus características son los siguientes:

- Nivel I: o melanoma "*in situ*", donde todas las células tumorales se encuentran por encima de la membrana basal, en la epidermis.
- Nivel II: Invasión de la dermis papilar por células aisladas o pequeños nidos celulares sin expandirla.
- Nivel III: El tumor ocupa la interface entre la dermis papilar y reticular media.
- Nivel IV: infiltración franca de la dermis reticular profunda.
- Nivel V Infiltración del tejido celular subcutáneo.

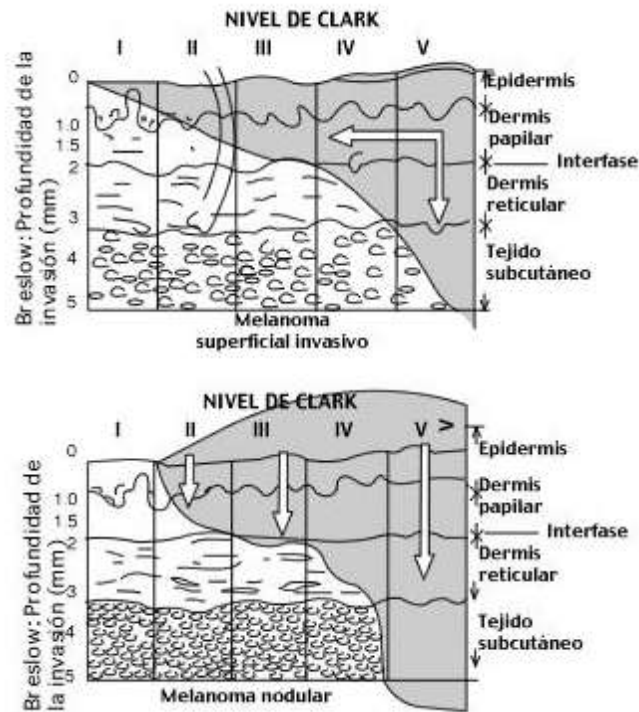


Figura 10. Niveles de Clark tomado de [www.drscope.com/pac/gineobs/g8/g8\\_pag18.htm](http://www.drscope.com/pac/gineobs/g8/g8_pag18.htm)

### Índice de Breslow

El espesor o índice de Breslow es la medida del espesor de infiltración tumoral que se mide en sentido vertical, perpendicularmente a la superficie cutánea, desde el estrato granuloso de la epidermis hasta la parte más profunda de invasión. Es el indicador pronóstico más preciso (Martinez, 2007).

- < 0.75 mm sobrevida 90 – 95 %
- 0.7 – 1.69 mm sobrevida 70 – 90 %
- 1.70 – 3.60 mm sobrevida 40 – 85 %
- > 3.61 mm sobrevida 20 – 70 %

La amplitud de los rangos de sobrevida obedece a diferencias de localización y sexo (Martinez, 2007).



## Tratamiento de melanoma

Una vez establecido el diagnóstico, el manejo debe ser multidisciplinario según el estadio del tumor, está indicado la realización de la resección quirúrgica de la lesión.

Los márgenes según la profundidad se toman de la siguiente manera:

*In situ*: 0.5 a 1 cm , <1.0 mm: 1 cm, 1 - 2 mm: 2 cm, 2 - 4 mm: 2 a 3 cm. Múltiples estudios han confirmado que dejar un margen mayor a 3 cm no cambia el pronóstico y generalmente son lesiones completamente reseçadas al dejar estos márgenes.

## Radioterapia

Según Gaviria (2005), la dosis y el tiempo de tratamiento dependen directamente de cada paciente según el lugar de metástasis o la localización del tumor, la radioterapia está indicada en:

- Lesiones primarias inoperables por contraindicaciones del paciente
- Márgenes positivos no ampliables
- Metástasis cerebrales
- Metástasis en tránsito
- Metástasis cutáneas
- Metástasis óseas
- Metástasis mediastino
- Metástasis viscerales
- Dolor
- Sangrado

## Quimioterapia

No se ha encontrado respuesta óptima con la quimioterapia, se puede utilizar en enfermedad metastásica.

Existen múltiples esquemas de manejo con quimioterapia. Se describe manejo con Dacarbazina la que muestra una mejoría de la supervivencia especialmente si se administra con interferón (Gaviria, 2005).

- **Interferón:** es una proteína natural que es producida por los leucocitos como respuesta inmune, previene diseminación y crecimiento de células enfermas. Se ha reportado que mejora la sobrevida de los pacientes en un 20-30% para quienes padecen lesiones primarias mayores de 4 mm o melanomas con ganglios linfáticos reportados como libres de enfermedad, se han realizado estudios manejando dosis altas, 20 millones de unidades intravenosas x m<sup>2</sup> de superficie corporal cinco veces a la semana por cuatro semanas, luego 10 millones de unidades subcutáneas x m<sup>2</sup> tres veces a la semana por 48 semanas, y dosis bajas durante largo tiempo tres millones de unidades subcutáneas tres veces a la semana por 2 años, encontrando una mejoría significativa de la sobrevida. Los pacientes tratados con interferón pueden presentar efectos secundarios tales como: fatiga crónica, cefalea, náuseas, pérdida de peso, mielosupresión y depresión motivo por el cual estos pacientes deben ser vigilados constantemente (Gaviria, 2005).

A pesar de su limitada eficacia clínica, el tratamiento con dacarbazina o temozolomida sigue siendo la terapia estándar para el tratamiento de melanoma metastásico (Hassel, 2010).

- **Dacarbazina o dimetil-triazeno-imidazolcarboxamida (DTIC):**  
Es el fármaco de elección; su respuesta como monodroga es de aproximadamente 25% en pacientes con enfermedad metastásica, aunque la duración de su acción es corta (de 3-6 meses en la mayoría de los casos) y sólo se ven respuestas de larga duración en 1-2% de los pacientes tratados. Los casos con mejores respuestas son aquellos con afección de partes blandas. La dosis y forma de aplicación intravenosa varía, pues se usan esquemas de 200 a 250 mg/m<sup>2</sup> administrados por cinco días, u 850-1000 mg/m<sup>2</sup> intra venosa el primer día, administrando ambos en ciclos de tres a cuatro semanas. Dentro de los efectos secundarios reportados por el medicamento se encuentran alteraciones del sistema nervioso central, digestivas, en aparato circulatorio y linfático (Eucario, 2005).
- **Temozolomida (TMZ):** alquilante oral con amplio espectro de actividad antitumoral. Tiene 100% de biodisponibilidad oral, con penetración a la barrera hematoencefálica y líquido cefalorraquídeo en un 30% de la concentración sérica, sus efectos adversos reportados abarcan insuficiencia hepática y renal así como aumento en la mielosupresión. Los primeros estudios demostraron una respuesta de un 21%, con duración de cinco meses. En un estudio reciente se comparó DTIC versus TMZ en 305 pacientes con enfermedad metastásica de melanoma; la respuesta completa para dacarbazina sola fue de 2.7% y para TMZ de 2.6 %, con supervivencia de 7.7 y 6.4 meses respectivamente (Eucario, 2005).

## Pronóstico de melanoma

Depende de las clasificaciones clínicas por etapas e histológica. El diagnóstico y tratamiento tempranos se instituyen ante una profundidad de menos de 1 mm. En la etapa clínica el pronóstico depende de múltiples variables: sexo, edad y localización anatómica.

El grupo de estudio de melanoma de la OMS ha considerado tres grupos de riesgo de melanoma, según el comportamiento biológico del tumor:

- A) Riesgo bajo: De 1 mm de profundidad, y en más de 95% confinado al sitio primario; la curabilidad es del 100%.
- B) Riesgo intermedio: Grosor intermedio, de 1 a 4 mm, con riesgo de metástasis ganglionares de 60% y a distancia de 20%; hay controversia respecto a si la disección ganglionar resulta beneficiosa; según algunos esta última plantea cierta ventaja.
- C) Riesgo alto: Melanoma grueso, de más de 4 mm; puede haber metástasis a distancia en más de 70%.

La supervivencia a cinco años ante melanomas delgados es de 92.5%; ante intermedios de 72.6%, y ante los gruesos de 48%; es menor en mayores de 65 años de edad (Arenas, 2005).

Debido a los efectos adversos de los quimioterápicos antes mencionados y al pobre pronóstico que muestran los pacientes con melanoma, se hace prioritaria la búsqueda y aplicación de otros tratamientos, en este tenor el hongo *Lentinula edodes* (*L. edodes*), ofrece una excelente opción de tratamiento contra melanoma, basándose en investigaciones donde se han recopilado sus acciones medicinales más importantes entre las que se encuentran su efecto anticanceroso, antiviral, antibacterial, hipolipidémico, reductor de la presión arterial, la viscosidad sanguínea y la fatiga, además de que se ha comprobado su efecto en el aumento de la libido entre otros (Stamets, 2001).

## ***Lentinula edodes***

El hongo *L. edodes* empieza a formar parte de la historia del hombre hace aproximadamente unos mil años, cuando se le descubrió creciendo en robles y otros árboles de las montañas asiáticas durante el apogeo de la dinastía Sung-Wu (960- 1127 D.C).

Es un hongo tradicional de Japón, Corea y China, es apreciado tanto por su sabor como por sus beneficios sobre la salud. Ha sido cultivado en las regiones montañosas de Asia mediante técnicas tradicionales y solo en los últimos treinta años, se comenzó el estudio de técnicas superiores de cultivo para lograr rendimientos adecuados para su comercialización al mundo occidental (Oei *et al.*, 2003). La historia taxonómica del *L. edodes* se remonta al año de 1877, cuando Berkely propuso el nombre de *Agaricus edodes* para su clasificación. De allí en adelante, la seta fue cambiando de género en género pasando *por Collybia, Armillaria, Lepiota, Pleorotus y Lentinus*, esta última clasificación dada por Singer. Recientemente Pegler denominó al *L. edodes* por las diferencias microscópicas que existían con respecto a su última clasificación (*Lentinus*). Aun así, son muchos los autores que siguen refiriéndose a él como *Lentinus edodes*, aunque lo más correcto es nombrarlo como *L. edodes* (Stamets, 2001).

*L. edodes* es también llamado hongo de roble dorado, hongo negro, hongo chino, Donku, Shiangku, Pasania, pero el nombre por el que es mundialmente conocido es Shiitake, que significa en japonés *shii*=castaño, y *take*=hongo debido a que usualmente dicha especie fúngica crece sobre la especie arbórea *Castanopsis cupidata* (Pérez, 2010). *L. edodes* es el máximo exponente de los hongos gourmet. Es un basidiomiceto (hongos de reproducción sexual por basidios o células hifales en forma de clavo que poseen 4 basidiosporas) del género *Lentinula*. Se desarrolla en árboles muertos o moribundos de hoja ancha, particularmente robles y hayas, razón por la cual se considera saprófito (Carrillo, 2003).

## Morfología, Composición y Taxonomía:

En la figura 11 se muestran las principales partes que componen a un hongo macromiceto:

**Cutícula:** membrana exterior que recubre el sombrero y el pie. Fundamental para determinar la especie, tanto por su estructura como por su color. La cutícula puede ser lisa, rugosa, seca, viscosa, presentar restos en forma de escama, verrugas, estrías y también puede estar fuertemente adherida al sombrero, o ser fácilmente separable.

**Pileo:** la parte más ancha de la seta. Situado encima del pie, puede presentar una amplia gama de colores y tiene la forma de un paraguas, aunque con muy diferentes diseños: esféricos, acopados, crónicos, acampanados, ramificados.

**Himenóforo:** parte inferior del sombrero, sostiene al himenio, donde se encuentran las esporas de origen sexual.

**Pie:** sostiene el píleo, puede ser recto o curvado y comúnmente cilíndrico.

**Anillo:** parte residual procedente del velo y situado bajo el sombrero cuando éste se expande, tiene como misión proteger el himenio y facilitar la maduración de las esporas.

**Volva:** parte subterránea y membranosa que rodea la base del pie de algunas especies en forma esférica (Solomon, 1996).

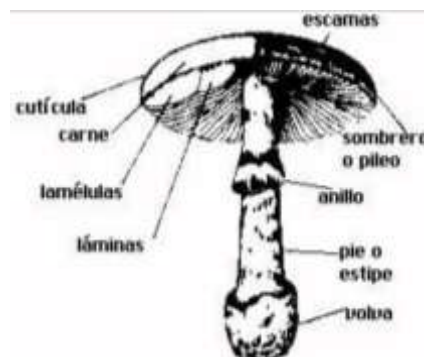


Figura 11.- Morfología de un hongo macromiceto. Tomado de Solomon, 1996.

Respecto al *L. edodes*, este tipo de hongo, se caracteriza por tener un sombrero de 5 a 25 cm de diámetro, semiesférico. Inicialmente presenta un color café oscuro casi negro pero con el tiempo su color cambia a café claro. La forma del sombrero en algunas ocasiones puede ser irregular, sin embargo, normalmente el hongo al principio debe estar un poco enrollado, a medida que se desarrolla debe ser encorvado y finalmente cuando alcanza la madurez su sombrero se vuelve aplanado. Otro indicador importante del desarrollo del hongo, son las manchas o pelusas que aparecen irregularmente en el sombrero, inicialmente son puntos de color blanco pero pueden llegar a tornarse de color café cuando el hongo se está deteriorando (Figura 12) (Solomon, 1996).



Figura 12.- Fotografía de *Lentinula edodes* tomada por Damon W. Smith 2008

El hongo *L. edodes* taxonómicamente se clasifica en la forma siguiente:(Solomon, 1996).

REINO	Fungi
PHYLLUM	Basidiomycota
CLASE	Basidiomycetes
ORDEN	Agaricales
FAMILIA	Tricholomataceae
GENERO	<i>Lentinula</i>
ESPECIE	<i>edodes</i>

El valor nutricional por cada 100 gramos de este hongo es de 39 calorías, proteínas, 7.3 g carbohidratos, 0.8 g. fibra, 0.8 mg. tiamina), 0.5 mg riboflavina, 5.5 mg niacina y alto contenido en vitamina D (200 iu). Además también posee apreciables cantidades de vitamina A, E, C, B1, B2, B6 y B12. El contenido de agua en los hongos es de 85 a 90% y el carbón total es de 40 al 50% del peso seco. El contenido de nitrógeno varía en los reportes publicados entre 2.27 y 5.13% y un análisis de aminoácidos esenciales revela que todos éstos están presentes en altas concentraciones. Con relación al contenido de grasas, se encuentran en mayor porcentaje los ácidos grasos no saturados, debido a la presencia principalmente del ácido linoléico. *L. edodes* es una buena fuente de vitaminas, así como de minerales, donde sus cantidades dependen de la edad de la muestra fresca (Stamets, 2001).

Del metabolismo de *L. edodes* se obtienen muchos productos, entre los cuales se encuentran:

**Lentiniano:** es un polisacárido (27.5 kDa)  $\beta$ -1-3-D-glucano con ramificaciones en la posición 6 y de estructura triple, este exopolisacárido (Lam y Ng, 2001a) posee propiedades anticancerosas (cáncer de intestino, estómago y ovarios) (Sugano, 1985). Incrementa la generación de linfocitos T citotóxicos y células NK en presencia de interleucina 2, inhibe el crecimiento de las especies *Physoctenidia aetnensis*, *Botrytis cinerea* y *Mycosphaerella arachidicola*, la actividad de la transcriptasa reversa de VIH-1 (Patrick, 2003) y la proliferación de células de leucemia (Lam *et al.*, 1997). Otros autores han demostrado que normaliza parcialmente la caquexia inducida por factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), inhibe la infección (*in vitro*) célula a célula de los virus VIH 1 y VIH 2 y aumenta la resistencia del organismo a infecciones bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias (Hatvani, 2001).

**Eritadenina:** es un derivado acíclico de adenosina y un hipolipidémico que disminuye la tasa de colesterol, fosfolípidos y moléculas derivadas del fosfatidil colina en el plasma sanguíneo entre un 5% a un 10% (Belinky *et al.*, 2002).



**Ergosterol:** es un precursor de la vitamina D, necesario para la absorción de calcio y potasio, siendo eficaz en el tratamiento de cáncer de colon (Belinky *et al.*, 2002).

**Ácido linoléico:** es un precursor de la prostaglandina, eficaz en el tratamiento de problemas de erección masculina (Belinky *et al.*, 2002).

**Aminoácidos:** Glutamina, Arginina, Glicina, Serina, Metionina y Cisteína.

**Quitina:** Disminuye las concentraciones de colesterol en el plasma sanguíneo.

**Enzimas:** se encuentra la súper-óxido dismutasa, que disminuye la peroxidación de lípidos, la asparaginasa, eficaz en el tratamiento de la leucemia infantil (Belinky *et al.*, 2002).

**Minerales:** Sodio, Potasio, Sílice, Magnesio, Aluminio, Calcio, Hierro, Fósforo, Azufre y Zinc, el cual aumenta los niveles de testosterona en el plasma (Riu *et al.*, 1999).

**Otros constituyentes:** También se encuentran el LC11, un  $\beta$ -1-6-D-glucano con ramificaciones en la posición 1-4; peptidomanano KS2, monoglicéridos y ácidos libres, fosfolípidos como el fosfatidiletanolamina y la cardiolipina y cerebrósidos, estos últimos, constituyentes de las neuronas, espermatozoides, leucocitos y hematíes (Riu *et al.*, 1999).

## ANTECEDENTES

En el año de 1970 se efectuaron investigaciones sobre los efectos antitumorales de *L. edodes*, donde Chihara y cols., aislaron, fraccionaron y purificaron diferentes polisacáridos obtenidos de extractos acuosos preparados a base de carpóforos de *L. edodes*, los cuales fueron utilizados para determinar el efecto sobre el crecimiento del sarcoma 180 implantado subcutáneamente en ratones albinos suizos o cepa SWM/Ms; encontrando que el polisacárido con actividad antitumoral más importante es el lentiniano ya que indujo regresión casi completa del tumor a dosis de 1 mg/kg x 10 dosis y que adicionado a esto no mostro ningún signo de toxicidad, en comparación con los 5 polisacáridos aislados restantes (Chihara *et al.*, 1970) Posteriormente en 1984 Suga y cols., realizaron un estudio para determinar el efecto antitumoral del lentiniano en diferentes cepas murinas inductoras de tumores singénicos a las cuales se les provocó sarcoma 180, entre las cepas utilizadas se encontraron DBA/2, SWM/Ms y C3H/He o C57BL/6, comprobando que el lentiniano es efectivo contra el sarcoma 180 a 4mg/kg intraperitoneal, el cual mostró mejor efecto sobre la cepa de ratones SWM/Ms (Suga *et. al.*, 1984). Años más tarde Jeannin y cols., en 1988 probaron el efecto antitumoral del lentiniano contra carcinoma peritoneal inducido en ratas BDIX usando la línea celular K12/PROb murina de adenocarcinoma de colon; el tratamiento consistió en 5 inyecciones intraperitoneales cada 2 días a razón de 2mg de lentiniano/kg iniciándose el día 14 postinoculación. Los resultados obtenidos demostraron que 11 de las 20 ratas tratadas con este esquema terapéutico se encontraron libres de tumor para el día 42 en el cual se les realizó la autopsia (Jeannin *et al.*, 1988). En el año 2004 Souza-Paccola y cols., evaluaron el efecto de *L. edodes*, sobre dos cepas de *A. nidulans* sometidas a daño por radiación ultravioleta, el hongo fue utilizado en 2 extractos diferentes, el primero realizado a base de fructificaciones frescas y el segundo preparado a base de fructificaciones deshidratadas, el estudio demostró un mayor incremento en la tasa de supervivencia de los conidios de *A. nidulans* tratados con los extractos de fructificación deshidratada de *L. edodes* (Souza *et al.*, 2004).

En el año 2005 Gu y Belury, estudiaron los efectos de extractos de etanol de cuatro especies de cuerpos fructíferos de los hongos medicinales: *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus* y *L. edodes*, donde se evaluó su modulación para la proliferación y viabilidad celular en células de carcinoma murino de piel (CH72) y en células epidérmicas murinas sanas (C50). Encontrando que, mientras los extractos de *G. frondosa*, *G. lucidum*, y *H.erinaceus* ejercieron poco o ningún efecto sobre la proliferación celular de la línea CH72 (Figura13), el extracto de *L. edodes* la redujo significativamente. En contraste no hubo cambios en la respuesta proliferativa de la línea celular no tumorigénica C50 (Gu y Belury, 2005).

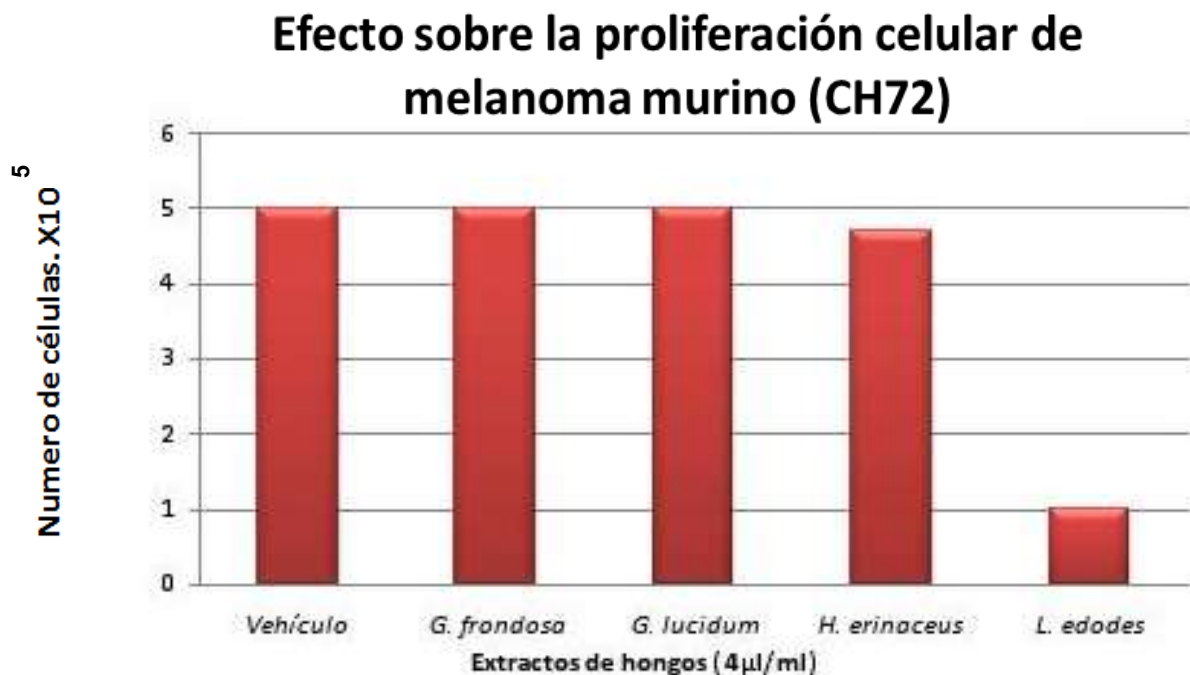


Figura 13.- Efecto de los extractos de los hongos: *G. lucidum*, *G. frondosa*, *H. erinaceus* y *L. edodes*, sobre la viabilidad celular de las células de carcinoma de piel CH72 (Modificada de Gu y Belury, 2005).

Adicionalmente el tratamiento con *L. edodes* durante 24 horas produjo un 90% de reducción en la viabilidad celular de la línea CH72, mientras que solamente produjo un 10% de pérdida de viabilidad en las células normales C50 (Figura 14).

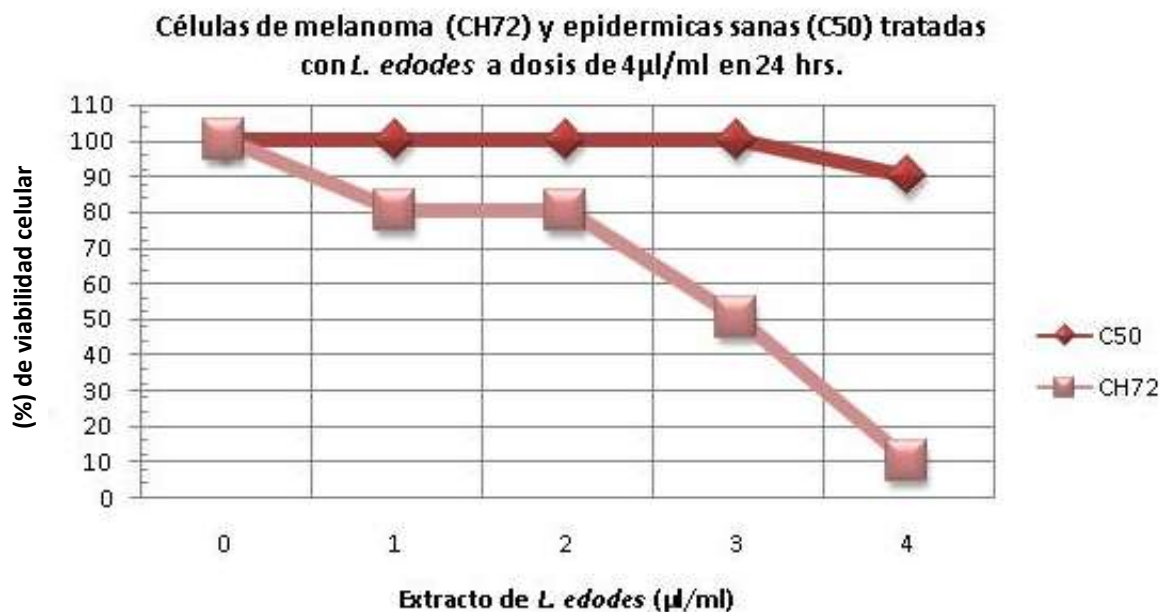


Figura 14.-Efectos de extracto de *L. edodes* a una concentración de 4 µl / ml sobre la viabilidad de las células de cáncer de piel CH72 y células sanas C50 en un tiempo de 24 horas (Modificada de Gu y Belury, 2005).

Los autores sugieren que el mecanismo mediante el cual *L. edodes* lleva a cabo la reducción de la viabilidad de la línea celular CH72 es mediante apoptosis selectiva, debido a la observación de cuerpos pro-apoptóticos en las células CH72. Sin embargo no muestran evidencias experimentales adicionales que corroboren dicha aseveración.

Aunado a esto se han realizado investigaciones sobre *L. edodes* en combinación con inmunoterápicos los cuales han demostrado potenciar sus efectos; por ejemplo en el año 2007 Wu y cols., determinaron la actividad antitumoral del tratamiento con extractos a base de micelio de *L. edodes* (LEM) en combinación

con 5-Fluorouracilo en células de cáncer de colon humanas (COLO 205), injertadas en ratones desnudos, observando que fueron altamente sensible a la apoptosis inducida por el tratamiento combinado de 5-Fluorouracilo con LEM en comparación con 5-fluorouracilo solo (Wu *et al.*, 2007). En el año 2011 Fu y cols., examinaron la actividad antitumoral de *L. edodes* en ratas a las cuales se les indujo hepatocarcinoma, observándose el mejor efecto terapéutico manifestado por una mayor disminución del volumen tumoral en el grupo al que se le administro *L. edodes* a razón de 200mg/Kg intraperitonealmente (Fu *et al.*, 2011).

Para dar soporte a nuestra estrategia experimental, es importante mencionar que utilizamos el modelo de melanoma murino previamente estandarizado que García-Hernández y cols., utilizaron en el año 2002 donde se trabajó con ratones C57BL/6 y la línea celular de melanoma B16-F0 (García-Hernández *et al.*, 2002). Esta línea es singénica con la cepa de ratones antes mencionada ya que fue derivada de un tumor espontáneo de la oreja de estos últimos, la cual es tumorigénica no metastásica al ser aplicada vía intradérmica, ya que sus propiedades de crecimiento son adherentes. De esta línea parental de melanoma se obtuvieron variantes, cada una de las cuales destaca por un comportamiento característico: B16-BL6 (altamente metastásico); B16-F1 (pobremente metastásico); B16a (amelánico, metástasis espontáneas); B16-PA4M (metástasis ganglionares); B16-F10 (especificidad y rendimiento en metástasis pulmonares); B16-O10 (especificidad para las metástasis ováricas). Las líneas B16 conservan su capacidad metastásica aun después de haber realizado varios subcultivos. Con respecto a la cepa C57BL/6, fue desarrollada por Little y cols., en 1921 y posteriormente introducida por el Jackson Laboratory en 1984 (generación F-22) (Fidler, 1975).

Respecto al uso de tratamiento a base de medicamentos homeopáticos, Kuttan y colaboradores en el año 2007, realizaron un estudio donde evaluaron el efecto de dos de ellos *Hydrastis canadensis* y *Ruta graveolens* contra tumores trasplantados en ratones C57BL/6 y ratones suizos albinos, obteniendo resultados significativos, ya que *Ruta graveolens* aumentó la sobrevivencia de los ratones con tumor en un

49,7% mientras que *Hydrastis canadensis* lo hizo hasta en un 69,4%. Por lo anterior consideramos buena alternativa probar *L. edodes* a dosis homeopáticas en un modelo murino de ratones C57BL/6 (Kuttan *et al.*, 2007).

En el año 2008 Banerji y colaboradores realizaron en conjunto con el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América un estudio observacional donde evaluaron los procedimientos de tratamiento a base de medicamentos homeopático para varios tipos de cáncer, bajo el programa “Best Case Series”. Entre los medicamentos utilizados se encontraron *Kali carbonicum* y *Ferrum phosphoricum* para cáncer pulmonar y *Condurango* para cáncer esofágico lo anterior fue guiado por el protocolo Banerji utilizado desde la década de los 90’s para tumores cerebrales, donde obtuvieron como resultados finales que del total de pacientes atendidos, 17,324 para ser exactos entre los años de 1990 y 2005, en el 19% de los casos hubo una regresión completa de los tumores y en el 21% de los casos los tumores permanecieron estacionarios o experimentaron una mejoría manifestada por una disminución en el volumen tumoral después del tratamiento (Banerji *et al.*, 2008).

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a la incidencia creciente de Melanoma proyectada para los próximos 10 años en nuestro país y al pobre pronóstico que presentan los pacientes que lo padecen es una prioridad buscar opciones terapéuticas efectivas que brinden un mayor beneficio en comparación con la terapéutica alopática convencional. Ante la carencia de reportes de la patogénesis de *L. edodes* en la farmacopea homeopática, resulta sumamente interesante saber si las propiedades antitumorales que este hongo presenta, se conservan e incluso se potencian, a dosis homeopáticas.

## **HIPÓTESIS**

A dosis homeopáticas, *L. edodes*, tendrá efectos significativos en la disminución del volumen del crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma.

## **OBJETIVO GENERAL**

Valorar el efecto que *L. edodes*, a dosis homeopáticas, tiene sobre el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtención de la tintura madre y realización de diluciones homeopáticas de carpóforos de *L. edodes* obtenidos del micelio certificado por identificación morfológica.
- 2.- Inducción de melanoma en ratones C57BL/6 por inoculación intradérmica de la línea celular B16-F0.
- 3.-Evaluación del efecto medicamentoso de *L. edodes* a dosis homeopáticas sobre el crecimiento tumoral de melanoma en ratones C57BL/6.

Para la realización de este estudio se siguió la estrategia experimental que se muestra en la figura 15.



## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

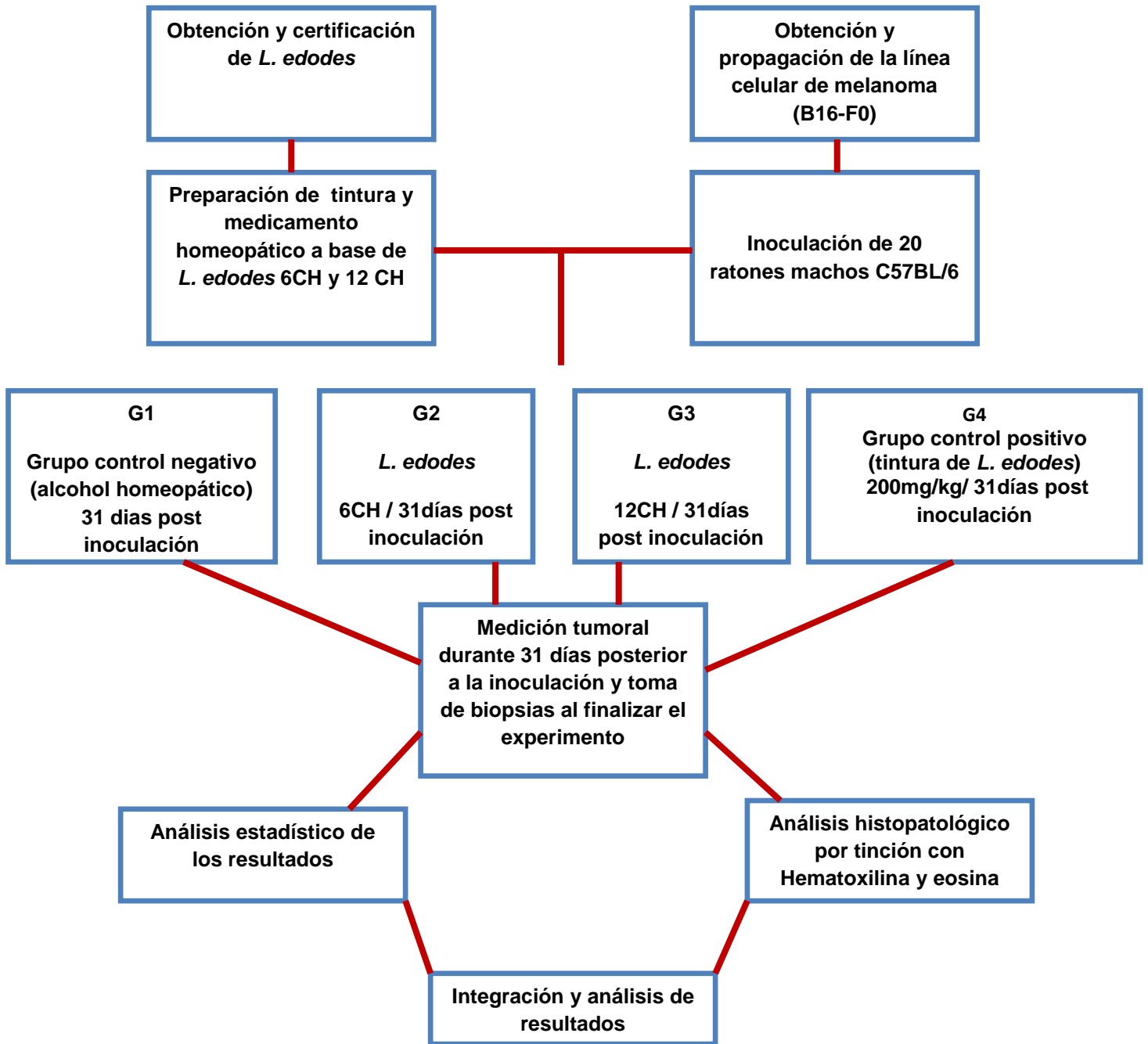


Figura 15.-Esquema que representa la estrategia experimental.

## METODOLOGÍA

### **Obtención y certificación de micelio y fructificación de *L. edodes***

Se adquirieron 3 kg de micelio de *L. edodes* del lote con clave 00-IPJ-SHK cultivados en trigo provenientes del Colegio de Posgraduados (COLPOS), campus Puebla, en el departamento del Centro de Vinculación con el Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles (CVINHCO), producido en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales a cargo del Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, Profesor Investigador Titular. Posteriormente el micelio se identificó y certificó en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Botánica, Laboratorio de Micología por el M. en C. Ricardo Valenzuela Garza, especialista en Taxonomía de hongos degradadores de la madera. Una vez realizada la certificación, se acudió nuevamente al COLPOS, campus Puebla, para la recepción de 4 kg de carpóforos de *L. edodes* cosechados del mismo lote 00-IPJ-SHK, 2 kg se entregaron en forma fresca y el resto en forma deshidratada.

En la figura 16 se presenta el documento expedido por el M. en C. Ricardo Valenzuela Garza del Laboratorio de Micología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, en donde certifica la autenticidad de la cepa de *L. edodes* utilizada en este estudio.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA  
LABORATORIO DE MICOLOGÍA  
Tel. 01 55 57 29 60 00 ext. 62329



Asunto: Certificación de  
Cepa de Hongo

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE POSGRADO ESPECIALIDAD EN  
TERAPÉUTICA HOMEOPÁTICA  
PRESENTE.-

El que suscribe M. en C. Ricardo Valenzuela Garza, especialista en Taxonomía de hongos degradadores de la madera, certifica que la cepa de hongo cultivado en trigo que fue proporcionada por la alumna de la Especialidad en Terapéutica Homeopática Laura Lorena Aguilar Cruz, corresponde por sus características morfológicas a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, un hongo comestible, medicinal y degradador de madera, originario de Japón. Es importante señalar que este hongo no contiene sustancias tóxicas para los humanos y puede ser utilizado sin problema alguno para extraer los principios activos de importancia médica y homeopática.

Se extiende el presente certificado para los usos que a los interesados convenga a los siete días del mes de septiembre de dos mil diez.

ATENTAMENTE

M. EN C. RICARDO VALENZUELA GARZA  
JEFE DEL LABORATORIO DE MICOLOGÍA



Figura 16.- Certificación de la autenticidad de la cepa de *L. edodes* utilizada en este estudio.

## **Preparación de tintura madre y medicamento homeopático a base de *L. edodes***

La preparación de la tintura madre y diluciones homeopáticas se efectuó con carpóforos de *L. edodes* obtenidos del micelio certificado por el Laboratorio de Micología de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

El medicamento se obtuvo con base en las reglas de la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos.

La tintura madre de *L. edodes* se obtuvo por la cuarta regla, la cual se prepara con cinco partes en peso de alcohol y una parte de planta y se utiliza para sustancias que comprenden animales, plantas o partes de plantas secos. La fuerza medicamentosa de esta preparación es de 1/10.

Los carpóforos deshidratados de *L. edodes* se limpiaron y eliminaron partes rotas descoloridas, marchitas, tierra, polvo, etc. Se pesaron 25 g de *L. edodes* (Figura 17), y 5 veces, de alcohol de 90°, requiriéndose 125 gramos de alcohol equivalentes a 200 ml.



Figura 17.- Pesaje de 25 gramos de *L. edodes*.

Los carpóforos se cortaron en pequeños trozos (aproximadamente 2 cm por lado) y se mezclaron con los 200 ml de alcohol, se envasó y etiquetó el frasco (Figura 18), se sucucionó 200 veces, dos veces al día durante 15 días, posterior a eso se separó por decantación la tintura del residuo (Figura 19), se prensó este último y los líquidos reunidos se filtraron, envasaron, etiquetaron y almacenaron para la subsecuente preparación de *L. edodes* a dosis homeopáticas (Comisión permanente de los Estados Unidos Mexicanos, 1996).



Figura 18- Maceración de *L. edodes*.



Figura 19.- Obtención de la Tintura de *L. edodes*.

**Obtención del medicamento homeopático a partir de la tintura madre de *L. edodes*.**

Se mezclaron 10 gotas de tintura preparada a base de *L. edodes* con 90 gotas de alcohol homeopático a 90° posteriormente a la mezcla se le aplicaron 200 succiones para obtener una dinamización correspondiente a la 1ª Centesimal Hahnemanniana (CH) (Figura 20).



Figura 20.- Obtención de la 1ª centesimal Hahnemanniana de *L. edodes*.

Para el siguiente paso se mezcló en otro frasco una gota de la 1ª CH con 99 gotas de alcohol homeopático de 90° y se aplicaron de 200 succiones, obteniéndose una dinamización correspondiente a la 2ª CH (Figura 21).



Figura 21.- Obtención de la 2ª centesimal Hahnemanniana de *L. edodes*.

Una vez obtenida la 2ª CH se tomó una gota de esta última y se mezcló con 99 gotas de alcohol homeopático al 87º y se aplicaron 200 sucusiones obteniéndose la dinamización correspondiente a la 3ª CH (Figura 22).



Figura 22.- Obtención de la 3ª centesimal Hahnemanniana de *L. edodes*.

Las siguientes dinamizaciones se prepararon mezclando una gota de la dinamización precedente, con 99 gotas de alcohol homeopático al 87º, hasta obtener la 6CH y 12 CH a probar en este estudio, debido a que son potencias bajas y medias representativas del medicamento homeopático.

## **Obtención y propagación de la línea celular de melanoma B16-F0**

La línea celular de melanoma B16-F0 fue donada por el Dr. Patricio Gariglio Vidal del Departamento de Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Para la propagación de la línea celular lo primero que se realizó fue la preparación de medios y soluciones (Anexo 1).

El experimento se inició realizando la reactivación de la línea celular de melanoma murino B16-F0 para lo cual fue necesario recuperar un criotubo que contenía la línea celular antes mencionada y que se encontraba resguardado en el congelador REVCO a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por lo cual fue necesario descongelarlo en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$ , cuando estuvo casi descongelado el criotubo, se limpió con etanol al 70%, dentro de una campana de flujo laminar. Una vez realizado este paso se transfirió el contenido del criotubo a un tubo falcon de 50 ml estéril conteniendo 10 ml de medio DMEM Advance suplementado con 20% de suero fetal bovino (GIBCO, 124991), solución de antibióticos (penicilina 0.627 g y estreptomycin 1 g), con 5 ml de L-glutamina al 200 mM (GIBCO), todo bajo condiciones de esterilidad; se centrifugó a 800 RPM (revoluciones por minuto), por 10 minutos. Lo anterior se llevó a cabo para empastillar las células. Al terminar el tiempo de centrifugado se eliminó el sobrenadante con puntas para micropipeta estériles y se añadieron 5 ml de medio para resuspender la pastilla, el contenido se tomó con una pipeta y se transfirió a una a caja de cultivo de 75 cc adicionando 5 ml más de medio DMEM Advance suplementado con 20% de suero fetal bovino. Los cultivos se colocaron en una incubadora al 5% de  $\text{CO}_2$ .

Para el mantenimiento de la línea celular se recuperó con mucho cuidado el sobrenadante de la botella de cultivo de 75 cc y se desechó en un vaso de precipitado; las células que quedaron adheridas a la botella se enjuagaron con 3 ml de PBS 7.4 1X estéril. Terminado el lavado se retiró nuevamente el sobrenadante decantándolo y se le adicionó a la caja 1 ml de Tripsina al 0.05% con EDTA al 1% durante 30 segundos. Las células se despegaron y disgregaron



pipeteando varias veces. Para la inactivación de la tripsina se añadieron 10 ml de medio DMEM Advance al 20% de suero fetal bovino. La suspensión celular se distribuyó en dos botellas de 75 cc las cuales se colocaron nuevamente en la incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 37°C.

Preparación de la suspensión celular para la inoculación de ratones.

Las células se desprendieron con tripsina al 0.05% con EDTA, se lavaron 2 veces con PBS y el paquete celular se resuspendió nuevamente en PBS, la viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano; 0.4% (GIBCO, 15250-061) para esto se tomaron 20 µl de suspensión celular y se le agregó azul de tripano. El conteo celular se llevó a cabo con la cámara de Neubauer, aplicando la siguiente fórmula: No. de células por cuadrante ÷ 4 x 10,000 x factor de dilución = No. de células/ml y únicamente la suspensión con 95% de viabilidad se usó para la inoculación de los ratones C57BL/6. La suspensión celular se ajustó con PBS de tal manera que se obtuviera una concentración final de 300,000 Células/50µl.

## **Inoculación de ratones C57BL/6**

Se utilizó la cepa de ratón C57BL/6, obtenida de la Facultad de Estudios Superiores Campus Iztacala de la UNAM, sanos y libres de parásitos.

Los animales físicamente presentaron pelaje y ojos negros, extremidades finas y talla pequeña correspondiente a la edad, poseían gran motricidad y preservaron ritmo circadiano. Se les administró agua y comida a base de nutricubos a libre demanda y fueron cuidados bajo los estándares de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. En cada jaula se colocaron cinco animales por grupo experimental; utilizando como lecho viruta de madera especialmente tratada para su uso en laboratorios de experimentación animal. Las jaulas marca Uni-cage hechas con rejas de acero inoxidable con medidas de 27 x 21.5 x 12 cm y con una tapa de filtro, fueron etiquetadas con tarjetas conteniendo los siguientes datos: nombre del responsable, descripción de la cepa de ratones y edad de los mismos, fecha de inicio del estudio y grupo al que pertenecían. Se utilizaron 20 ratones machos de 5 a 6 semanas de nacidos sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Criterios de eliminación:

- Mal estado general.
- Cualquier problema físico detectable a la inspección o palpación durante el seguimiento o en el momento de la inclusión.

Se formaron 4 grupos experimentales con cinco ratones cada uno. Todos fueron depilados en el costado izquierdo usando un depilador químico 2 días antes de la inoculación; posteriormente fueron inoculados vía intradérmica con 300,000 células B16-F0 suspendidas en 50 µl de PBS. La eficacia de la inoculación se verificó por la formación de una ampolla en la piel en el sitio de la inyección posterior a la inoculación. El crecimiento del tumor se monitoreó diariamente por 31 días en todos los ratones. Se tomaron en cuenta dos tipos de diámetros y cada tumor fue medido con un calibrador tipo Vernier.

El volumen se calculó usando la fórmula  $(0.4 ab^2)$  siendo 'a' el diámetro largo y 'b' el diámetro corto (García-Hernández, 2002). Los volúmenes resultantes fueron graficados utilizando el programa Excel para análisis y presentación de resultados.

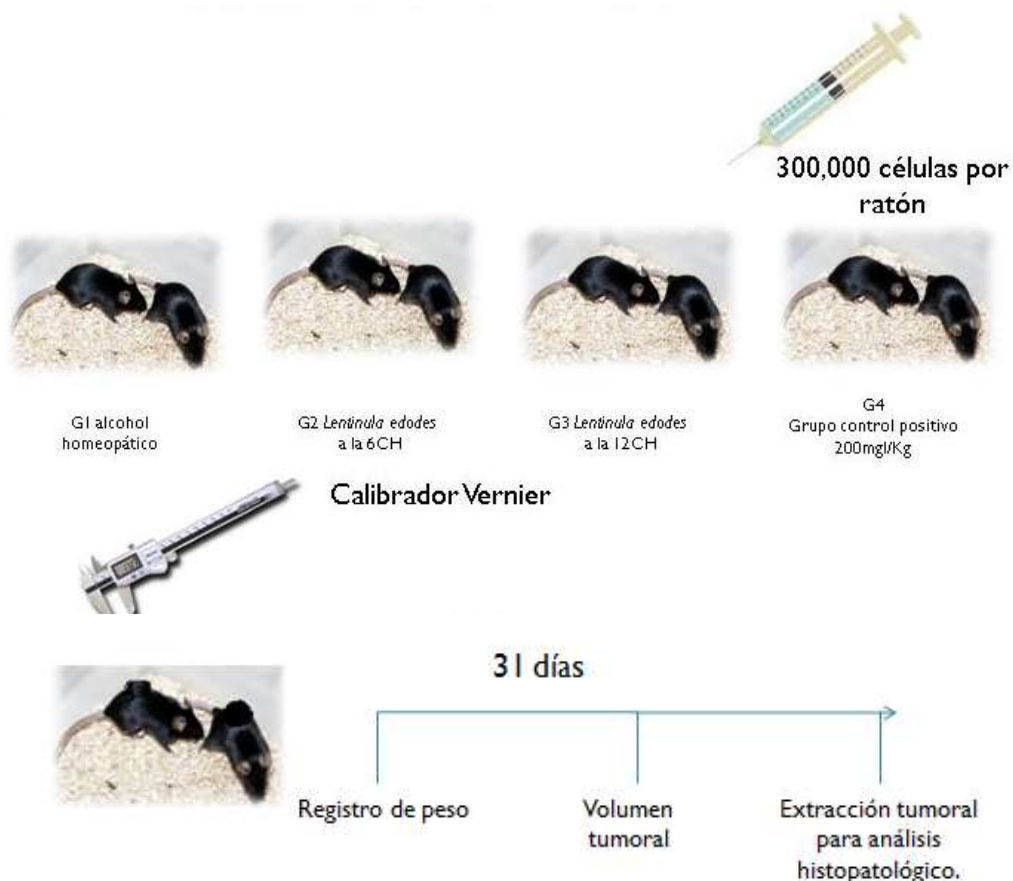


Figura 23.- Esquema de grupos experimentales.

### Administración del medicamento

Debido a que el tubo digestivo de los ratones C57/BL6 es delicado y con la finalidad de evitar eventos de vómitos o de irritación esofágica a los grupos control negativo, 6 CH y 12 CH se les administraron 5  $\mu$ l de medicamento diluidos en 5  $\mu$ l de agua destilada. Al grupo control positivo se le administraron 25  $\mu$ l vía oral de la tintura liofilizada resuspendida en agua que equivale a una concentración de 200 mg/Kg. Al grupo control negativo solamente se le administró alcohol homeopático.

Al tercer grupo se le administró medicamento homeopático preparado a base de *L. edodes* a una dinamización de 6 CH y al cuarto grupo se le administró medicamento homeopático a base de *L. edodes* a una dinamización de 12 CH. La administración de los respectivos medicamentos, tintura y alcohol homeopático, se realizó directamente vía oral en el hocico del ratón ofrecido al mismo mediante punta de micropipeta con las cantidades antes mencionadas para cada grupo durante 31 días post inoculación (Figura 23).

Los ratones fueron pesados diariamente en una balanza marca Triple beam OHAUS, siendo ésta calibrada antes de pesar a cada ratón y se registraron en tablas separadas por grupo según la medicación correspondiente a cada uno. Aunado a lo anterior, se realizó la medición tumoral con un calibrador Vernier recolectando los datos de crecimiento tumoral y registrándolos en tablas separadas por grupos. Al final del experimento se procedió a sacrificar a los animales de experimentación para la toma de biopsias, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Anexo 2).

### **Toma y estudio de biopsias**

Transcurridos los 31 días de estudio se sacrificaron los animales por dislocación cervical.

Después de verificar la muerte del animal, se fijó a la mesa quirúrgica, en posición ventral y se realizó la extracción tumoral haciendo una incisión vertical para posteriormente con una pinza mosquito curva separar el tejido por planos hasta lograr retirar el tumor en una sola pieza dejando márgenes libres de 2 a 3 mm aproximadamente (Figura 24). Las muestras se colocaron en tubos Falcón de 50 ml donde previamente se había colocado una suspensión de 15 ml de formaldehído al 10% para la fijación de las muestras, para su posterior inclusión en parafina y estudio histopatológico.



Figura 24.- Fotografía de toma de biopsia de melanoma murino.

Los tejidos fueron procesados en el Laboratorio Central de Citopatología del Hospital Regional 1º de Octubre utilizando microscopía óptica convencional, siguiendo el protocolo de inclusión en parafina y tinción con Hematoxilina-eosina.

#### Inclusión en parafina

Este procedimiento le confiere al tejido la resistencia al impacto de la navaja del micrótopo, a la vez que mantiene las diversas partes del tejido siempre en la misma posición entre sí. Este medio de inclusión permite la obtención de cortes seriados, esenciales para este tipo de estudios histológicos. El proceso de inclusión en parafina involucra tres etapas:

#### I. Deshidratación

El proceso se inició colocando el una serie gradual y ascendente del agente deshidratante. La serie fue a base a alcohol etílico con los siguientes pasos:

- 1) alcohol etílico al 70 % ----- 12 horas
- 2) alcohol etílico al 70 % ----- 12 horas
- 3) alcohol etílico al 95 % ----- 1 hora
- 4) alcohol etílico al 95 % ----- 1 hora
- 5) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ---- 1 hora
- 6) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ---- 1 a 1.5 horas.

## II. Infiltración

Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero la parafina tampoco es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina, en este estudio se utilizó el xilol al 50% de la siguiente manera:

- 1) alcohol absoluto (50%) - xilol (50%) -----1 hora
- 2) xilol (50%) -----1 hora
- 3) xilo (50%)|-----1 hora

## III. Inclusión

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. Generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente. Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por sus puntos de fusión. Estos oscilan entre 40° y 60°C, en este estudio se utilizó parafina con punto de fusión de 60° C con los siguientes lapsos de tiempo:

- 1) Primer baño de parafina-----1 a 1.5 horas
- 2) Segundo baño de parafina-----1 a 1.5 horas
- 3) Tercer baño de parafina-----30 a 60 minutos

Para la formación del bloque de parafina se emplearon moldes de plástico. El molde elegido se llenó con parafina caliente; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido y se orientó una de sus superficies (aquella que se puso en contacto con el filo de la navaja) se sumergió al interior del molde, y se le aplicó una leve presión. Después los moldes se enfriaron de inmediato introduciéndolos en el refrigerador para que la parafina se solidificara de manera homogénea.

#### Corte y montaje

En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes utilizando un instrumento mecánico denominado microtomo, para este estudio se utilizó el microtomo de rotación tipo Minot, el cual realiza los cortes desplazando el bloque mediante una manivela circular denominada volante, el mecanismo que sujeta al bloque de parafina se desplaza frente al filo de la navaja, de arriba hacia abajo y viceversa en un movimiento vertical. Los microtomos tipo Minot permiten obtener secciones delgadas, del orden de 4 a 7 $\mu$ m de espesor. Producen cortes seriados, es decir, cuando se obtiene un corte, éste queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja, los cortes se recogen cuidadosamente con unas pinzas o pinceles finos. Las secciones obtenidas se extendieron de forma aislada las cuales se adhirieron al portaobjetos para lo cual fue necesario utilizar una gota de una sustancia adherente (poli-L-lysina) preparada a una proporción de 25 miligramos de la sustancia en 25 ml de agua

destilada, y extenderla en el portaobjetos, para recoger los cortes en el porta objetos fue necesario preparar un baño de flotación mezclando, 1000ml de agua destilada 0.2 g de bicromato de potasio y 0.2 g de gelatina, El agua destilada se calienta a 60° C para disolver en ella la gelatina y el bicromato de potasio, sucesivamente. Una vez recogidos los cortes, las láminas se apoyaron en forma oblicua para que escurriera el líquido sobrante y luego se colocaron horizontalmente dentro de una estufa a 50°C por 4 horas.

## Tinción

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Para este estudio se empleó la tinción de Hematoxilina eosina.

Consiste en la tinción de:

- a) los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hemateína con lo cual los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro.
- b) el citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado.

El procedimiento de coloración que se siguió fue el siguiente:

1. se desparafinaron los cortes en
  - xilol (50%) ----- 3 minutos
2. Se hidrataron los cortes en baños decrecientes de alcohol
  - alcohol absoluto (100°) ---- 3 minutos
  - alcohol de 95° ----- 3 minutos
  - alcohol de 70° ----- 3 minutos



- agua corriente ----- 5 minutos.

- agua destilada (2 baños) ----- 1 minuto (cada uno)

3. Para la coloración con la solución de hematoxilina se utilizó la hematoxilina alumínica de Harris -----por 5 minutos.

4. Se lavó en agua destilada (2 baños) -----un minuto cada uno.

5. Para eliminar el exceso de colorante, se empleó el alcohol ácido, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células sean los únicos que permanezcan teñidos y posterior a esto se lavó con agua corriente por 2 minutos.

6. Se coloreó nuevamente esta vez con una solución alcohólica o acuosa de Eosina por 5 minutos.

7.- se deshidrato en baños crecientes de alcohol etílico

- alcohol de 70° ----- 1 minuto

- alcohol de 95°----- 1 minuto

- alcohol absoluto (100°) ----- 1 minuto

- alcohol absoluto (100°) ----- 2 minutos

8.- se aclaró empleando xilol al 50% por 2 minutos

### Montaje

Se colocó encima del corte coloreado y diafanizado una gota de resina natural (bálsamo de Canadá) diluida, en xilol al 50 %, y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, a continuación se dejó que el xilol se evaporara, para que la resina adquiriera solidez suficiente; para ello las láminas se colocaron en una platina caliente (50° C) durante 48 horas.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos arrojados de la obtención diaria de los volúmenes tumorales se utilizó el programa Excel de Office 2007. Se realizó un análisis estadístico mediante el programa SPSS versión 17 en español con una T de Student para muestras independientes. Este análisis se utiliza cuando es necesario comparar ciertas características en dos o más grupos experimentales sobre todo cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Fundamentalmente, cuando se comparan dos o más grupos de observaciones pueden darse dos tipos de diseño: aquel en el que las observaciones se refieren a dos o más grupos independientes de individuos (como en este estudio) o el caso, en el que cada serie de datos se recogen de los mismos sujetos bajo condiciones diferentes, se obtiene a partir de dicho estadístico el valor “p” (probabilidad) que describe la proporción de veces que un evento ocurre en una serie de observaciones. Para efectos de este estudio Si p es menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ) se sugiere que hay diferencia entre los tratamientos. Tomando como referencia lo anterior, se efectuó una T de Student para muestras independientes (Pértega, 2001).

## RESULTADOS

De acuerdo con el objetivo general de este trabajo, valorar el efecto que *L. edodes* tiene a dosis homeopáticas sobre el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma presentamos en primer lugar las gráficas de la evolución del peso correspondiente a cada grupo, posterior a ello se expone una tabla resumen donde se engloban los promedios de los volúmenes tumorales por grupo, junto con el resultado que arrojó el análisis estadístico, y por último los resultados del estudio histopatológico

### **Inducción de melanoma en ratones C57BL/6 por inoculación intradérmica de la línea celular B16-F0**

Como ya se describió en la metodología se inocularon 300,000 células de la línea celular de melanoma B16-F0 en los ratones C57BL/6 a los cuales se les administró de acuerdo al grupo correspondiente alcohol homeopático, tintura madre y diluciones homeopáticas 6 CH y 12CH a partir del micelio certificado por identificación morfológica de *L. edodes*, a la par se observó el desarrollo tumoral durante 31 días. Si bien el peso no es una variable a considerar en este trabajo fue importante su registro para llevar un mejor control del modelo. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron del peso diario de los ratones se presenta la evolución de peso de los cuatro grupos experimentales:

**Grupo control positivo:** Estos animales fueron tratados diariamente durante 31 días post inoculación con la administración oral de 25 µl de la tintura liofilizada a una concentración de 200 mg/kg disuelta en agua bidestilada posterior a la inoculación de la línea celular de melanoma. Los pesos oscilaron entre 15.16 g y 25.2 g alcanzando un promedio de  $19.58 \pm 1.5$ , la ganancia de peso fue gradual y constante tomando como referencia el peso inicial de cada ratón (Gráfico1).

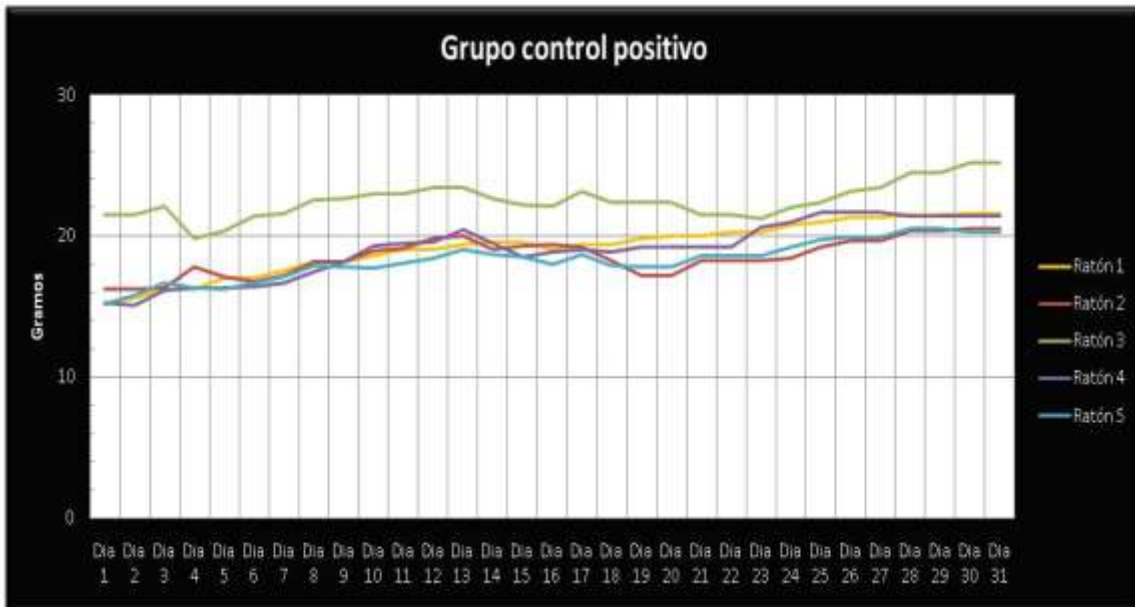


Gráfico 1.- Evolución de peso del grupo control positivo en 31 días de experimentación.

**Grupo control negativo:** A los miembros de este grupo se les administró diariamente 5 µl vía oral de alcohol homeopático diluidos en otros 5 µl de agua bidestilada durante 31 días post inoculación. Alcanzaron unos pesos que fluctuaron entre 18.6 g y 25.3 g con un promedio de  $22.54 \pm 0.8$  (Gráfico 2).

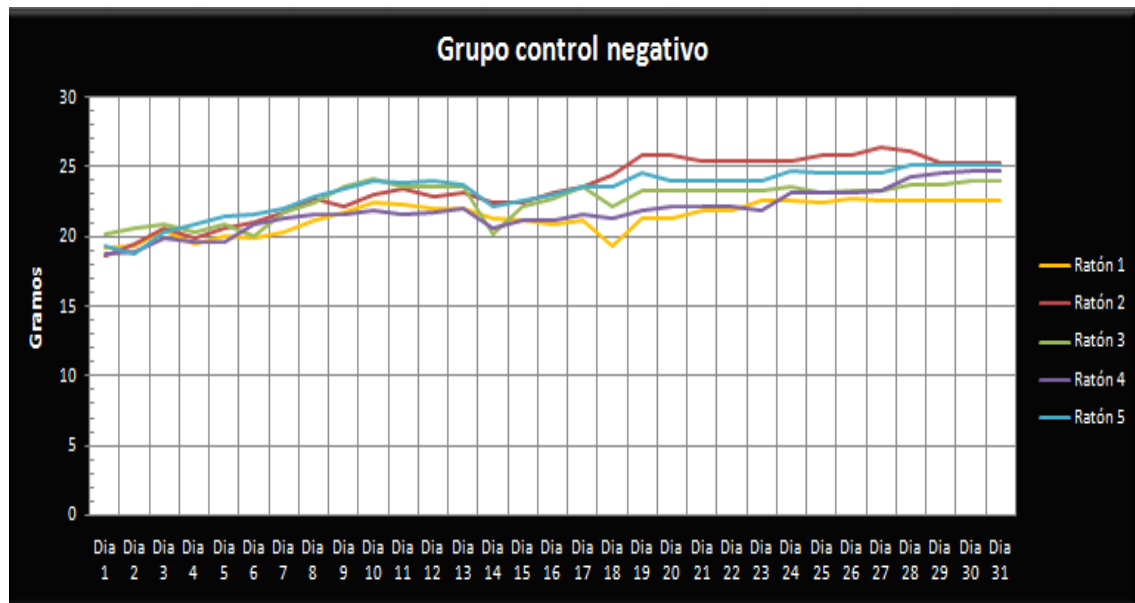


Gráfico 2.- Evolución de peso del grupo control negativo en 31 días de experimentación.

**Grupo 6CH de *L. edodes*:** A estos ratones se les administró post inoculación 5 µl vía oral de *L. edodes* preparado a la 6CH diluidos en otros 5 µl de agua bidestilada diariamente durante 31 días; los pesos estuvieron comprendidos entre 16.4 g y 27.7 g el promedio de pesos fue de  $21.1 \pm 1.5$  (Gráfico 3).

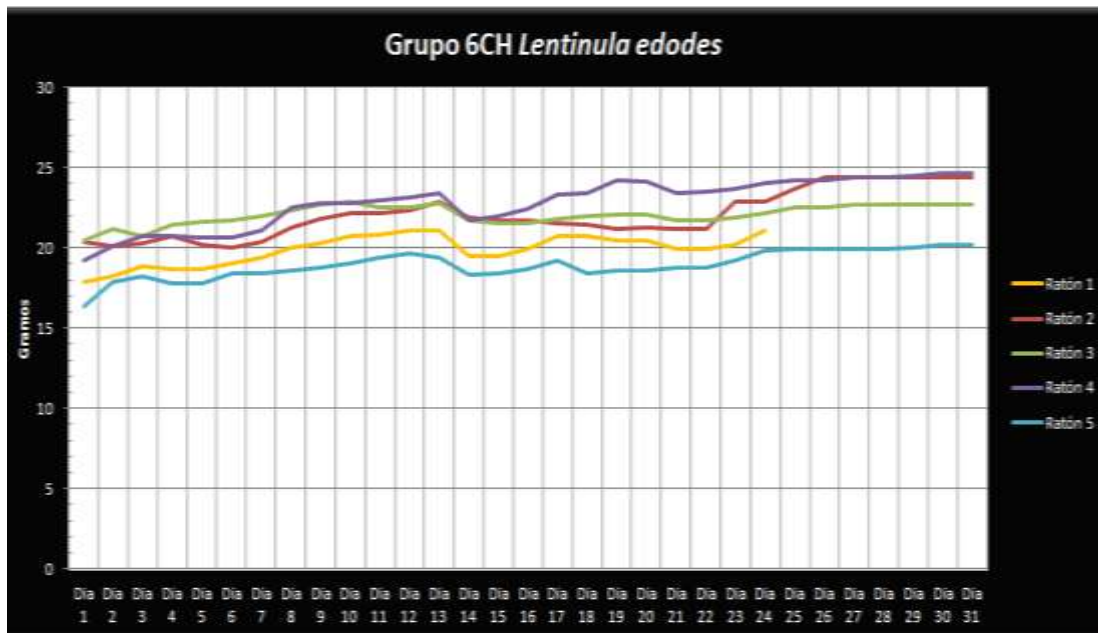


Gráfico 3.- Evolución de peso del grupo tratado con 6CH de *L. edodes* en 31 días de experimentación.

**Grupo 12CH de *L. edodes*** Este grupo fue tratado con la administración diaria de 5 µl vía oral de *L. edodes* preparado a la 12 CH diluidos en otros 5 µl de agua bidestilada posterior a la inoculación durante 31 días los pesos oscilaron entre 16.2 g y 25.5 g, el promedio alcanzado por los sujetos de experimentación fue  $21.2 \pm 2.4$  (Gráfico 4).

En el Gráfico 5 se muestran los promedios obtenidos en los cuatro grupos del peso registrado durante los 31 días de experimentación. En términos globales el promedio de peso alcanzado por los 20 ratones sujetos a experimentación fue de  $20.90 \text{ g} \pm 1.11$ , lo cual indica que el 68% de ellos alcanzaron pesos que variaron entre 19.79 g y 22.01 g.

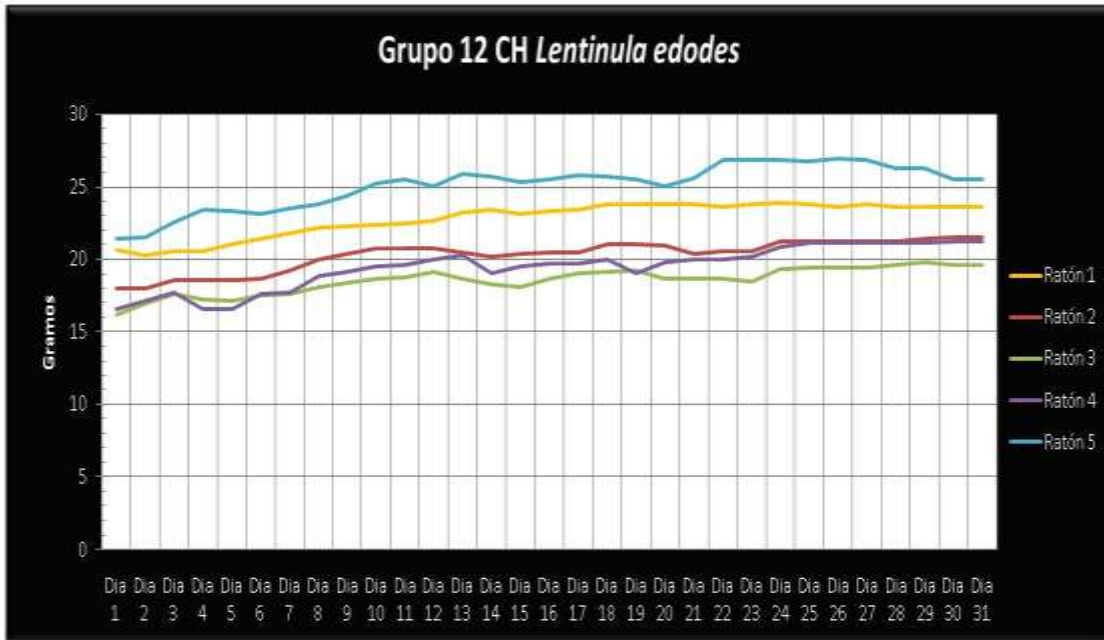


Gráfico 4.- Evolución de peso del grupo tratado con 12CH de *L. edodes* en 31 días de experimentación.

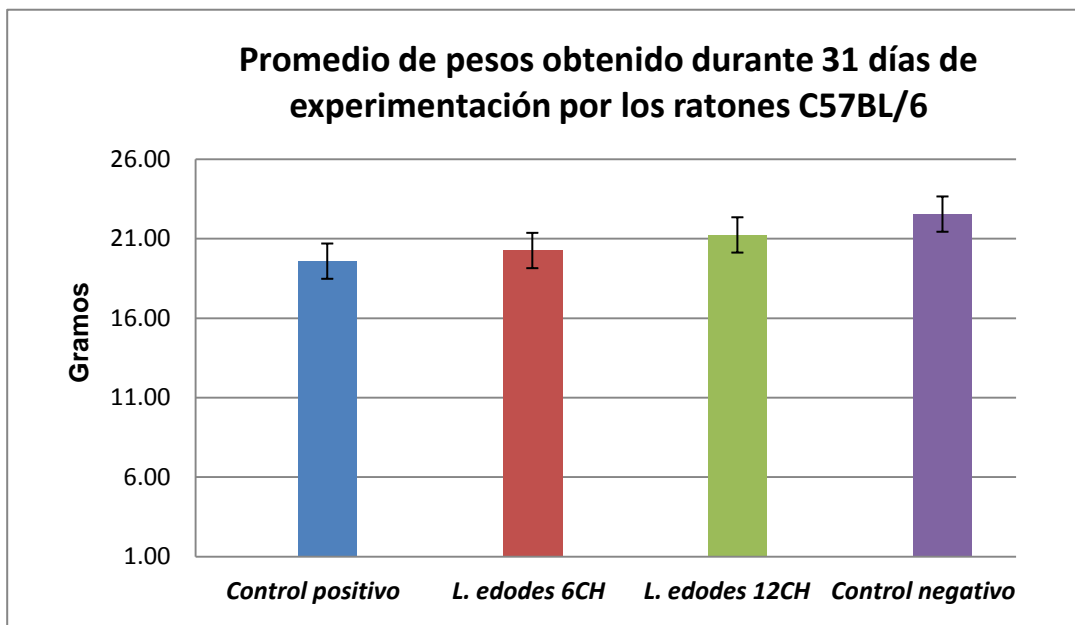


Gráfico 5.- Promedio de pesos alcanzados por los diferentes grupos experimentales de ratones C57BL/6 durante 31 días experimentales post inoculación de la línea celular de melanoma B16-F0 (Datos representados  $\pm$  SD).

## **Evolución del efecto medicamentoso de *L. edodes* a dosis homeopáticas sobre el crecimiento tumoral de melanoma en ratones C57BL/6**

Se obtuvieron las mediciones tumorales diarias (Tabla 2) a partir de la fórmula ( $0.4 ab^2$ ). El registro del crecimiento tumoral se comenzó a partir del día doce post inoculación debido a que hasta ese entonces fue físicamente perceptible la presencia de tumores, evitando así fallas en el uso del calibrador Vernier.

Posteriormente, para evaluar los efectos que las dinamizaciones 6 CH y 12 CH de *L. edodes* tuvieron en comparación con los resultados del grupo control positivo y control negativo, se muestra la siguiente gráfica (Gráfico 6), la cual inicia al doceavo día, mismo en el que se mostró un crecimiento tumoral medible.

### **Mediciones tumorales de ratones C57BL/6 inoculados con células B16-F0 de melanoma**

<b>Día</b>	<b>Control + (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Control - (mm<sup>3</sup>)</b>	<b><i>L. edodes</i> 6CH (mm<sup>3</sup>)</b>	<b><i>L. edodes</i> 12CH (mm<sup>3</sup>)</b>
12	7.803	11.278	10.093	3.059
13	7.455	17.037	10.141	8.725
14	22.968	24.665	28.203	7.582
15	36.227	26.747	34.322	16.817
16	68.424	34.017	45.435	17.152
17	68.459	37.121	53.106	18.702
18	68.387	37.904	51.929	18.211
19	57.476	50.648	62.944	17.920
20	70.98	52.365	65.506	17.920
21	73.132	62.080	79.173	13.964
22	73.619	66.180	78.587	13.964
23	74.284	66.600	83.677	18.970
24	74.284	67.750	80.340	18.970
25	71.104	67.750	79.124	19.138
26	71.114	67.750	64.932	17.984
27	70.12	67.750	72.134	11.244
28	80.396	67.750	80.640	9.980
29	71.525	67.750	71.3575	9.828
30	63.195	67.750	65.942	9.828
31	63.195	67.750	66.693	9.323

Tabla 2.- Promedio de volúmenes tumorales por grupo experimental.

Para su adecuado análisis, los resultados anteriores fueron promediados y graficados por grupo (Gráfico 6). En esta gráfica se puede observar la disminución tumoral mostrada en el grupo tratado con 12 CH preparado a base de *L. edodes* en comparación con el control negativo, resultando aún más interesante la disminución en el crecimiento tumoral que muestra en comparación con el control positivo (tintura madre de *L. edodes* a una concentración de 200 mg/kg) ya que por sus antecedentes se esperaría que hubiera presentado el mejor efecto antitumoral. En esta gráfica se observa que como el grupo 12 CH inició una breve proliferación tumoral al día 15 que en sus niveles más altos no alcanzó ni siquiera los volúmenes más bajos de los otros cuatro grupos; misma que disminuyó a partir del día 26 de tratamiento hasta casi desaparecer. Al respecto, no se han encontrado publicaciones que hablen de regresión espontánea tumoral correspondientes a esta línea celular, ni en el modelo descrito, ni en otros animales de experimentación. Para el grupo control positivo se observó un crecimiento tumoral acelerado a partir del día 16, sin posibilidades de reversión. El grupo 6CH aunque menos abrupto, mantiene un crecimiento tumoral constante a partir del día 13 de experimentación. El grupo control negativo mantuvo el tamaño tumoral sin variaciones a partir del día 22.

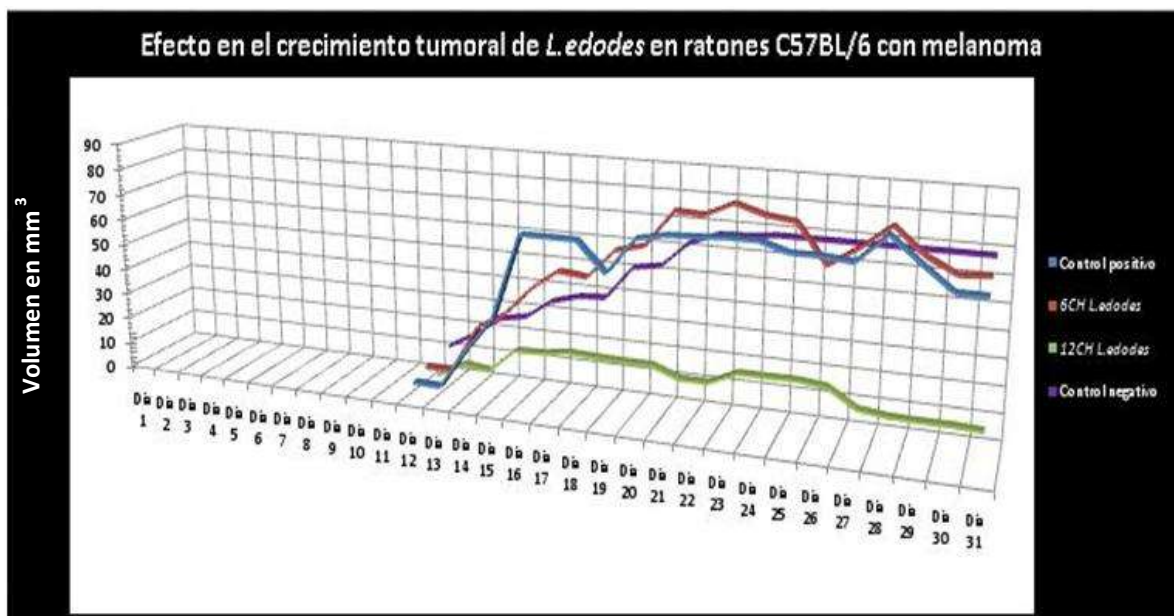


Gráfico 6.- Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en los 4 grupos experimentales.



## Análisis Estadístico

Como se mencionó anteriormente, el análisis estadístico se realizó mediante la prueba T de Student basados en el programa SPSS versión 17 en español. Para ello se tomaron los datos que se muestran a continuación que corresponden a los volúmenes tumorales diarios por ratón de cada grupo experimental (Tabla 3 a la Tabla 6). Los valores en cero del grupo 12CH de *L. edodes* corresponden a la regresión del tumor posterior a recibir el tratamiento. Los valores en cero del grupo 6CH de *L. edodes* a partir del día 25 hacen referencia a la muerte del ratón 1 y los valores en cero de este mismo grupo a partir del día 30, hacen referencia a la regresión del tumor posterior a recibir el tratamiento.

Grupo control negativo																				
	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31
Ratón 1	6.819	26.102	38.564	39.761	51.416	52.616	52.616	57.614	59.794	70.616	72.811	72.910	72.910	72.910	72.910	72.910	72.910	72.910	72.910	72.910
Ratón 2	1.974	12.110	20.304	21.522	26.600	31.623	32.653	48.710	48.687	59.623	65.866	65.866	67.920	67.920	67.920	67.920	67.920	67.920	67.920	67.920
Ratón 3	1.029	11.016	17.853	18.853	24.745	28.719	30.713	44.218	47.679	55.691	61.747	63.716	64.830	64.830	64.830	64.830	64.830	64.830	64.830	64.830
Ratón 4	11.635	19.819	22.736	29.821	39.119	40.211	40.710	52.912	54.617	62.497	66.623	66.624	67.210	67.210	67.210	67.210	67.210	67.210	67.210	67.210
Ratón 5	10.124	15.328	22.871	21.778	28.215	32.188	32.675	49.714	50.973	61.974	63.814	63.814	65.820	65.820	65.820	65.820	65.820	65.820	65.820	65.820
Promedio	11.271	17.038	24.666	26.747	34.117	37.211	37.915	50.648	52.366	62.111	66.111	66.611	67.715	67.715	67.715	67.715	67.715	67.715	67.715	67.715

Tabla 3 - Evolución del desarrollo tumoral en 31 días del Grupo control negativo

Grupo control positivo																				
	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31
Ratón 1	8.511	8.215	24.918	33.918	44.718	44.718	44.718	32.919	32.919	32.116	32.119	32.119	32.819	32.817	32.823	32.223	32.711	28.514	28.118	28.118
Ratón 2	6.912	6.572	23.875	43.817	109.989	109.990	109.639	82.819	82.889	82.211	82.856	84.789	84.789	64.123	64.123	61.753	61.714	42.123	42.112	42.112
Ratón 3	7.911	7.679	20.010	32.716	57.718	57.919	57.919	57.918	109.740	123.118	123.945	123.975	123.975	128.140	128.305	128.305	169.616	168.589	168.407	168.407
Ratón 4	6.711	6.887	23.989	34.567	49.571	49.571	49.571	34.418	35.313	35.114	35.114	35.972	35.972	35.211	35.212	33.212	33.811	28.574	15.114	15.114
Ratón 5	8.911	8.654	21.819	35.889	79.967	79.987	79.987	70.919	93.971	93.019	93.789	93.787	93.787	95.140	95.119	95.119	100.819	89.825	62.215	62.215
Promedio	7.811	7.4455	22.961	36.2275	60.4245	68.459	68.317	57.477	70.911	71.112	71.619	74.2145	74.2145	71.1145	71.114	70.1215	80.716	71.525	63.115	63.115

Tabla 4.- Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en el Grupo control positivo

Grupo 6CH <i>L. edodes</i>																				
	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31
Ratón 1	5.791	5.791	18.985	18.122	18.598	19.765	19.779	19.957	11.109	11.017	9.017	4.217	2.276	0	0	0	0	0	0	0
Ratón 2	4.362	4.392	14.942	14.452	14.352	14.532	14.612	38.979	62.109	85.141	85.041	106.835	104.872	104.862	104.978	143.979	144.919	114.131	114.274	114.889
Ratón 3	15.072	15.172	37.963	70.463	76.763	76.763	76.760	106.923	106.799	152.512	152.021	159.834	159.155	159.155	105.926	105.926	145.916	134.158	113.598	114.925
Ratón 4	9.315	9.395	43.166	43.114	89.587	125.687	125.697	125.897	125.408	125.108	124.834	124.989	122.799	122.791	104.943	104.959	107.719	107.121	101.845	103.649
Ratón 5	15.928	15.962	25.962	25.460	27.878	28.789	22.799	22.965	22.107	22.093	22.021	22.516	12.598	8.813	8.813	5.813	4.646	1.378	0.000	0.000
Promedio	10.093	10.142	28.204	34.322	45.436	53.107	51.929	62.944	65.506	79.174	78.587	83.678	80.340	79.124	64.932	72.135	80.640	71.358	65.943	66.693

Tabla 5.- Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en el Grupo 6 CH *L. edodes*

Grupo 12CH <i>L. edodes</i>																				
	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24	Día 25	Día 26	Día 27	Día 28	Día 29	Día 30	Día 31
Ratón 1	3.019	14.414	14.414	40.935	45.844	50.721	50.721	53.533	53.533	41.382	41.382	48.932	48.932	48.932	42.244	30.113	29.113	29.113	29.113	29.758
Ratón 2	2.224	10.829	6.516	20.971	20.971	23.850	23.850	18.967	18.967	11.345	11.345	16.925	16.925	16.970	17.889	9.010	4.010	3.752	3.752	0.000
Ratón 3	3.423	11.943	11.543	18.943	18.943	16.489	17.1	17.1	17.1	17.1	28.991	28.991	29.789	29.789	17.100	16.278	16.278	16.278	16.278	16.850
Ratón 4	3.471	3.258	2.258	2.131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ratón 5	3.162	3.182	3.182	1.112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	3.060	8.725	7.583	16.888	17.152	18.703	18.212	17.930	17.920	13.965	13.965	18.970	18.970	19.138	17.984	11.245	9.880	9.829	9.829	9.323

Tabla 6.- Evolución del desarrollo tumoral en 31 días en el Grupo 12 CH *L. edodes*

Se compararon los resultados de los grupos entre sí para obtener una significancia bilateral. Los grupos terapéuticos que fueron expuestos son el grupo 6CH de *L. edodes* y 12 CH de *L. edodes* entre sí y contra los grupos experimentales restantes, arrojando que la mayor significancia fue obtenida por el grupo 12 CH de *L. edodes* que correspondió a un valor de  $p= 0.00003$  (Tabla 7).

Grupos experimentales	Prueba T para la igualdad de medias		
	t	gl	Significancia (bilateral) o p
<i>L. edodes</i> 12CH Vs <i>L. edodes</i> 6CH	-2.455	7	0.04376
<i>L. edodes</i> 12CH Vs Control positivo	-1.756	8	0.11718
<i>L. edodes</i> 12CH Vs Control negativo	-8.287	8	0.00003
<i>L. edodes</i> 6CH Vs Control positivo	0.416	7	0.69006
<i>L. edodes</i> 6CH Vs Control negativo	0.605	7	0.56407

Tabla 7.- Resultados de la prueba T de Student para muestras independientes. En el lado izquierdo se muestran los grupos experimentales. Del lado derecho se muestra a “t” que representa el resultado de la comparación de las dos medias expuestas entre sí. “gl” representa el número de grados de libertad que caracterizan la distribución de los datos. La significancia bilateral (comparativa de 2 grupos) representada por el “p” valor.

La distribución T de Student arroja valores acumulados de izquierda a derecha, por lo que se pueden obtener valores tanto negativos como positivos con respecto a la media. En este estudio los datos representados en la columna “t” con valores negativos significan que el promedio de volúmenes de la muestra es menor que el promedio de volúmenes de la población, por consiguiente en el caso de los valores positivos se aplica el razonamiento contrario. Una vez obtenidos estos datos como resultado de la comparación de las 2 medias muestrales expuestas entres si, especificadas por la primera columna donde se muestra que grupos fueron comparados, se procede a convertir el valor de “t” en un intervalo de confianza, para lo cual es necesario calcular la significancia o “p”, lo anterior se lleva a cabo localizando el valor de “t” en la tabla de valores críticos, para lo cual se utilizan los grados de libertad representados en la tercera columna “gl” que corresponden a un entero que indica el numero de grados que caracterizan la distribución. En éste trabajo el resultado de la acción anterior demostró que según la “p” mostrada por cada grupo comparado, las únicas estadísticamente significativas, fueron las obtenidas por el grupo de *L. edodes* 12 CH contra el grupo de *L. edodes* 6CH con una significancia de 0.04376 que corresponde a un intervalo de confianza del 94% y por el grupo de *L. edodes* 12 CH contra el control

negativo (alcohol homeopático) con una significancia de 0.00003, que se corresponde con un intervalo de confianza del 99.9% (González, 1991).

### **Análisis Histopatológico**

De acuerdo con el análisis histopatológico, los grupos experimentales presentaron los siguientes datos arrojados por la tinción por Hematoxilina-eosina de las biopsias tomadas hacia el final de la experimentación:

#### **Grupo control Negativo (alcohol homeopático)**

Las muestras histológicas correspondientes a este grupo fueron fragmentos con un tamaño entre 0.5 cm y 0.7 cm, con una forma irregular, blandos, con una variación de colores entre café claro y oscuro y con algunas zonas hiperpigmentadas. Se identificó lesión localizada en dermis reticular constituida por células neoplásicas epitelioides, grandes, con citoplasma irregular, núcleos ovoides, algunos irregulares con núcleos prominentes y mitosis atípicas frecuentes, algunas de estas células cuentan con pigmento melánico en su citoplasma. Las células observadas correspondían a un melanoma epiteliode pigmentado con una localización en dermis reticular que incluso alcanzó a infiltrar músculo esquelético, sin identificación de angio /neuro invasión. Por todas estas características se obtiene una clasificación de Clark grado V y un Breslow de 0.7 mm. Finalmente se observó foco microscópico con células correspondientes por su morfología a un melanoma fusocelular pigmentado (Figura 25) (Figura 26)

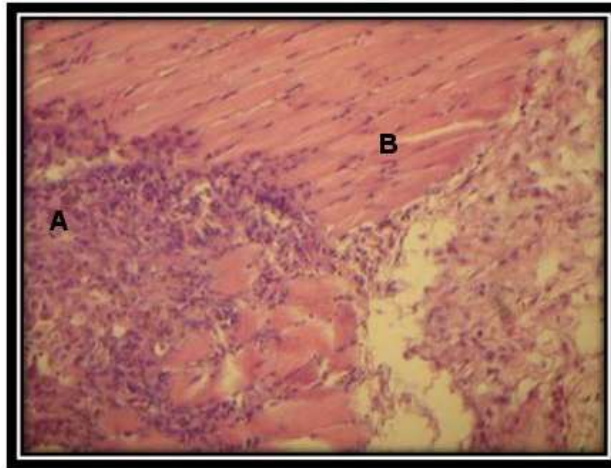


Figura 25.- Fotografía con aumento 20x que muestra la infiltración del músculo esquelético teñido de color rosado (B). Células tumorales correspondientes a melanoma epitelióide pigmentado teñidas de color morado, se le denomina epitelióide porque sus características morfológicas se asemejan a las de la epidermis (A).

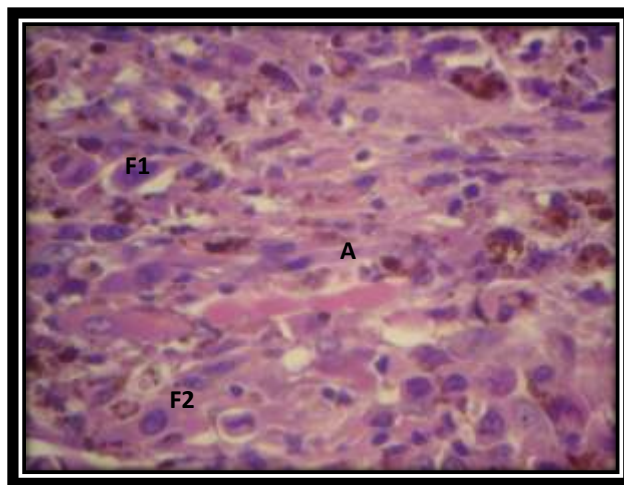


Figura 26.- Fotografía con aumento 20 x que muestra células correspondientes a melanoma con un patrón fusocelular pigmentado (A). El término fusocelular hace referencia a que las características morfológicas de la célula tienen apariencia de huso. El núcleo está teñido de color morado oscuro (F1) y el citoplasma de color morado claro (F2).

### Grupo control positivo (tintura de *L. edodes*)

En este grupo el tamaño de los fragmentos obtenidos fue de entre 0.3 cm y 0.5 cm, con una morfología irregular, con una textura blanda de color café claro y oscuro. En algunas pequeñas zonas se observó una fuerte pigmentación melánica. Al observar las muestras en el microscopio se identificó la lesión al nivel de la dermis reticular constituida por células neoplásicas epitelioides grandes con citoplasma irregular, núcleos ovoides, algunos irregulares con núcleos prominentes y mitosis atípicas frecuentes, algunas de estas células con pigmento melánico en su citoplasma. Por su arquitectura celular lo anterior corresponde a un melanoma nodular localizado en dermis reticular. No se identificó angio / neuro invasión alcanzando un Clark nivel III y un Breslow de 0.7 mm (Figura 27).

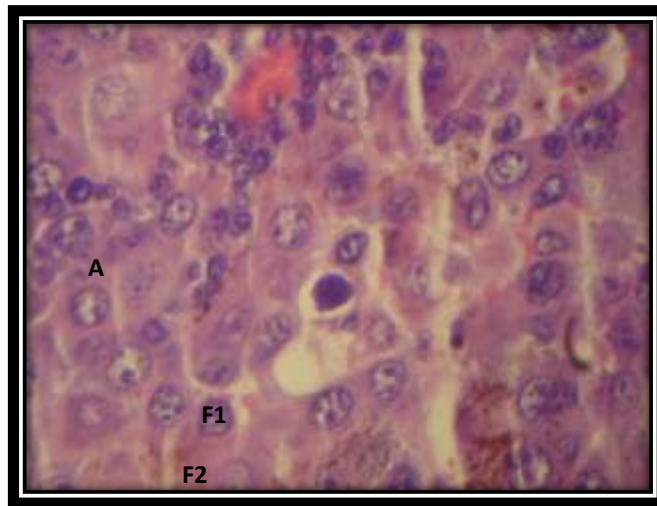


Figura 27.- Fotografía con aumento 20x que muestra células tumorales correspondientes a melanoma con un patrón nodular(A), este patrón hace referencia a que la arquitectura celular tiene forma de nódulo o circular. El núcleo (F1) está teñido de color morado oscuro y el citoplasma (F2) de un color más claro.

### Grupo 6CH a base de *L. edodes*

De este grupo experimental se obtuvieron fragmentos que alcanzaron un tamaño con un rango entre 0.5 cm y 0.6 cm, todos ellos presentaron una forma irregular, de blandos, de color café claro y oscuro e hiperpigmentados. Al observarlos al microscopio se identificó la epidermis con lesión en dermis reticular constituida por células neoplásicas epitelioides grandes con citoplasma irregular, núcleos ovoides, algunos irregulares con núcleos prominentes y mitosis atípicas frecuentes, además de pigmento melánico en su citoplasma. Histológicamente la estructura celular correspondió a melanoma epiteliode pigmentado, localizado en dermis reticular, sin angio/neuro invasión. Este fue el único grupo que presentó necrosis tumoral en un 45% de las muestras alcanzando un Clark nivel III y un Breslow de 0.7 mm, además de un foco microscópico en dermis reticular de células neoplásicas (Figura 28).

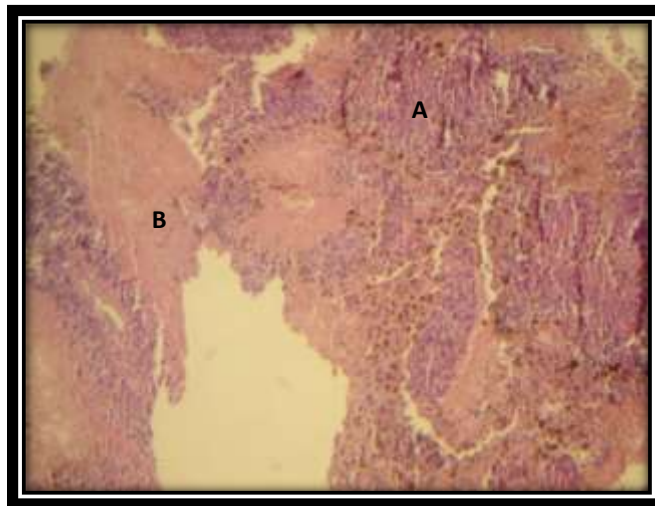


Figura 28.- Fotografía con aumento 10x que muestra células tumorales correspondientes a melanoma con un patrón epiteliode teñidas por hematoxilina en color morado (A) con presencia de necrosis tumoral en un 45% (B) mostradas en color rosa pálido por la eosina.

## Grupo 12CH a base de *L. edodes*

De este grupo se obtuvieron fragmentos de entre 0.1 cm y 0.5 cm, con bordes irregulares de textura blanda, con un color igual al de los demás grupos correspondiente a café claro y oscuro e hiperpigmentadas. A la microscopia se identificaron la epidermis con mínima lesión en dermis reticular constituida por células irregulares, grandes, núcleos ovoides y pocas células con pigmento melánico en su citoplasma. Histopatológicamente el diagnóstico arrojó que la piel y anexos obtenidos se encontraron sin evidencia de neoplasia, añadido a esto se observaron escasos macrófagos con pigmento melánico (melanóforos) sin evidencia de células neoplásicas así como también un foco microscópico de células pigmentadas compatibles con melanoma (probablemente melanóforos) (Figura 29) (Figura 30).

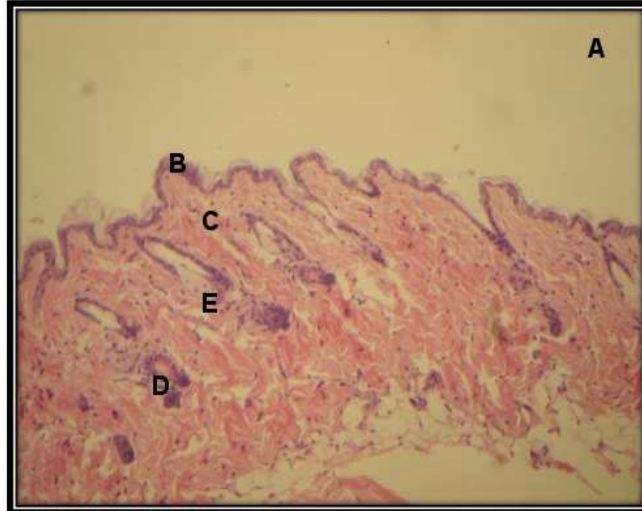


Figura 29.- Fotografía con aumento 10x que muestra piel y anexos sin evidencia de células neoplásicas (A), epidermis (B), dermis (C), folículo piloso (D), glándula sebácea(E).



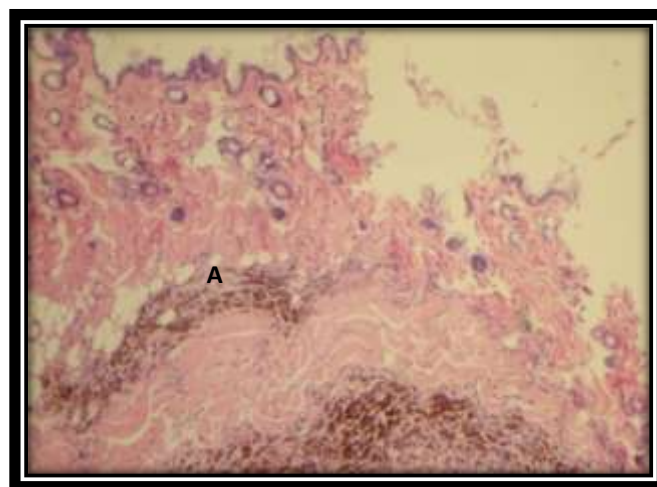


Figura 30.- Fotografía con aumento 10x que muestra macrófagos escasos con pigmento melánico (melanóforos) (A) sin evidencia de células neoplásicas.

Grupos experimentales	Niveles de Clark	Índice de Breslow
Control negativo (alcohol)	Clark V	0.7 mm
Control positivo (tintura)	Clark III	0.7 mm
<i>L. edodes</i> 6CH	Clark III	0.7 mm
<i>L. edodes</i> 12CH	Sin evidencia de células neoplásicas	Sin evidencia de células neoplásicas

Tabla 8.-Concentrado de diagnósticos histopatológicos obtenidos por los diferentes grupos experimentales

## DISCUSIÓN

El *L. edodes* siendo un hongo que tiene antecedentes importantes por sus propiedades medicinales, ha sido utilizado como tratamiento contra diferentes enfermedades que incluyen diversos tipos de cáncer como sarcoma, adenocarcinoma y melanoma; enfermedades infecciosas como el Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida, gingivitis, entre otras, y enfermedades inflamatorias agudas y crónicas como la esteatosis hepática y dermatitis. Además ha sido blanco de estudio por distintos grupos de investigación (Chihara, 1970; Hatvani, 2001; Gu, 2005; Fu, 2011) quienes han determinado que el principal componente del hongo es el polisacárido lentiniano, el cual es el que posee las propiedades anticancerosas atribuidas a este hongo e incluso se ha sugerido que su acción es selectiva.

En este estudio se ha evaluado el efecto que el hongo *L. edodes* ejerce sobre el melanoma murino posterior a la inoculación de células tumorales B16 - F0, observando que incluso a dosis infinitesimales manifestadas por la dinamización 12 CH del hongo antes mencionado conserva sus propiedades antitumorales e incluso estas se potencian comparando su efecto con la tintura madre de mismo hongo.

Como parte de los resultados, con respecto a la valoración de pesos diarios de cada uno de los grupos experimentales, se observó que mantuvieron una ganancia de peso constante conforme al crecimiento y desarrollo de los murinos; sin embargo el grupo correspondiente al control positivo fue el que obtuvo la menor ganancia de pesos, a lo que el grupo de trabajo atribuyó a una intoxicación medicamentosa por la tintura del hongo *L. edodes*. Si bien publicaciones anteriores no han reportado concentraciones tóxicas del hongo para el humano, en murinos podría ser diferente. En otras palabras, podría deberse a la experimentación de la tintura de *L. edodes*, siguiendo el precepto mencionado por el maestro Hahnemann “Lo que una sustancia causa a grandes dosis, es curado a

pequeñas dosis”, frase que es comprobada gracias a la actividad terapéutica de la dinamización 12 CH de *L. edodes*.

Referente al crecimiento tumoral, y como ya se mostró en los resultados, los volúmenes alcanzados por el Control negativo fueron mayores en comparación con los otros grupos experimentales, debido a que el tratamiento administrado fue únicamente alcohol homeopático (Gráfico 6). Para reforzar tal efecto, las investigaciones del Dr. Roberto Mendiola Quezada de 1998 afirman que el alcohol homeopático no causa ningún efecto terapéutico, siendo éste inerte e incapaz de dar sintomatología alguna durante la experimentación pura ni al momento de la utilización terapéutica, sirviendo únicamente como auxiliar en la preparación de los medicamentos homeopáticos (Mendiola,1996), lo cual es consistente con lo observado en este estudio, ya que el crecimiento tumoral que inicialmente tuvo un incremento paulatino iniciando el día 12 post-inoculación, alcanzó su meseta para el día 22 y se mantuvo hasta el día 31 en que se decidió terminar el estudio.

Si bien el modelo experimental utilizado, únicamente contempla la medición superficial del tumor en base al cálculo del diámetro menor y mayor del mismo mediante la fórmula  $((0.4) ab^2)$  (García-Hernández, 2002), es interesante observar que el melanoma, al ser un tumor que crece tanto radial como verticalmente, muestra sus verdaderos efectos al realizarse el análisis histopatológico, donde se observa la profundidad y extensión de la lesión. Al respecto, los resultados de la microscopía óptica sugieren que en realidad los tumores del grupo control negativo continuaron su crecimiento, aun cuando este no fue percibido superficialmente, cambiando su trayectoria y profundizándose para incluso llegar a infiltrar músculo esquelético obteniendo el diagnóstico clínico más grave con un Clark nivel V y un Breslow de 0.7mm (Tabla 11).

Esta comparación arroja una nueva perspectiva de la funcionalidad de la dinamización 6CH de *L. edodes* en comparación con el grupo control negativo, ya que en la medición de volúmenes tumorales se observó una conducta similar en ambos grupos; sin embargo, los cortes histológicos revelaron un mayor espesor y profundidad del daño y crecimiento tumoral en el grupo tratado con alcohol

homeopático, a diferencia de la 6CH, que aunque no detuvo el desarrollo de melanoma, manifestó menor daño.

Al respecto, se observó que el grupo 6CH de *L. edodes* alcanzó volúmenes muy parecidos al control negativo e incluso superó su volumen tumoral entre los días 20 y 28 de experimentación (obteniendo para el día 20 una  $SD \pm 6.5$  y para el día 28 una  $SD \pm 6.4$ ). El análisis histopatológico confirma el crecimiento acelerado ya que el grupo 6CH mostró necrosis tumoral hasta en un 45% debido a la proliferación súbita de células, lo que causó falta de irrigación y consecuentemente necrosis. Atribuimos este efecto a que la dinamización 6CH de *L. edodes* sólo despertó la acción primaria del medicamento, recordando que en el parágrafo § 63 del Organon del Arte de Curar escrito por el Dr. Samuel Hahnemann, menciona que todo agente que obra sobre la vida y produce cierta alteración en la salud por un tiempo determinado, recibe el nombre de acción primaria. A este estímulo, la fuerza vital intenta oponer su propia energía, esta reacción de resistencia, genera de nuevo la condición de salud o acción secundaria (Hahnemann, 1921).

Creemos que la dinamización 6CH no fue suficiente para estimular la acción curativa de la fuerza vital de los ratones como para generar en ellos las condiciones necesarias de equilibrio. Tal pareciera que se manifestara en este grupo murino una agravación medicamentosa que de acuerdo al organon escrito por el maestro Samuel Hahnemann comentado por el Dr. Flores Toledo en el año 1997 haciendo referencia a los párrafos 156, 157, 158 y 246, corresponde a todo aquello que puede surgir a la administración de un remedio bien indicado, especialmente con el uso de las preparaciones centesimales, refiriéndose a un empeoramiento de los signos y síntomas que se experimentan al momento. Esto nos recuerda la lógica de la Homeopatía donde se muestra que lo que a grandes dosis produce una sustancia, esta misma lo curará a pequeñas dosis (Flores, 1997).

Si al grupo 6CH lo comparamos con el grupo control positivo, obtenemos una actividad medicamentosa completamente diferente. Mientras que la tintura mostró un crecimiento tumoral uniforme del melanoma, las variaciones que se observaron

en el grupo 6CH fueron completamente distintas y, aunque mostraron los mismos volúmenes tumorales y sus diferencias estadísticas no fueron significativas, clínicamente el grupo 6CH se manifestó más reactivo e inquieto, además de presentar crecimientos tumorales acelerados, mismos que solían disminuir de un día para otro y volver a crecer en la misma o mayor dimensión, los mismos que anteriormente se relacionaron con la necrosis tumoral.

Los resultados obtenidos al final de este experimento sugieren que la propuesta terapéutica de mayor efectividad para el tratamiento de ratones C57BL/6 con melanoma fue la correspondiente a la dinamización 12 CH de *L. edodes*, la cual arrojó resultados significativos en comparación con los grupos experimentales restantes. El éxito alcanzado por esta dinamización se sugiere como resultado de la subsecuente estimulación de la acción curativa de la fuerza vital, en respuesta al estímulo energético ejercido por esta potencia, manifestando la acción secundaria del medicamento.

Es importante mencionar que la elección de las dinamizaciones 6CH y 12 CH, se debieron a que en base a las investigaciones realizadas por Mendiola Quezada en 1988 y considerando las dosis infinitesimales como uno de los postulados básicos de la medicina homeopática, sirvieron para realizar una comparativa de la funcionalidad, en este caso, de dinamizaciones en las que aún se considera hay materia y una 12CH en la que según el autor, ya no la hay.

En matemáticas lo infinitesimal se entiende como una cantidad infinitamente pequeña, sólo concebible, precisamente, por los métodos matemáticos, o bien una parte muy pequeña de algo; es decir, una cantidad variable tan diminuta que tiende a cero, y aún algo tan sumamente pequeño que no puede ser pesado o medido por los medios usuales conocidos. Según la fisicoquímica este límite se sobrepasa cuando se alcanza el número de Avogadro que marca el límite de divisibilidad molecular de la materia, diciendo que en nuestras diluciones ya no hay más que el vehículo solvente, pues la molécula de la sustancia medicamentosa habrá desaparecido ocurriendo lo anterior cuando alcancemos la

desconcentración equivalente a  $1/10^{23}$ , es decir la dinamización 23 X (decimal) que equivale a una 12CH (Centesimal Hahnemanniana).

Estadísticamente la acción antitumoral de los grupos que resultaron significativos fueron *L. edodes* 12CH en comparación con el grupo control negativo y *L. edodes* 12CH comparado con *L. edodes* 6CH. Para los objetivos de este estudio, los valores de “p” obtenidos son congruentes con nuestras aseveraciones (Tabla 7).

Si bien el objetivo de este trabajo no fue medir la velocidad de crecimiento tumoral, se observó un crecimiento tumoral más lento en el grupo tratado con la 12 CH de *L. edodes*, que quizás fue debido a que en su composición, no existiendo moléculas como en el caso de la 6CH, actuó de una manera más profunda y dinámica sobre el organismo de los ratones evitando el desarrollo tumoral.

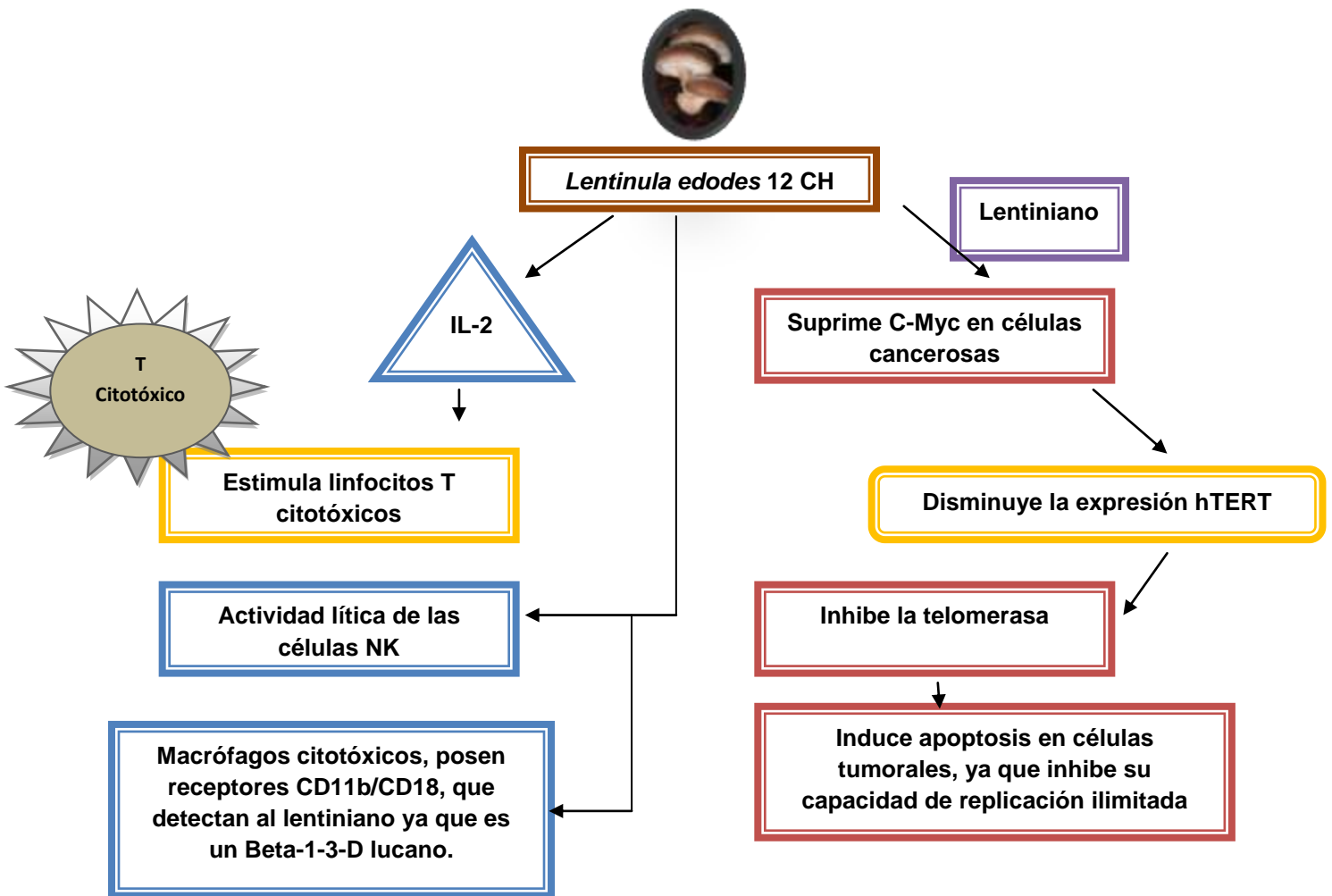
Según los artículos científicos consultados, el mecanismo de acción por el cual *L. edodes* ejerce su efecto antitumoral, descartando que el lentiniano tenga actividad citotóxica directa sobre la multiplicación celular, su efecto antitumoral es por potenciación de los mecanismos de defensa del huésped. En modelos *in vitro* se demuestra el aumento de linfocitos T citotóxicos inducido por liberación de Interleucina 2 (IL-2) cuando se administra lentiniano. El tratamiento de ratones trasplantados con tumores singénicos permitió examinar la citotoxicidad por medio de las células NK (Natural Killer) y se comprobó que la capacidad lítica de éstas también aumenta. Podemos decir que la potenciación de los mecanismos de defensa por suministro de lentiniano implica la inducción y generación de linfocitos citotóxicos, macrófagos y actividad NK (Suzuki, 1994).

Sreenivasulu y cols. en el 2011 realizaron un estudio donde observaron que el lentiniano inhibe la actividad de la telomerasa al modular la expresión de hTERT (transcriptasa reversa de la telomerasa humana) a través de la supresión del proto-oncogen *C-myc*, lo que resulta congruente con el hallazgo de Gu en el 2005 donde observaron la formación de cuerpos pro-apoptóticos en células de carcinoma murino de piel (CH72) sometido a tratamiento con *L. edodes*, por lo cual intuyeron que el mecanismo por medio del cual *L. edodes* disminuyó la

viabilidad de las células antes mencionadas fue debido al mecanismo de apoptosis (Sreenivasulu *et al*, 2011).

Aun falta mucho trabajo por hacer, sin embargo este estudio demuestra una vez más la funcionalidad de los medicamentos homeopáticos en modelos *in vivo*, dando nociones de los posibles mecanismos mediante los cuales la Terapéutica homeopática ejerce su función. Al respecto se propone el siguiente esquema de acción terapéutica para la dinamización 12CH de *L. edodes* en este modelo murino de melanoma, cuya comprobación requerirá nuevas investigaciones en conjunto con otra visión acerca del abordaje científico de la Homeopatía.

**Esquema de acción terapéutica para la dinamización 12CH de *L. edodes* en un modelo murino de melanoma**



## CONCLUSIÓN

- *L. edodes* a una dinamización homeopática correspondiente a la 12 CH tuvo el mejor efecto antitumoral en comparación con los 3 grupos experimentales restantes.
- Los resultados obtenidos por el grupo de la 6CH de *L. edodes*, obedecen a una agravación medicamentosa, corroborada por el estudio histopatológico.
- El alcohol homeopático (control negativo) no posee por si solo un efecto terapéutico, demostrado por el melanoma desarrollado en este grupo, el cual se profundizó hasta llegar a musculo esquelético, alcanzando el nivel clínico más grave de un Clark V.
- Si bien el *L. edodes* por el momento no está considerado como un medicamento homeopático, al ser procesado y dinamizado de una manera homeopática, potenció sus propiedades antitumorales, demostrando que la homeopatía puede llegar a ser una terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer.
- Respaldándonos en los resultados histopatológicos de los ratones machos C57BL/6 y tomando como base el efecto terapéutico a dosis infinitesimales, aunado a los reportes previos del hongo, podemos sugerir que *L. edodes* a una dinamización homeopática 12CH, disminuye significativamente el volumen tumoral de melanoma murino e incluso inhibe su crecimiento induciendo su regresión



## PERSPECTIVAS

Para ampliar los resultados obtenidos en esta investigación y corroborar alguno de los mecanismos de acción de *L. edodes* 12 CH, será necesario realizar otros estudios de genómica y proteómica.

Se sugiere repetir el estudio con una muestra > 5 por grupo a fin de ampliar la validez estadística del estudio y probar la acción terapéutica de otras dinamizaciones del medicamento homeopático a base del hongo *L. edodes* entre ellas 30CH y 200 CH.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Reactivos

Para la propagación de la línea celular lo primero que se realizó fue la preparación de medios y soluciones para lo anterior fue necesario lo siguiente:

- 1.- Medio DMEM al 5% de suero
- 2.- Medio DMEM al 20% de suero
- 3.- Tripsina a 0.05% con EDTA
- 4.- Glutamina 200 mM
- 5.- Solución de antibióticos (Penicilina y Estreptomicina)
- 6.- Suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum Gold 500ml marca PAA)
- 7.- PBS pH 7.4 1X
- 8.- Azúlm tripano

#### Medio DMEM al 5%:

- 1 botella de 500 ml de medio Advanced DMEM al 1X marca GIBCO invitrogen.
- 25 ml de suero bovino fetal.
- 10 ml de la solución de antibióticos (Penicilina y estreptomicina).
- 5 ml de L-glutamina marca GIBCO invitrogen al 200 mM.

#### Tripsina a 0.05% con EDTA:

- Trypsin al 0.05% con EDTA al 1% marca GIBCO invitrogen.

#### L- Glutamina:

- Se pesan 5.84 g de glutamina se aforan a 200ml de agua destilada y se filtra lo que se obtiene es una concentración de 200mM.

#### Solución de antibióticos:

- Se preparan 0.627 g de penicilina y 1 g de estreptomicina. Esto se coloca en 50 ml de agua destilada, se agita por un rato hasta que se disuelva bien, se afora a 100ml, una vez hecha la solución se filtra y se alícuota en cantidades de 10 ml y se guarda en congelación.

### **Para la inactivación del suero bovino fetal:**

- La botella de suero bovino fetal se descongela pasando el envase 24 horas de su inactivación al refrigerador, ya que se haya descongelado casi completamente se deja a temperatura ambiente hasta su descongelamiento total, posteriormente se colocara a baño maría a 56° C (prendido previamente) y se deja por media hora agitando ocasionalmente; se alícuota en tubos falcon de 50 ml estériles, una vez que se tienen las alícuotas se vuelven a congelar a -20° C y cuando fue requerido se descongelo a 37° C o temperatura ambiente.

### **PBS pH 7.4 1X:**

- Para 1000ml se necesitó:
  - NaCl-8g
  - KCl-0.2gr
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-1.44g
  - KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>-0.24g
- Agregar agua dd-800ml
- Ajustar pH 7.4 C/ HCL
- Aforar a 1 litro
- Alicuotar
- Esterilizar

### **Azul tripano:**

- Trypan Blue Satain 0.4% filtrado y preparado con
  - Solución salina al 0.85% marca GIBCO número de catálogo 15250-061.

## Anexo 2

### **NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.-  
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. LILIA ISABEL OCHOA MUÑOZ, Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; artículos 4o. fracción III, 12 fracción XIV, 17 y 18 fracción VI de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 15 fracciones XXX y XXXI del Reglamento Interior de esta dependencia, y

#### CONSIDERANDO

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación formular, aplicar y, en el ámbito de su competencia, expedir las disposiciones y medidas zoosanitarias necesarias para verificar y certificar el cumplimiento de las mismas. Que es función de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, fomentar la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales de laboratorio. Que en la actualidad, la falta de planeación en la producción de animales de laboratorio, la carencia de criterios uniformes relacionados con las actividades encaminadas al cuidado, manejo y utilización de animales con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, han provocado que el cuidado, el trato y la aplicación de técnicas experimentales practicadas en estos animales, sea ejercida en forma inadecuada, representando graves daños en el bienestar de los mismos.

Que para lograr resultados confiables en la investigación científica, la docencia biomédica y el control de calidad, así como utilizar el menor número de animales posible, es necesario contar con animales de laboratorio en condiciones óptimas.

Que cuando se utilizan para fines experimentales procedimientos cuestionables, inaceptables o contrarios a los principios de ética, éstos pueden causar graves daños en el bienestar de los animales.

Que el trato y la atención inadecuada relacionada con las maniobras para la movilización de los animales de laboratorio, contribuye a elevar los factores de estrés que los hacen susceptibles a contraer enfermedades.

Que en virtud de lo anterior y como consecuencia del proceso de globalización en el que México se encuentra inmerso, es necesario establecer criterios uniformes que permitan regular eficientemente la operación de las actividades relacionadas con la producción, cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio, a fin de favorecer el bienestar de éstos, protegiendo al mismo tiempo su salud.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 6 de diciembre de 1999, se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO- 1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, iniciando con ello el trámite a que se refiere la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; razón por la cual, con fecha 18 de junio de 2001, se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos con relación a dicho proyecto.

Que en virtud del resultado del procedimiento legal antes indicado, se modificaron los diversos puntos que resultaron procedentes y por lo cual, se expide la presente Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO- 1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

**9.5.3.1.1.** Los métodos físicos de eutanasia que se incluyen son: dislocación cervical, decapitación, perno cautivo penetrante y electrocución y se pueden aplicar en las siguientes circunstancias: en animales pequeños de fácil manejo y con características anatómicas compatibles con el método seleccionado, en animales grandes de granja, zoológico o silvestres y cuando otros métodos puedan invalidar los resultados experimentales o interferir con el uso posterior de tejidos o fluidos corporales.

## BIBLIOGRAFÍA

AJCC, El Comité Estadounidense Conjunto sobre el cáncer. (2010). Sistema de Clasificación para Melanoma Cutáneo 2010. Anales de Cirugía Oncológica , 1475-1477.

Alfeirán, Ruiz, Antonio. Escobar Alfaro, Gustavo. de la Barrera Becerril, Fernando. (2005). Epidemiología del melanoma de piel en México / The epidemiology of cutaneous melanoma in Mexico. Instituto Nacional de Cancerología, 44, 74-168.

Arenas, R. (2005). Atlas dermatología diagnóstico y tratamiento tercera edición (tercera ed.). Mexico D.F. Mc Graw Hill.

Banerji, Prasanta. Campbell, Donald. Banerji, Pratip. (2008). Cancer patients treated with the Banerji protocols utilising homoeopathic medicine: A Best Case Series Program of the National Cancer Institute USA. oncology reports, 20, 69-74.

Belinky, P. Goldberg, D. Krinfeld, D. Burger, M. Rothschild, N. Cogan, U. Dosert, C. (2002). Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: its function, expression and gene structure. Enzyme and Microbial Technology, 32, 754 -764.

Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. En L. Carrillo, Microbiología Agrícola (pág. capítulo 7). Argentina: Hipertexto.

Chihara, Goro. Hamuro, Junji. Maeda, Yukiko. Arai, Yoshiko. Fukoka, Fimiko. (1970). Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinian, from *Lentinus edodes*. Cancer Research, 30, 2776-2781.

Clark, W Jr. From, L. Bernardino, Mihm, M. E. (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Research. 29, 705-27.

Comisión permanente de los Estados Unidos Mexicanos. (1996). Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos (primera edición ed.). México D.F: Instituto Politécnico Nacional.

De la Fuente, García, Alberto. Ocampo Candiani, Jorge. (2010). Melanoma cutáneo. Medigraphic. 146, 126-135.

Eucario, L. (2005). Manejo del melanoma metastásico. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán. 2, 31-32.

Fidler, Isaiah. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Research*, 35, 218-224.

Flores, Toledo, David (1997) *El organon de la medicina comentado* 1ª edición. Instituto politécnico nacional México D.F

Fu, Hong. Wen-yuan, Guo. Hao, Ying. Zheng, xin, Wang. Rui,dong, LI (2011). Inhibition of *Lentinus edodes* polysaccharides against liver tumour growth. *international Journal of the Physical Sciences*, 6, 116-120.

García-Hernández, M.L. Hernández-Pando.P.Gariglio.P.Berumen,J. (2002). Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. *Immunology*, 105, 231-243.

Gaviria, J. (2005). Melanoma actualización en su enfoque y tratamiento. *Universitas medica* , 82-93.

González, Cervera, Alfonso. (1991) *Estadística para estudiantes de medicina* (Pág 7-82) México D.F. Universidad Autónoma Metropolitana.

Gu, Yu-Huan.Belury,Martha.A. (2005). Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*.*Cancer Letters*, 220, 21-28.

Gutiérrez, Rosa Maria. Cortés, Lozano, Norma. (2007). Confrontando al melanoma en el siglo XXI. *Artemisa* , 35, 3-13.

Hahnemann, S. (1921). *Organon de la medicina del arte de curar* (Sexta edición ed.).

Hanahan, Douglas. Weinberg, Robert. (2000). *The Hallmarks of Cancer*. cell press, 100, 57-70.

Hassel, J. (2010).MGMT gene promoter methylation correlates with tolerance of temozolomide treatment in melanoma but not with clinical outcome. *British Journal of Cancer*.

Hatvani, N. (2001). Antibacterial effect of the culture fluid of *L. edodes* mycelium gown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, 17, 71-74.

Jeannin, J.Lagadec,P.Pelletier,H.Reisser,D.Olsson,N.Chihara,G.Martin,F. (1988). Regression Induced By Lentinian, of Peritoneal Carsinomatoses in a Model of Colon Cancer in Rat. *International Journal of Immunopharmacol*, 10, 855-861.

Kuttan, Girija.Preethi,KC.Kuttan,Ramadasan. (2007). Effect of homeopathic medicines on transplanted tumors in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer*, 8, 390-394.

Lam, Y.W., Wang, H.X., Ng, T.B. (2000) A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. *Biochemical and Biophysical and Research Communications* 279, 74 – 80.

Lam, S.K., Ng, T.B., 2001a. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 1071 – 1075.

Lodish, B. (2005). *Biología celular y molecular*.(Pág-973-975) Estados Unidos: Panamericana.

Martinez, S. (2007). Melanoma maligno cutáneo.estudio de características morfológicas e inmunohistoquímicas del tumor primario predictivas de metástasis en ganglio predictivas de metástasis en ganglio. universidad autónoma de barcelona facultad de medicina y ciencias de la salud, departamento de ciencias morfológicas, Barcelona.

Mendiola, Q. R. (1996). *Bases científicas de la medicina homeopática (Vol. I)*. México D.F. Instituto Politécnico Nacional.

Mendiola, Q. R. (1996). *Bases científicas de la medicina homeopática (Vol. II)*. México D.F. Instituto Politécnico Nacional.

Oei, P.M. Maas, L. Klunder, R. Thielen, D. Martínez-Carrera, L. Hsu, H. Makela & J. Peng. (2003). *Mushroom cultivation*. tercera edición. Leiden Holanda: Backhuys publishers.

OMS (2007). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. Recuperado el 1 de 05 de 2010.

Patrick, H., *et al* ., (2003). Lentinian, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom whit inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus -1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*, 73, 3363-3374.

Perez, M. H. (2010). *Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-popo,Zoquiapan y Anexos*. Montecillo,Texcoco Estado de México: Colegio de Postgraduados,SEMARNAT,CONACyT.



Pértega, D. S. (2001). Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. T de Student. Cuidados de Atención Primaria, 8, 37-41.

Quevedo Gualteros, D. M. (2010). Factores comportamentales hacia la fotoprotección. Bogotá, Colombia.

Riu, H. Roig, G Sancho, J. (1999). Degradación de corcho mediante cultivo de hongos *L. edodes* y *Ganoderma lucidum*. Barcelona: Escuela Superior de Agricultura de Barcelona.

Robbins. (2000). Patología Estructural y Funcional(pág. 1474).Mexico D.F. McGraw- HILL

Schwartz. (2000). Principios de Cirugía (pág. 2281). Mexico D.F.Mc Graw-Hill.

Sociedad Española de Oncología Médica. (27 de Abril de 2010). Sociedad Española de Oncología Médica. Recuperado el 25 de Mayo de 2011, de Sociedad Española de Oncología Médica: <http://www.seom.org/es/infopublico/info-tipos-cancer/melanoma/2345-epidemiologia>

Solomon, E. (1996). Biología de Villee Tercera edición. Mexico DF.: Interamericana McGraw Hill.

Souza-Paccola, Edneia. Bomfeti,Cleide.A.,Fávaro,Léia.,Fonseca,Inés.Paccola-Meirelles,Luzia. (2004). Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. BrazilianJourn of Microbiology, 35, 311-315.

Sreenivasulu K. Vijayalakshmi, M. Sambasiva, Rao (2011). hTERT gene inhibition studies in cancer cells by using polysaccharide lentinian. Journal of Medical Genetics and Genomics , 3, 7-12.

Stamets, P. (2001). Crecimiento y preparacion de hongos medicinales. Australia: Mycomedea productions and fungi perfecti.

Suga, Tetsuya. Shilo, Tsuyoshi. Maeda, Yukiko. Chihara, goro (1984). Antitumor Activity of Lentinian in Murine Syngeneic and Autochthonous Host and its Suppressive Effect on 3-Methylcholanthrene-induced Carcinogenesis. Cancer Research, 44, 5132-5137.

Sugano, N. (1985). Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *L. edodes* mycelia. Cancer Letters, 27, 1-6.

Suzuki, M. F. (1994). Antitumor and immunological activity of lentinan in comparison with LPS. Immunopharmacol. 16, 463-468.

Wu, Chih-Hsiung, Wu, Chi-Chen, Ho, Yuan-Soon (2007). Antitumor activity of combination treatment of *Lentinus edodes* mycelium extracts with 5-fluorouracil against human colon cancer cells xenografted in nude mice. *Journal of Cancer Molecules*, 3, 15-22.