

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Rolando Lorenzana González

Para optar por el título de

Químico Biólogo

Guatemala, Abril de 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Determinación de la actividad inmunomoduladora
de dos extractos de *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray, mediante un ensayo
linfoproliferativo *in vitro***

Rolando Lorenzana González

Químico Biólogo

Guatemala, Abril de 2009

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urízar	Vocal II
Lic. Luis Alfredo Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Aníbal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

ACTO QUE DEDICO:

A Dios

Por ser mi guía y mi fortaleza, y porque gracias a su infinita misericordia, hoy alcanzo una nueva meta en mi vida.

A mi Esposa

Iveth Liquidano de Lorenzana, por permitirme el honor de envejecer a tu lado. Eres mi motivo y mi razón, este éxito es para ti. Te amo.

A mi Padre

Rolando, gracias a tu esfuerzo y dedicación, hoy estoy aquí. Tengo la dicha de tener un papa maravilloso, y además de tener en vos un amigo con quien contar.

Todo lo que soy te lo debo a vos.

A mi Madre

Yolanda, gracias por todo tu amor y dedicación, espero que allá donde estas, te sientas orgullosa del hombre que ayudaste a edificar. Algún día nos volveremos a encontrar.

A mi Hermana

Lourdes. Por todos tus consejos y especialmente, porque siempre me has apoyado y confiado en mi.

A mi Hermano

Javier. Porque has estado siempre a mi lado y siempre he podido contar con vos. Más que un hermano, sos mi mejor amigo.

A mis Amigos

Especialmente a Osman, Abieser, Leslie, Bernarda, Irsia, Emili, Paty, Carla, Daniel, Chomin y El Gato, por todos los momentos agradables que compartimos.

A mi Familia

Con especial cariño a José, Quique, Hugo y Marcelina.

AGRADEZCO:

A la gloriosa y tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala, nuestra *alma mater*.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A mis asesoras: Lic. Margarita Paz de Ramírez y Madre Ivonne Somerkamp, quienes hicieron posible esta investigación. Gracias por todo su apoyo.

A mis Revisores: Lic. Blanca Samayoa y Lic. Armando Cáceres, por sus observaciones y correcciones que enriquecieron este trabajo de tesis.

A mis amigos Alejandro Mazariegos, Keyla Guerrero y Egly Álvarez, por su valiosa colaboración.

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Antecedentes	4
	A. Sistema Inmune	4
	B. Inmunidad Innata y Adquirida	4
	C. Respuesta Inmune	5
	D. Linfocitos	6
	1. Linfocitos B	6
	2. Linfocitos T	7
	E. Respuesta Inmune contra tumores	7
	F. Inmunomodulación	8
	G. Hongos Inmunomoduladores	9
	H. <i>Grifola frondosa</i>	10
	1. Estimulación Inmunológica y antitumoral	10
	2. Actividad antirretroviral	12
	3. Efectos Hipoglicémico	13
	4. Otras actividades terapéuticas	13
IV.	Justificación	15
V.	Objetivos	16
VI.	Hipótesis	17
VII.	Materiales y Métodos	18
VIII.	Resultados	23
IX.	Discusión de Resultados	26
X.	Conclusiones	28
XI.	Recomendaciones	29
XII.	Referencias	30
XIII.	Anexos	33

I. RESUMEN

En el estudio descrito a continuación se evaluó la actividad sobre el sistema inmune humano de dos extractos del hongo comestible *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray. Se utilizaron los extractos acuoso y etanólico obtenidos del cuerpo fructífero del hongo y se evaluó su actividad inmunomoduladora a través de un ensayo linfoproliferativo *in vitro*.

Los linfocitos fueron obtenidos a partir de sangre completa, llevándose a cabo una separación y purificación mediante centrifugación en un gradiente de densidad. Las células fueron suspendidas en medio RPMI suplementado con L – glutamina y suero bovino fetal, y ajustadas a una concentración de 5×10^6 cel/ml. Estas fueron colocadas en placas de 96 pozos donde fueron enfrentadas a cada extracto del hongo e incubadas por 4 días a 37°C en una atmósfera microaerofílica. Se realizó un recuento final de células mediante un método colorimétrico con XTT, una sal de tetrazolio que es reducida a un compuesto coloreado y soluble por la actividad enzimática mitocondrial presente en células vivas.

La investigación fue dividida en dos partes, una cualitativa y otra cuantitativa. En la primera se valoró cada extracto para comprobar si existía o no actividad, para lo cual se comparó la respuesta de cada extracto con los resultados obtenidos usando un agente mitogénico de linfocitos, como la fitohemaglutinina. En la segunda parte se determinó el porcentaje de linfoproliferación de cada extracto y se comparó para definir si existía una diferencia significativa entre uno y el otro.

Ambos extractos probaron tener actividad estimuladora para los linfocitos, mostrando el extracto etanólico mayor actividad que su par acuoso con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 1.6353^{-9}$). Esto nos permite concluir que los extractos del hongo *G. frondosa* poseen actividad inmunoestimuladora *in vitro* sobre los linfocitos humanos.

II. INTRODUCCIÓN

Los hongos han sido valorados desde hace muchos años por sus propiedades comestibles en países de Asia y Europa. En China, han sido utilizados a través de generaciones como suplementos alimenticios y como tónicos para el sistema inmune, aumentando la longevidad y la salud en general de las personas. En Japón los hongos silvestres habitan en la parte noreste, y también se pueden encontrar en restaurantes de clase alta debido a su excelente textura, sabor y aroma. En países de Europa, los hongos son altamente cotizados, debido a su amplia gama de beneficios. Para los Yoruba, un grupo del noreste de Nigeria, los hongos se han convertido en una parte importante de su mitología, así como parte de sus medicinas naturales (1).

Se conoce una gran variedad de hongos con propiedades comestibles y terapéuticas, tales como *Lentinula edodes* (Shiitake), *Hericium erinaceus*, *Auricularia aurícula*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Volvariella volvaceae* y *Grifola frondosa* (maitake), tomando este último, gran relevancia en los últimos años (1). En tiempos feudales, el maitake era considerado tan valioso que se pagaba su peso en monedas de plata. Incluso actualmente los buscadores del hongo se reservan celosamente la localización de las áreas donde crece. El maitake es muy buscado por los cocineros por su excelente sabor y textura, mientras otras personas lo valoran por sus beneficios terapéuticos (2).

Diversos principios activos con demostrada actividad antineoplásica e inmunomoduladora han sido aislados de más de 30 especies de hongos. Muchos de los principios activos micóticos se relacionan químicamente a la estructura β -D-glucano (es decir, polímeros de D-glucosa con otros monosacáridos) o β -D-glucanos enlazados a proteínas (llamados péptidos-polisacáridos o proteoglicanos). A principios de la década de los ochenta, el micólogo japonés Hiroaki Nanba, de la Universidad Farmacéutica de Kobe llegó a la conclusión que los polisacáridos del maitake tenían un estructura única y demostró que su consumo lograba un pronunciado efecto antitumoral e inmunomodulador, mayor que el de otros hongos medicinales, en modelos animales. En 1984 Nanba identificó en el micelio y cuerpo fructífero del maitake, una fracción con capacidad de estimular a los macrófagos denominada fracción-D. Posteriormente se aislaron diversos compuestos activos que han demostrado otras actividades biológicas, entre las que se destacan: actividad contra la diabetes tipo 2, hipertensión arterial, hipercolesteremia y obesidad. Sin embargo, estas propiedades todavía están siendo estudiadas, y hace falta nuevos estudios que avalen completamente las mismas (2).

Esta investigación pretendió demostrar la actividad inmunomoduladora de los extractos etanólico y acuoso de *Grifola frondosa* sobre los linfocitos humanos, a través de un ensayo linfoproliferativo *in vitro*. Con ésto se intenta aportar datos experimentales que apoyen el consumo tanto comestible como medicinal de este hongo y que proyecten la realización de estudios clínicos posteriores.

III. ANTECEDENTES

A. SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es el encargado de proteger y mantener la integridad del organismo, sus funciones básicas son: distinción entre lo propio y lo extraño, especificidad y memoria (3). Posee una complejidad, que compromete a diversos órganos y tejidos, como la sangre periférica, médula ósea, órganos linfáticos, linfocitos y células accesorias (4,5).

El cuerpo humano tiene muchas maneras de protegerse. Algunas son simplemente barreras físicas, otras son sustancias bioquímicas potentes que pueden proporcionar una protección relativamente inespecífica contra una amplia gama de microorganismos, como por ejemplo las proteínas de fase aguda, liberadas durante infecciones intensas, y que poseen propiedades antimicrobianas. Una barrera química más elaborada es la que proporciona el grupo de proteínas plasmáticas denominada complemento; estas proteínas median una cascada de reacciones enzimáticas desencadenadas por la presencia de algún microorganismo, y pueden conducir finalmente a la lisis o al aumento en la fagocitosis del invasor extraño (6).

Pero las estrategias de defensa más complejas, dinámicas y eficaces, son realizadas por células especializadas que se desplazan a través del cuerpo. En los seres humanos, hay tres grupos principales de células que proporcionan este tipo de defensa. Dos de éstas, los neutrófilos y la serie de monocitos-macrófagos, son células fagocíticas, mientras que el tercer grupo, constituido por los linfocitos, tiene poca capacidad fagocítica, pero, en vez de esto, participan en un número considerable de otras reacciones de protección que se conocen colectivamente como respuesta inmunitaria (6).

B. INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA

Siempre que un patógeno penetra el cuerpo humano, inevitablemente se enfrenta a una cascada de diversos factores que vigilan los tejidos internos. Generalmente, estas defensas internas se han agrupado en dos sistemas funcionales diferentes, basándose en si la resistencia (inmunidad) que confieren está presente desde el inicio, o si, en cambio, se desarrolla únicamente después de establecer contacto con el patógeno. La inmunidad innata o natural, se refiere a todas las medidas de resistencia congénitas que se activan y operan desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un patógeno; no requiere de exposición previa a tal agente, ni tampoco se modifica significativamente con exposiciones repetidas a dicho patógeno, opera en forma rápida e

inespecífica y pueden eliminar o controlar infecciones hasta la intervención de mecanismos más elaborados. La inmunidad adquirida se refiere a aquella, que en el primer contacto con un patógeno nuevo es débil o ausente, pero que se incrementa sustancialmente con las exposiciones subsecuentes al mismo patógeno. A pesar de que tarda más en manifestarse, ofrece como ventajas la memoria inmunológica, la actividad autorregulada eficaz y una gran especificidad y diversidad que se expresa por la capacidad de responder a los antígenos que originaron su activación (6,7).

Los sistemas inmunes innato y adquirido están compuestos por numerosos elementos. Algunos de estos elementos son células especializadas que tienen la habilidad para reconocer, secuestrar y eliminar varios tipos de microorganismos o sustancias dañinas; las defensas suministradas por tales células se conocen en conjunto como inmunidad celular. El resto de los componentes son macromoléculas solubles (generalmente proteínas) que circulan en la sangre y en el líquido extracelular, haciendo a estos fluidos (alguna vez llamados humores corporales) inhóspitos para los organismos invasores extraños, aun en ausencia de todos los tipos de células defensoras; las defensas de este tipo son denominadas en conjunto como inmunidad humoral (6).

C. RESPUESTA INMUNE

Se desencadena cuando un antígeno (cualquier agente extraño reconocido por un sistema inmune) ingresa al cuerpo y encuentra una clase especializada de células llamadas células presentadoras de antígeno, las cuales capturan una cantidad diminuta del antígeno y lo exhiben, de manera que pueda ser reconocido por linfocitos T cooperadores. Las células T cooperadoras se activan y, a su vez, promueven la activación de otros tipos de linfocitos, como las células B o las células T citotóxicas. A continuación, los linfocitos activados proliferan y realizan sus funciones secretoras específicas. En cada etapa de este proceso, los linfocitos y las células presentadoras de antígeno se comunican entre sí a través de contacto directo o mediante la secreción de citocinas. Además interactúan de modo simultáneo con otros tipos celulares o con componentes del complemento, cinina o sistema fibrinolíticos, lo cual origina la activación de los fagocitos, la coagulación de sangre o el inicio de la cicatrización. La respuesta inmunitaria casi siempre es específica, y centran su fuerza total contra el antígeno mientras originan poco o ningún daño a los tejidos normales del huésped. Dicha respuesta también se controla de manera precisa y termina normalmente poco después de que se elimina el antígeno (6,8).

D. LINFOCITOS

Pueden distinguirse varios tipos muy diferentes de linfocitos con base a sus propiedades funcionales y las proteínas específicas que expresan. La diferencia más importante es la división de estas células en dos líneas principales conocidas como células T (derivadas del Timo) y células B (derivadas de la médula ósea). El linaje de células T y B se origina de un subgrupo de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea o en el hígado fetal, que se destinan a una vía linfóide de desarrollo. Son descendientes de un progenitor asignado de la médula ósea, llamado célula progenitora linfóide, que actúa como precursor común de las células tanto T como B, así como para las células NK y algunas células dendríticas (6,8).

Los linfocitos maduros que emergen del timo o la médula ósea se encuentran en estado latente o de “repose”: son mitóticamente inactivos y, aunque potencialmente son capaces de realizar división celular y funciones inmunitarias, aun no se han estimulado para realizar algunas de estas funciones. Estos tienen un periodo de vida corto, no obstante, si tales células reciben señales que indican la presencia de una sustancia extraña o un patógeno específico, pueden responder mediante un fenómeno conocido como activación, durante el cual pueden realizar ciclos sucesivos de división celular a lo largo de un periodo de varios días. Algunas de las células descendientes que se generan regresan luego al estado de reposo para convertirse en linfocitos de memoria. Los otros descendientes de un linfocito virgen activado se diferencian en células efectoras, que sobreviven sólo durante unos cuantos días, pero en dicho lapso realizan actividades defensoras específicas contra invasores extraños (6,8).

1. Linfocitos B

Se diferencian en la médula ósea, constituyen del 5 al 15% de los linfocitos circulantes. La característica celular definitiva para la línea celular B es su capacidad para sintetizar proteínas llamadas inmunoglobulinas. Cada inmunoglobulina se fija específicamente y con gran afinidad a su pequeño ligando molecular particular, que puede ser cualquiera de un gran número de determinantes químicos que se encuentran en proteínas, carbohidratos, lípidos u otras macromoléculas. Los determinantes moleculares que fijan inmunoglobulinas se denominan de manera colectiva antígenos (6,8).

2. Linfocitos T

Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, pero, en vez de esto, detecta la presencia de sustancias extrañas por medio de proteínas de superficie llamadas receptores de células T. Estas proteínas se encuentran estrechamente relacionadas evolutivamente con las inmunoglobulinas, pudiendo también reconocer antígenos, pero a diferencia de las inmunoglobulinas, los receptores de células T no se excretan, por lo que su efecto protector se ejerce únicamente a través del contacto directo. Junto con los macrófagos, los linfocitos T son los principales participantes en la inmunidad mediada por células (6, 8).

Todos los linfocitos T, expresan en sus superficies los marcadores CD2 y CD3, no obstante, sub-poblaciones diferentes que tienen funciones inmunitarias muy diversas, expresan sus propios marcadores de superficie distintivos. Los dos subgrupos de células T más importantes pueden distinguirse por dos proteínas de superficie adicionales conocidas como CD4 y CD8. La mayor parte de linfocitos T que expresan proteínas de superficie CD8 tienen actividad citotóxica, es decir, la propiedad de matar células que tengan moléculas extrañas en su superficie. Estos linfocitos son de extrema importancia en la defensa contra las infecciones virales. En contraste los linfocitos T que expresan proteínas CD4 funcionan como células T cooperadoras, promotoras de la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares (6,8).

E. RESPUESTA INMUNE CONTRA TUMORES

No se conoce con exactitud el papel que juegan los mecanismos innatos y adaptados en la respuesta contra el cáncer y, al parecer, ambas se relacionan estrechamente con la manifestación y evolución ulterior de la enfermedad. No basta limitar la falla del sistema inmunológico a un sencillo error de la inmunovigilancia contra la aparición de trastornos de proliferación celular, debe considerarse, además, que el aspecto inmunológico es sólo uno de los pilares para explicar la manifestación y evolución de la enfermedad (9).

En la respuesta antitumoral innata, se menciona, sobre todo, el papel que desempeñan los anticuerpos naturales, las células NK y los macrófagos. En la respuesta adaptativa intervienen los linfocitos T citotóxicos, y en menor medida, los anticuerpos. La activación del complemento, las citocinas con potencial citotóxico y el reclutamiento de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria, también desempeñan un papel importante en la defensa contra tumores. Por último,

episodios como la activación de mecanismos fibrinolíticos, de coagulación y de cininas son mecanismos coadyuvantes necesarios para la efectividad de la acción antitumoral (10,11).

El tumor utiliza varios mecanismos para evadir su reconocimiento y destrucción por el sistema inmunológico como: disminución de la inmunogenicidad por ausencia de antígenos expresados únicamente por el tumor, ausencia de moléculas co-receptoras, de moléculas co-estimuladoras de antígenos de histocompatibilidad, falta de regulación en la expresión de receptores celulares, modulación de antígenos en la superficie del tumor, alteración de vías de procesamiento antigénicos y trastornos en la citoadhesión que explican la inhibición y sobre-expresión de moléculas de adhesión. Otros mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria por el tumor son la modulación antigénica, la cual se explica por el cambio de antígenos de superficie según el estadio clínico de la neoplasia y la respuesta del huésped; y la expresión en la membrana de antígenos antes secuestrados. Asimismo, se sabe que los tumores producen factores que inhiben la respuesta inmunitaria del huésped como: los que retardan la migración de leucocitos y proteínas que inhiben el complemento hemolítico, activan poblaciones celulares contra supresora y reducen la citotoxicidad influida por los anticuerpos o por el complemento. Incluso existen sustancias que inhiben la liberación de granzimas y perforinas y detienen la formación y eliminación de complejos inmunitarios (9, 12, 13).

F. INMUNOMODULACIÓN

El término inmunoterapia hace alusión a la interacción de moléculas farmacológicamente activas con el sistema inmunológico, con el fin de estimular, suprimir o desensibilizar al organismo (14).

Los compuestos que son capaces de interactuar con el sistema inmune, para estimular o suprimir aspectos específicos de la respuesta del hospedero, se pueden clasificar como inmunomoduladores. La habilidad de estos compuestos para incrementar o disminuir la respuesta inmune puede depender de varios factores, incluyendo, dosis, ruta de administración, y tiempo de administración del compuesto en cuestión (15).

En la actualidad muchos inmunomoduladores se obtienen, por síntesis química o como resultado del procesamiento de cultivos de células o tejidos. Llama la atención que muchas de las moléculas que se utilizan como modificadores de la respuesta biológica en el humano proviene de microorganismos, o se encuentra de forma natural en el organismo humano que ha recibido o

no, retos antigénicos; esto, a su vez se relaciona con la diversidad y complejidad de los sistemas de inmunomodulación de los mamíferos (9, 12 – 14, 16).

Los tipos celulares envueltos en la orquestación de los aspectos específicos de la respuesta inmune innata y adquirida son bien conocidos. Sin embargo, hasta hace poco, las vías por las cuales estas células se comunican era incomprendida. Diversos estudios comenzaron a revelar las redes de señalización molecular y los receptores celulares de superficie que dirigen una respuesta adecuada del hospedero contra agentes infecciosos. La estrategia básica de la terapia inmunomoduladora consiste en identificar aspectos de la respuesta del hospedero que pueden ser incrementadas o suprimidas en cada una de estas vías, logrando así aumentar o complementar la respuesta deseada. (15).

Recientemente, se han descrito diversos polisacáridos de origen micótico, los cuales actúan como potentes inmunomoduladores con actividad específica para células T y células presentadoras de Antígeno. Estos pueden ser de suma importancia, sobre todo en el tratamiento de enfermedades del sistema inmune, tales como cáncer o VIH (15).

G. HONGOS INMUNOMODULADORES

Los hongos han sido valorados alrededor del mundo por sus cualidades alimenticias y comestibles por miles de años. En China se conocen las propiedades medicinales de los hongos desde hace miles de años, especialmente como tónicos para el sistema inmune. Los hongos pueden ser el alimento perfecto para mantenerse en forma y saludables, debido a que las grasas en los hongos se encuentra en muy baja cantidad en comparación con proteínas y carbohidratos, además de que la porción grasa de estos hongos esta constituida principalmente por ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico (1).

Los hongos son fuente de compuestos fisiológicamente activos que han sido estudiados para el desarrollo de medicina natural. En 1970 investigadores japoneses extrajeron exitosamente polisacáridos antitumorales de algunas especies de hongos, libres de efectos adversos, en algunos casos la actividad antitumoral se atribuyó a mejoramiento inmunológico (17).

Desde esos descubrimientos, tres anticancerígenos se han desarrollado y aprobado por el ministerio de salud de Welfare, Japón para el tratamiento del cáncer. Estos anticancerígenos son: Krestin o PSK de *Coriolus versicolor* (Kawaratake), Lentinan de *Lentinus edodes* (Berk)

(shiitake) y Schizophyllan de *Schizophyllum commune* (suehirotake). Los productos se han comercializado principalmente en Europa y Japón (17).

H. *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray

G. frondosa ha sido una fuente de ingresos económicos importante, principalmente en Japón y China, donde es producido a gran escala y es altamente cotizado debido a sus propiedades culinarias y medicinales. El nombre científico proviene del nombre común de un hongo italiano, y hace referencia a una bestia mitológica, mitad águila y mitad león. El nombre japonés es maitake, y este hace referencia a su forma, la cuál asemeja a una ninfa bailando. También se le ha llamado con el nombre común “hongo danzarín” debido a que las personas que lo encontraban bailaban de la alegría, ya que en la época del feudo japonés se podía intercambiar el hongo por su peso en monedas de plata. En China se ha usado como medicina natural contra el mal humor, dolores de estómago, para relajar los nervios y la mente, y para tratar hemorroides (2).

1. Estimulación inmunológica y antitumoral

Muchas investigaciones han reportado que *G. frondosa* y sus extractos mostraron una marcada actividad antitumoral por activación del sistema inmune, estimulando la producción de citocinas, o induciendo apoptosis (2, 18).

Diversos principios activos con demostrada actividad antineoplásica e inmunomoduladora han sido aislados de más de 30 especies de hongos. Muchos de los principios activos micóticos se relacionan químicamente a la estructura β -D-glucósidos (es decir, polímeros de d-glucosa con otros monosacáridos) o β -D-glucósidos enlazados a proteínas (llamados péptidos-polisacáridos o proteoglicanos). Por regla general, los proteoglicanos ofrecen mayor actividad inmunoestimulante que la correspondiente a los polisacáridos libres. Varias de las propiedades medicinales de *G. frondosa* han sido descritas y reconocidas durante años, y algunas de estas propiedades han sido científicamente demostradas. Por ejemplo, *G. frondosa* ha mostrado actividad inmunomoduladora, antitumoral y antiretroviral (18,19).

Se han caracterizado varios compuestos bioactivos, entre los que destacan polisacáridos β - 1,6 glucanos con glúcidos en β - 1,3 o β - 1,3 glucanos con ramificaciones en β - 1,6 (18).

En un estudio, ratones fueron inyectados intraperitonealmente con MT-2 (un β - (1,6) – glucano con ramificaciones β - (1,3) extraído del cuerpo fructífero fresco de *G. frondosa*.), lentinán (del cuerpo fructífero de *Lentinum edodes*) y PSK (del micelio de *Trametes versicolor*), por 10 días después de implantarlos con Sarcoma 180. El rango de inhibición del tumor de MT-2 fue de 80.2 % comparado con 33.6 % para lentinán, y PSK que no tuvo efecto debido a que este es un proteoglicano designado para administración oral (2).

Otro estudio fue conducido para ver si la fracción D (un glucopéptido compuesto en un 70% por un β - 1,3 ramificado β - 1,6 glucano y 30% por proteína aislado del cuerpo fructífero de *G. frondosa*) podía prevenir la metástasis de las células cancerosas. Se inyectó en la almohadilla del pie izquierdo de ratones carcinoma hepático MM-146. Los ratones fueron entonces divididos en tres grupos. El grupo A fue alimentado con una dieta normal (grupo control), el grupo B se alimentó con una dieta conteniendo un 20% polvo de *G. frondosa*, y al grupo C, se le administró una dieta normal, pero se le inyectó intraperitonealmente 1mg de fracción D por kg. de peso, todos por 30 días. Se observó que la metástasis a hígado se previno en un 81% en el grupo B y en un 91.3% en el grupo C en comparación con el grupo control. También Namba 1997, reportó que la fracción D tiene un efecto sinérgico con la Mitomicina C (MMC, una droga quimioterapéutica) en animales. Cuando la fracción D y la MMC fueron combinadas en mitades por dosis durante 30 días, la inhibición del tumor fue de 98% comparado con 80% para la fracción D sola y 45 % para la MMC sola, después de 30 días (2).

La fracción D fue usada como terapia complementaria para perros con cáncer tratados con cirugía y/o quimioterapia. Entre los 22 casos de perros con cáncer presentados en este estudio, la fracción D dirigió, en el 59 % de los casos, al incremento de la fracción linfocítica en sangre periférica, induciendo la producción de citocinas relacionadas a la activación de la respuesta inmune celular. En 85% de los casos con un incremento en la fracción linfocítica, no se observó recurrencia durante un periodo de 10 meses de observación. En contraste, en los casos sin aumento de la fracción linfocítica, en la mayoría se observó recidivas (2).

Kodama y colaboradores en 2002 y 2003, monitorearon los niveles de actividad de NK – células citotóxicas en pacientes con cáncer recibiendo Fracción D y encontraron que la fracción D detiene el progreso metastásico, disminuye la expresión de los marcadores tumorales e incrementa la actividad de las células NK, al mismo tiempo que mantiene los niveles elevados de actividad citotóxica por más de un año. Los resultados sugieren que la

fracción D no solo es responsable del efecto temprano en el crecimiento del tumor mediado por las células NK, sino que también del efecto supresor del tumor a largo plazo, a través del incremento de IL-12 liberada por los macrófagos (2).

Los efectos de la fracción D de *G. frondosa* en la proliferación del cáncer de próstata fueron inicialmente examinado en células PC-3, las cuales fueron cultivadas con concentraciones variables de fracción D (0 – 480 µg/mL). La viabilidad de las células a las 24 horas disminuyó en un 50% con una concentración de 240 µg/mL de fracción D y casi mostró muerte celular completa (> 95%) con 480 µg/mL. Después se examinó si la vitamina C podía ayudar a potenciar la acción de la fracción D, debido a que la vitamina C ha sido propuesta como un modulador bioactivo de la fracción D. Cuando una relativamente baja concentración de fracción D (60 µg/mL) fue combinada con vitamina C (200 µM) se observó muerte en más del 90% de las células a las 24 horas. Así la fracción D a altas concentraciones (480 µg/mL) o a bajas concentraciones (60 µg/mL) combinada con vitamina C. es capaz de inducir muerte celular dentro de 24 horas (18).

2. Actividad Anti-retroviral

La actividad anti - VIH del extracto de *G. frondosa*, fue reconocida tanto por el Instituto Nacional de Salud de Japón, como por el Instituto Nacional contra el Cáncer de Estados Unidos (USNCI por sus siglas en inglés). USNCI confirmó que el extracto de *G. frondosa* fue capaz de prevenir hasta en un 97% la destrucción de linfocitos T colaboradores infectados con VIH *in vitro*. Esto es muy importante ya que la medición de los conteos de T colaboradores es considerando un indicador en el monitoreo de la progresión de VIH hacia SIDA (20).

El efecto de la fracción D en pacientes con VIH fue investigado por Namba y colaboradores en 2000. A pacientes confirmados con VIH se les hizo seguimiento del recuento de CD4, carga viral, síntomas de infección por VIH, estatus de enfermedades oportunistas, y sensación de bienestar. Después de administrar fracción D por 360 días, se reportó en 20 pacientes un incremento en el conteo de CD4 de entre 1.4 y 1.8 veces, así mismo, se reportó en 10 pacientes un descenso en la carga viral. En adición, el 85% de los pacientes reportaron un incremento en su sensación de bienestar, con respecto a varios síntomas y enfermedades secundarias causados por el VIH (20).

3. Efecto Hipoglicémico

El posible efecto hipoglicémico de *G. frondosa* fue examinado en 5 pacientes con diabetes tipo 2, a los cuales se les administró cápsulas de polisacáridos de maitake o CPM (18).

Uno de los casos presentó un control completo de la glicemia con CPM. Un hombre de 44 años de edad, con diagnóstico reciente de diabetes tipo 2. Su valor inicial de glucosa preprandial era de 248 mg/dl con una hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) de 11.5% (normal de 5 a 7.5%). Sin embargo, no presentaba retinopatías, neuropatías u otras complicaciones relacionadas con la diabetes. Al iniciarse tratamiento con 2.5 mg de un potente agente antidiabético vía oral, sus niveles de glucosa preprandial descendieron a 180 mg/dl en los siguientes 2 días. Inmediatamente empezó a consumir CPM de 500 mg 3 veces al día ingiriendo el agente antidiabético al tercer día. Su valor de glucosa preprandial descendió entonces dramáticamente a 83 mg/dl y se mantuvo estable alrededor de 100 mg/dl por los siguientes 10 días. Después de esto, sus valores de glucosa preprandial se mantuvieron en un rango de entre 80 – 90 mg/dl por los próximos 3 meses y su HbA_{1c} también disminuyó al valor de 5.2%. El agente antidiabético fue reducido a dosis de 1.25 mg continuando con la misma dosis de CPM, y sus niveles de glucosa preprandial se mantuvieron entre 80 – 90 mg/dL por los siguientes 2 meses. Consecuentemente, el agente antidiabético fue completamente eliminado, pero se siguió administrando la misma dosis de CPM, y sus niveles de glucosa preprandial se mantuvieron siempre alrededor de 90 mg/dl con HbA_{1c} de 5.6% en los siguientes 6 meses. Después de 2 años de su diagnóstico, el paciente se encontraba libre de cualquier medicamento, consumiendo diariamente CPM, y manteniéndose normoglicémico (18).

4. Otras Actividades Terapéuticas

En un estudio hecho por Adachi y colaboradores en 1998, dos grupos de ratas con hipertensión espontánea fueron alimentadas con una dieta que contenía 20% y 30% de polvo crudo de *G. frondosa*. En contraste con el grupo control, el grupo con *G. frondosa* experimentó una reducción significativa en la presión sanguínea en el día 20. Cuando los ratones del grupo con *G. frondosa* volvieron a ser alimentados con dieta normal, sin *G. frondosa*, su presión sanguínea se incrementó del día 21 al día 30. Sin embargo, una reducción en la presión sanguínea fue observada de nuevo cuando los ratones fueron de nuevo alimentados con una

dieta conteniendo *G. frondosa* desde el día 31 hasta el día 44. En adición, un extracto en éter de *G. frondosa*, el cual consistía principalmente de compuestos lipídicos, demostró tener una fuerte actividad antihipertensiva (21,22).

En otro estudio, un grupo de ratas Wistar de 5 semanas de edad fueron alimentadas con una dieta hipercolesterolémica, y otro grupo fue alimentado con la misma dieta mas 5% de polvo de *G. frondosa*, para examinar el efecto del hongo en metabolismo de los lípidos. En el grupo alimentado con *G. frondosa* los niveles de, colesterol, triglicéridos, y fosfolípidos fueron mas bajos en comparación al grupo control. El colesterol total en plasma fue reducido en un 24.7% y el colesterol hepático total fue reducido en un 7.0% (22).

IV. JUSTIFICACIÓN

Existen diversas enfermedades que cursan con una disminución de la respuesta inmunitaria, entre las que se destacan: cáncer, diabetes y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La mayoría de los tratamientos para dichas enfermedades son altamente tóxicos, causando una gran cantidad de efectos secundarios perjudiciales y disminuyendo la calidad de vida del paciente que los utiliza. Además, el costo de estas drogas es elevado, por lo que muchas veces no se encuentra al alcance de la mayoría de personas (23).

La medicina natural representa una alternativa para el tratamiento de estas patologías, sus principales ventajas son el bajo grado de toxicidad y el alto grado costo – beneficio que representa, permitiendo el uso de terapias prolongadas y, que a su vez, pueden ser compatibles con el uso de fármacos sintéticos (23).

Durante años se han atribuido un gran número de propiedades terapéuticas a los extractos obtenidos a partir del cuerpo fructífero de *G. frondosa*, demostrándose algunas de estas propiedades. Por ejemplo, *G. frondosa* ha mostrado actividad inmunomoduladora, antitumoral y anti-retroviral. También se ha observado que la ingesta diaria de este, ayuda a mantener en rangos adecuados los niveles de glucosa sanguínea, colesterol total, triglicéridos, así como presión arterial. Estas potenciales acciones fisiológicas están implicadas en la prevención y tratamiento de diabetes miellitus tipo 2, hipercolesteremia, obesidad e hipertensión arterial (18).

Se han utilizado diversos modelos animales para demostrar que los compuestos extraídos del cuerpo fructífero de *G. frondosa* son capaces de modificar la respuesta inmune celular, lo cual ha sido comprobado mediante el aumento en el número de células NK y linfocitos T citotóxicos, sin embargo, no se conocen estudios que expongan efectos similares en humanos (2). Por este motivo, este estudio pretende comprobar la actividad de los extractos etanólico y acuoso de *G. frondosa* sobre linfocitos aislados de sangre humana.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Evaluar la actividad inmunomoduladora de los extractos etanólico y acuoso del cuerpo fructífero de *G. frondosa*

B. Objetivos Específicos

1. Evaluar la actividad de los extractos etanólico y acuoso del cuerpo fructífero de *G. frondosa* sobre poblaciones de linfocitos.
2. Determinar el porcentaje de linfoproliferación *in vitro* que presenta el extracto etanólico del cuerpo fructífero de *G. frondosa*.
3. Determinar el porcentaje de linfoproliferación *in vitro* que presenta el extracto acuoso del cuerpo fructífero de *G. frondosa*.
4. Determinar si existe diferencia significativa entre ambos extractos.

VI. HIPOTESIS

- 1: Los extractos de *G. frondosa* son inmunomoduladores de los linfocitos *in vitro*.
- 2: Existe diferencia significativa en el porcentaje de linfoproliferación *in vitro* entre los extractos etanólico y acuoso de *G. frondosa*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y muestra

1. Universo: Cuerpo fructífero del hongo *Grifola frondosa*
2. Muestra: Extractos acuoso y etanólico del cuerpo fructífero de *G. frondosa*

B. Recursos

1. Recursos Humanos

a) Asesores

Licda. Margarita Paz QB MA.

Madre Ivonne Sommerkamp QB.

b) Investigador

Br. Rolando Lorenzana González

2. Recursos Institucionales

Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Departamento de Citohistología.

3. Recursos Materiales

a) Equipo

Autoclave

Balanza analítica

Campana de flujo laminar

Congelador

Centrífuga

Hemocitómetro de Neubauer

Incubadora 37°C

Lector de ELISA

Refrigeradora

b) Materiales

Jarra con candela

Placas estériles de 96 pozos, de fondo plano, con tapadera

Placas estériles de 96 pozos, de fondo en U, con tapadera

Pipetas de 10 uL, 50 uL, 100 uL, 200 uL y 1000 uL

Pipetas pasteur

Tubos de ensayo

Tubos Eppendorf de 0.5 y 2.0 mL

Tubos Vacutainer con EDTA de 5 mL

Tubos de 50 mL

c) Reactivos

Histopaque

Sal de tetrazolio (XTT)

Lectina PHA

Metosulfato de phenacina (PMS)

Dimetil formamida

Acido acético

Cristal violeta

Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

RPMI-FBS (medio de cultivo más 10 % de suero fetal bovino)

PBS (Amortiguador Salino de Fosfatos)

Gentamicina

EDTA (sal disódica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético)

L - Glutamina

C. Métodos

Para la realización de la fase experimental se realizó un ensayo linfoproliferativo (descrito a continuación) que implica el uso de una lectina con conocido efecto linfoproliferativo como control positivo y una solución de linfocitos en ausencia de lectina como control negativo. Dicho ensayo permitió cuantificar la linfoproliferación, aprovechando la capacidad que tienen las células vivas (principalmente por acción de la actividad enzimática mitocondrial) de reducir la sal de tetrazolio (XTT) a un compuesto coloreado y soluble, cuya intensidad, proporcional a la cantidad de células presentes, fue medida espectrofotométricamente en un lector de ELISA.

Ensayo linfoproliferativo

a) Aislamiento y preparación de linfocitos

- Agregar un volumen de 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA sobre 5 mL de Histopaque, con una pipeta estéril.
- Centrifugar a 1800 rpm por 30 minutos, activando el enfriador los primeros 4 minutos.
- Aspirar con cuidado la capa de linfocitos (ver anexo C).
- Proceder a transferir la capa de linfocitos a un tubo de centrifuga, agregando 10 mL de PBS y mezclando cuidadosamente.
- Centrifugar a 1400 rpm por 10 minutos, activando el enfriador los primeros 2 minutos.
- Aspirar y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 10 ml de PBS.
- Centrifugar a 1400 rpm por 10 minutos, activar el enfriador los primeros 2 minutos.
- Aspirar y descartar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 10 ml de PBS.
- Centrifugar a 1400 rpm por 10 minutos, activar el enfriador los primeros 2 minutos.
- Aspirar y descartar el sobrenadante.

b) Conteo celular

- Para calcular la concentración celular, resuspender la capa de linfocitos en aproximadamente 10 ml de PBS y colocar en una cámara de Neubauer.
- Contar microscópicamente 4 cuadrantes de la cámara y calcular la concentración celular de la siguiente manera:
Número total de células/ml = número total de células en 4 cuadrantes $\times 1 \times 10^4$.
- Ajustar la concentración de linfocitos a 5×10^6 células/ml con RPMI-FBS

c) Reto Linfoproliferativo

En condiciones estériles:

1. Dilución de las muestras en una placa de microtitulación

- Agregar 50 μ L de RPMI-FCS a los pozos de las filas B a la H

- Para una dilución 1:2, agregar 100 μL de las muestras por triplicado en todos los pozos de la fila A. (Ej. A1, A2, A3 una muestra, A4, A5, A6 otra, etc.)
- Transferir 50 μL de la fila A, a la B, mezclar y pasar 50 μL de la B, a la fila C y así sucesivamente hasta la fila G, al final descartar 50 μL de la mezcla de la fila G.
- Para lograr una dilución 1:3 se usan 75 μL de muestra en la fila A y se transfieren 25 μL a las siguientes filas

2. Incubación

- Agregar 50 μL de RPMI-FCS a las columnas A3 – G3, A6 – G6, A9 – G9, A12 – G12 y a la fila H7 – H12
- Agregar 50 μL de solución de PHA a todos los pozos.
- Pipetear 50 μL de la suspensión de linfocitos dentro de los pozos A1 a G1, A2 a G2, A4 a G4, A5 a G5, A7 a G7, A8 a G8, A10 a G10, A11 a G11 y H1 a H6 (control).
- Cubrir la placa e incubarla por 4 días en cámara húmeda con 5 % de CO_2 a 37 grados C.

	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3			Muestra 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			**			**			**			**
B			**			**			**			**
C			**			**			**			**
D			**			**			**			**
E			**			**			**			**
F			**			**			**			**
G			**			**			**			**
H							**	**	**	**	**	**

Sombreado: Pozos con linfocitos

** : Pozos sin linfocitos

3. Cuantificación del crecimiento celular

- Después de 4 días de incubación, agregar 25 μL de solución de XXT a cada pozo
- Incubar a 37 grados C por 1 hora
- Agregar 50 μL de SDS e incubar a 30 min a 37 grados C.
- Medir la densidad óptica a 490 nm en un lector de ELISA.

4. Cálculo: acción proliferativa de las muestras versus los controles

$$\% \text{ de linfoproliferación} = \frac{\text{DO}_{490 \text{ media}}(A1, A2) - \text{DO}_{490}(A3)}{\text{DO}_{490 \text{ media}}(H1: H6) - \text{DO}_{490 \text{ media}}(H7: H12)} \times 100$$

D. Diseño Estadístico

1ª Fase: Determinación de la Actividad Inmunomoduladora

Para determinar la actividad inmunomoduladora en ambos extractos de *G. frondosa*, se utilizó un diseño cuasi-experimental con 4 tratamientos: control positivo, control negativo, extracto etanólico y extracto acuoso. Se tomó como respuesta positiva la presencia de linfoproliferación y como respuesta negativa la ausencia de la misma. Se utilizó como base la proliferación causada por el control positivo, estableciéndose ésta como el 100%. Un porcentaje de linfoproliferación entre 0 a 99.9% indicó ausencia de actividad, mientras que un porcentaje de linfoproliferación mayor a 100% significó actividad del extracto. Se corrieron 5 repeticiones de ambos extractos en diluciones seriadas, se midió la absorbancia de cada muestra, y se comparó cada resultado con los obtenidos por los controles positivos y negativos utilizándose una prueba de hipótesis binomial con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

2ª Fase: Comparación del % de Linfoproliferación

Ya que cada extracto mostró actividad linfoproliferativa, se realizaron 10 réplicas con cada uno y se comparó su porcentaje de linfoproliferación con la prueba de t de student, se reportaron promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación, utilizando como hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (no existe diferencia significativa entre los promedios del porcentaje de linfoproliferación de ambos extractos) y como hipótesis alterna $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$ (existe diferencia significativa entre los promedios de los porcentajes de linfoproliferación de ambos extractos). Se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

VIII. RESULTADOS

A. Determinación Cualitativa de la Actividad Inmunomoduladora

La primera fase de este estudio, determino la existencia de actividad linfoproliferativa *in vitro* de los extractos etanólico y acuoso de *G. frondosa*, a diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Determinación de la actividad linfoproliferativa *in vitro* de los extractos acuoso y etanólico de *G. frondosa* a diferentes concentraciones

<i>Concentración</i>	<i>Extracto Acuoso</i>	<i>Extracto Etanólico</i>
	<i>x/n*</i>	<i>x/n</i>
1000 µg/ml	5/5**	5/5**
500 µg/ml	0/5	5/5**
250 µg/ml	0/5	0/5
125 µg/ml	0/5	0/5
62.5 µg/ml	0/5	0/5
31.25 µg/ml	0/5	0/5
15.63 µg/ml	0/5	0/5

* numero de repeticiones con resultado positivo / total de repeticiones realizadas

**p = 0.03125

A una concentración de 1000 µg/ml, ambos extractos presentaron actividad en las 5 repeticiones ensayadas. El extracto etanólico, además, mostro actividad a una concentración de 500 µg/ml, también para las 5 repeticiones ensayadas. Todas las demás concentraciones probadas dieron resultados negativos (por debajo del control), lo que permite establecer una concentración efectiva mínima de 1000 µg/ml para el extracto acuoso y de 500 µg/ml para el etanólico. El valor de p, en las concentraciones con actividad para ambos extractos, fue menor que el nivel de significancia estipulado (0.05) siguiendo una distribución binomial con una probabilidad de éxito *a priori* de 0.5. Esto indica que la respuesta obtenida en este ensayo es causada por los extractos.

B. Determinación del Porcentaje de Linfoproliferación

Una vez demostrada la presencia de actividad para ambos extractos, se determinó el porcentaje de linfoproliferación que presentó cada uno de ellos, tomando como 100 por ciento la linfoproliferación producida por la lectina fitohemaglutinina (control positivo). Para poder hacer una comparación estadísticamente confiable entre ambos extractos, fue necesario aumentar el número de repeticiones de 5, valoradas en la primera parte, a 10.

En la tabla No. 2, se presenta la estadística descriptiva de los porcentajes de linfoproliferación obtenidos a partir de ambos extractos para las concentraciones que presentaron actividad.

Tabal No 2: Estadística descriptiva de las concentraciones con actividad para ambos extractos

<i>Concentración</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Extracto Acuoso*</i>					<i>Extracto Etanólico</i>				
	Media	Desv. Std⁺	C.V.[†]	Max^ψ	Min[§]	Media	Desv. Std	C.V.	Max	Min
1000	124.50	6.55	5.26 %	138	115	156.40	6.24	3.99 %	164	146
500	85.40	11.34	13.27 %	106	71	125.10	5.09	4.07 %	131	116

* Actividad únicamente en concentración 1000 $\mu\text{g/ml}$

+ Desviación estándar

† Coeficiente de variación

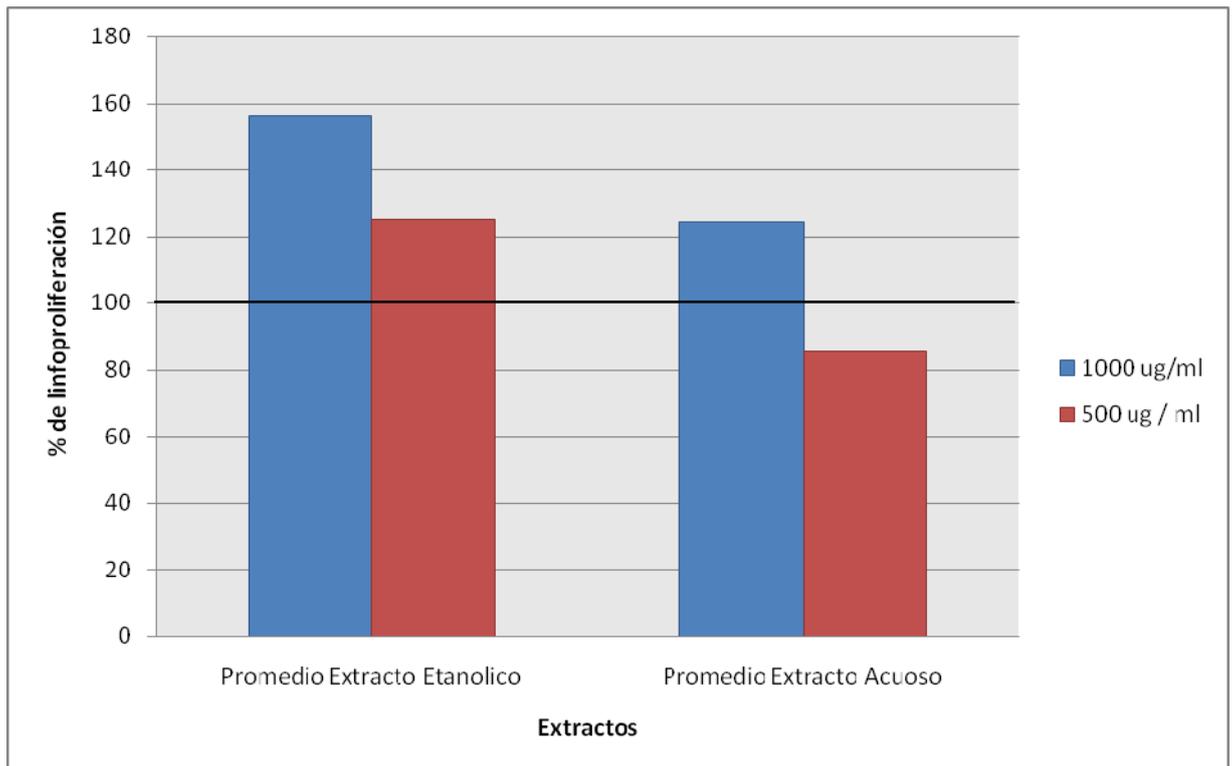
ψ Máximo

§ Mínimo

En esta tabla se puede observar que a concentraciones de 1000 $\mu\text{g/ml}$, el extracto etanólico muestra un 56 % de linfoproliferación por encima del control positivo, mientras que el extracto acuoso muestra un 24 %. A una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$, el extracto etanólico muestra un 25 % de linfoproliferación sobre el control positivo. Los valores de dispersión de estos datos prueban que para estas concentraciones el ensayo tiene validez estadística. Por otra parte, el extracto acuoso, a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$, muestra un 15 % de linfoproliferación por debajo del control positivo, pero sus parámetros de dispersión son muy elevados, por lo que no se puede validar dichos resultados

La Grafica No 1, muestra las diferencias entre las medias de ambos extractos, a las concentraciones descritas anteriormente.

Grafica No 1. Medias de extractos etanólico y acuoso, a concentraciones de 1000 y 500 µg/ml.



Se puede observar que ambas concentraciones del extracto etanólico, presentan un porcentaje de linfoproliferación mayor que la del control positivo, representado por la línea negra en el 100 % de linfoproliferación, mientras que para el extracto acuoso, solo la concentración de 1000 µg/ml esta por encima de esta.

Se realizo la comparación de las medias de ambos extractos a concentración de 1000 µg/ml utilizando una prueba T de student. Se obtuvo un valor de $p < 0.0001$ con lo que se infiere que existe una diferencia significativa entre los dos extractos y no se acepta la hipótesis nula.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Muchas investigaciones han reportado que *G. frondosa* y sus extractos poseen una remarcada actividad antitumoral por activación del sistema inmune. En esta investigación se demostró el efecto de dos extractos, uno acuoso y otro etanólico, sobre los linfocitos humanos *in vitro*. Ambos extractos indujeron la proliferación de linfocitos extraídos de sangre periférica humana después de ser puestos en contacto con estos por 4 días.

Los resultados aquí expuestos, concuerdan con una serie de hallazgos publicados por otros investigadores. En los estudios realizados con animales por Hishida y colaboradores, y por Yamada y colaboradores, se demostró que la fracción D posee actividad antitumoral debido al aumento en la concentración de IL-1, así como por el incremento en la producción de macrófagos, linfocitos T que exhiben citotoxicidad específica contra antígeno y células NK. Por otra parte, en este estudio se observó un detrimento en la respuesta hipersensible, la cual fue asociada a la supresión del crecimiento tumoral (24, 25).

Adachi y colaboradores realizaron investigaciones sobre como uno de los compuestos extraídos a partir del cuerpo fructífero de este hongo, una glucoproteína denominada MT – 2, aumenta la actividad de células del sistema inmune en ratones. Estos investigadores descubrieron que la administración intraperitoneal de dicho compuesto incremento entre un 50% y un 80% la cantidad de linfocitos T, y de un 80 % a un 200 % la cantidad de células NK (26).

Se publicó que la fracción D, al ser administrada por vía oral a pacientes con SIDA, indujo a un incremento en las células T, mientras que en otros se interrumpió la disminución de estas células. Shidima y colaboradores usaron la fracción D como terapia complementaria para perros con cáncer tratados con cirugía y/o quimioterapia. En este estudio, la fracción D condujo, en el 59 % de los casos, al incremento de la fracción linfocítica en sangre periférica, induciendo la producción de citokinas relacionadas a la activación de la respuesta inmune celular. En 85% de los casos con un incremento en la fracción linfocítica, no se observó recurrencia durante un período de 10 meses de observación. En contraste, en los casos sin aumento de la fracción linfocítica, en la mayoría se observó recidivas (27,28).

Este estudio logro determinar que los extractos de *G. frondosa* aumentan la proliferación de linfocitos *in vitro*, entre 1.2 y 1.6 veces. Esto concuerda con los datos reportados por Namba y colaboradores en 2000, en un estudio realizado para evaluar el efecto de la fracción D en pacientes con VIH. A pacientes confirmados con VIH se les monitoreo el conteo de CD4,

medición de carga viral, síntomas de infección por VIH, estatus de enfermedades oportunistas, y sensación de bienestar. Después de administrar fracción D por 360 días, se reportó en 20 pacientes un incremento en el conteo de CD4 de entre 1.4 y 1.8 veces, así mismo, se reportó en 10 pacientes un descenso en la carga viral. En adición, el 85% de los pacientes reportaron un incremento en su sensación de bienestar, con respecto a varios síntomas y enfermedades secundarias causados por el VIH (29).

En esta investigación se encontró que existe una diferencia significativamente estadística entre la actividad de ambos extractos, siendo el extracto etanólico el que mostro una mayor actividad. Varios investigadores, como Kato en 1983, Ohno en 1986, Suzuki en 1984, Iino en 1985 y Mizuno en 1986, utilizaron diferentes solventes orgánicos para extraer los polisacáridos contenidos en el cuerpo fructífero de *G. frondosa*, logrando purificar varios tipos de compuestos con actividad antitumoral e inmunomoduladora (2). Esto evidencia que los solventes orgánicos son mejores para extraer los compuestos activos que el agua, por lo que se considera que la mayor actividad mostrada en esta investigación por el extracto etanólico, se debe a la presencia de mayores concentraciones de compuestos activos, en comparación con el extracto acuoso.

Una de las mayores limitantes que se tiene en este estudio, es el grado de pureza de los compuestos activos en ambos extractos. Heishida y colaboradores fraccionaron un proteoglicido con actividad antitumoral del cuerpo fructífero de *G. frondosa* por extracción con agua caliente, precipitación con etanol, tratamiento con CTA-OH (Hidróxido de cetiltrimetilamonio) al 25 %, AcOH al 20 % y NaOH al 6%, y desproteínización posterior (2).

A pesar de que los resultados expuestos en este estudio, demostraron que los extractos de *G. frondosa* poseen actividad linfoproliferativa *in vitro*, con el tipo de extracción utilizado los compuestos activos se encuentran a concentraciones efectivas mas bajas en comparación con estudios que han utilizado compuestos purificados, pudiendo causar esto, un detrimento en la actividad encontrada. La posibilidad de purificar los compuestos activos de *G. frondosa*, tales como la fracción D, el polisacárido MT – 2, entre otros, permitirá a futuras investigaciones evaluar de una manera mas efectiva, la actividad de los extractos del cuerpo fructífero de *G. frondosa* sobre linfocitos humanos *in vitro*.

X. CONCLUSIONES

1. Se observó que ambos extracto de *G. frondosa* poseen actividad proliferativa *in vitro* sobre linfocitos extraídos a partir de sangre venosa humana.
2. Los conteos celulares observados después del tratamiento de los linfocitos con los extractos acuoso y etanólico, fueron 1.2 y 1.6 veces mayores respetivamente, en comparación con los conteos observados para el control de positivo.
3. La diferencia significativa encontrada entre la actividad de ambos extractos de *G. frondosa* ($p < 0.0001$) demostró que son dos poblaciones distintas.
4. El extracto etanólico de *G. frondosa* demostró tener una mayor actividad linfoproliferativa *in vitro*, en comparación con su par acuoso ($p < 0.0001$).
5. La doble concentración efectiva mínima del extracto acuoso con respecto a la del etanólico sugiere estudios posteriores tomando en cuenta la dependencia de la actividad con respecto a la concentración.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones sobre el efecto de los extractos acuoso y etanólico de *G. frondosa* sobre otros componentes del sistema inmune, como macrófagos, leucocitos, complemento, etc.
2. Determinar la actividad proliferativa de diversos extractos sobre clonas específicas de linfocitos, como células NK y linfocitos Th-1, ya que se cree que los efectos inmunomoduladores de este hongo, se deben principalmente a la acción de los compuestos activos sobre estas líneas celulares.
3. Evaluar la actividad linfoproliferativa de compuestos extraídos con solventes orgánicos y bases, ya que la literatura reporta que la mayoría de compuestos activos son solubles en estos.
4. Realizar ensayos en modelos animales, para determinar si existe actividad sobre los linfocitos *in vivo*.
5. Evaluar la actividad contra células cancerígenas de los extractos de *G. frondosa*.
6. Realizar estudios que evalúen las otras actividades terapéuticas de *G. frondosa*.

IX. REFERENCIAS

1. Hobbs C. Medicinal Mushrooms an Exploration of Tradition, Healing, and Culture. 2 ed. Londres: Botanica Press, 1995. 208p.
2. Zhunag C, Solomon PW. Medicinal Value of Cullinary – Medicinal Maitake Mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetidae). Review. Int J Med Mushr 2004; 6:287 – 313.
3. Margani R. Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica. Argentina: Médica Panamericana, 1996. 970p.
4. Weir DM *et al.* Handbook of Experimental Immunology. *In vitro* evaluation of human lymphocyte function. 4 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1986. 320p
5. Hillman RS *et al.* Manual de hematología. 2 ed. México: El manual Moderno, 1998. 464p
6. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Inmunología Básica y Clínica. 10 ed. México: El Manual Moderno, 2002. xviii+918p.
7. Rodríguez AR, Medina N. La Inmunomodulación en cáncer ¿Qué hacemos y hacia donde vamos? Rev Aler Méx 2005; 52:96 – 101
8. Rojas W. Inmunología. 12 ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas, 2001. 470p.
9. Cáncer Facts. Instituto Nacional del Cáncer. El uso del sistema inmune para tratar el cáncer. Terapias biológicas http://www.cancer.gov/clinical_trials/:Rev.:05/01/2002. C. Edt.: 06/04/2002
10. Diaz CD. Riesgo de Cáncer. Antitumoral. Rev Cub de Onco 1995; 15:195-198.
11. Xervicans J, Galindo A, Centeno C. Condilomas en Portadores HIV. Unidad de Patología cervical. Hospital Materno infantil Vall d’Herbón. Asociación española de Patología Cervical y Colposcopia. 2004. [http://www. Munmedico.com](http://www.Munmedico.com).
12. Jenaway CA Jr, Travers P. Immunobiology: The immune system in health and disease; Current Biology. Londres: Gerland Publishing, 1994. 780p.
13. Actividad Inmunomoduladora, Antiviral Citotóxica y Antimutagenica de las Mistel-Lectinas ML-I, ML-II, ML-III, y las Viscotoxinas. Una aproximación Científica Moderna en Ontología y HIV-SIDA. Instituto MAPAPO. Instituto germano - argentino de investigaciones Oncológicas e Inmunológicas. Buenos Aires,Argentina. [www. Publuster.com](http://www.Publuster.com). ar. Nomb-Dicm/04.

14. Rodríguez CM, López DC, Zabalegui N. Inmunoterapia activa en el tratamiento de neoplasias hematológicas. *Anales Sis San Navarra* 2004; 56:89-92.
15. Tzianabos AO. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *Clin Micro Rev* 2000; 13:523-533.
16. Díaz CD, Bello GJL, Rondón CT, Pimienta CL. Efecto de 2 Inmunomoduladores sobre la Quimioterapia en Tumores Experimentales. *Rev Cub de Onco* 1995; 11:91-95.
17. Dolby VT. Power Your Immunity With Mushrooms. *Nutr Suppl* 1999; 20: 58-60.
18. Sensuke K *et al.* Anticancer and Hypoglycemic Effects of Polysaccharides in Edible and Medicinal Maitake Mushroom [*Grifola frondosa* (Dick.:Fr.) S. F. Gray]. *Int J Med Mushr* 2002; 4: 188-195.
19. Ishibashi K, Miura N, Adachi Y. Relationship Between Solubility of Grifolan, a Fungal 1,3-beta-D-glucan, and Production of Tumor Necrosis Factor by Macrophages *in vitro*. *Biosci Biotech Biochem.* 2001; 65:1993-2000.
20. Nanba H, Kodama N, Schar D, Turner D. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV- infected patients. *Mycoscience* 2000; 41: 293 – 295.
21. Adachi K, Nanba H, Otsuka M, Kuroda H. Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharm Bull*; 36: 1000 – 1006.
22. Talpur N *et al.* Antyhipertensive and Metabolic effects of whole maitake mushroom powder and its fractions in two rats strains. *Mol Cellular Biochem* 2002; 237: 129-136.
23. Guadarrama Suárez I. Introducción a la fitoterapia y medicina tradicional. México: Herbal; 1999. 246p.
24. Hishida I., Nanba H., Kuroda H. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 1819 – 1827.
25. Yamada Y., Nanba H., Kuroda H. Antitumor effects of orally administered extracts from fruit body of *Grifola frondosa*. *Chemotherapy* 1990; 38: 790 – 796.
26. Adachi K., Nanba H., Korouda H. Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by Beta – glucan obtained from *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharm Bull* 1987; 35: 262 – 270.
27. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. 3 ed. Canada: Ten Speed Press, 2000. 555p

28. Shidima T., Shnidman E., Shirota M. Usefulness of anti – cáncer complementary immune therapy with DVM fraction. *J Amer Holstic Vet Med Assoc* 2004; 23:17 – 20.
29. Namba H., Kodama N., Schar D., Turner D. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) glucan en HIV – infected patients. *Mycoscience* 2000; 41: 293 – 295.
30. Preuss H, Sesuke K. Maitake Magic; Maitake Mushroom fractions: Capture the force of Nature's amazing powerful Immune Boosters, Cancer Protectors and Metabolic Activators. Estados Unidos: Freedom press, 2002. 160p.
31. Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potencial. *Altern Med Rev* 2001; 6: 48 – 60.
32. Chen A. A practical Guide for Synthetic-Log-Cultivation of Medicinal Mushroom *Grifola frondosa* (Dick.:Fr.) S. F. Gray (Maitake). *Int J Med Mushr* 1999; 1: 153-167.
33. Chang ST, Miles PG. Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environment Impact. 2 ed. Londres: CEC Press, 2004. 451p.

X. ANEXOS

1. Descripción

G. frondosa es un hongo grande, carnoso, de color café grisáceo cuando es joven, tomando una tonalidad de gris mas clara conforme crece (algunas variedades son amarillo claro en la madurez). El cuerpo fructífero esta compuesto de múltiples capas sobrepuestas, de 2 a 10 cm. de diámetro que emergen por ramificaciones del talo, unidas excéntricamente y que comparten una base común. Los cuerpos fructíferos jóvenes están adornados con finas fibrillas grises. Los poros del reverso de las capas son blancas (30).

2. Distribución

Crecen a las temperaturas del norte, en bosques de caduceos. En Norteamérica se ha encontrado en el este de Canadá y a lo largo de los estados del Noreste y del Atlántico medio. Raramente se encuentra en el Noroeste y Sureste de los Estados Unidos. También es autóctono de la región Noreste de Japón y las regiones templadas de árboles leñosos de China y Europa, donde fue descubierto (27).

3. Hábitat natural

Se encuentra en los tocones (resto del tronco de un árbol que sobresale de la tierra después de ser cortado) o en la base de especies leñosas de caduceos muertas o que están muriendo, especialmente, robles, olmos, maples, hayas y ocasionalmente en confieras. De acuerdo con Gilbertson y Ryvardeen, este hongo también se ha colectado de pinos aunque también ocasionalmente. A pesar de que este se encuentra en las bases de árboles moribundos la mayoría de los micólogos ven a este hongo como un saprófito que se beneficia del tejido de árboles que han muerto por otras causas (31).

4. Aspectos microscópicos

Posee esporas blancas, ligeramente elípticas (forma de huevo), lisas, hialinas de 6–7 x 3.5–5 μm). Tiene un sistema de hifas dimítico, en la hifa madre presenta conexiones empalmadas, las ramificaciones son poco frecuentes. Las hifas son cenocíticas (2, 30).

5. Métodos naturales de cultivo

Se recomienda la inoculación de tocones de especies leñosas o troncos enterrados. Dado el tamaño del cuerpo fructífero y sus propiedades comestibles y medicinales, este hongo sería el principal candidato para el aprovechamiento de los tocones y árboles muertos en bosques de especies leñosas (32, 33).

Cuando se utilizan tocones para el cultivo del hongo se debe esperar de uno a tres años antes de que ocurra la fructificación. Se recomienda inoculación masiva, los tocones no deben de ser necesariamente vírgenes. El maitake es bien conocido por aprovechar árboles que ya han sido utilizados por otros hongos, sin embargo no se conoce bien bajo que condiciones el maitake domina sobre otros hongos. Por lo tanto para mejores resultados, se recomienda la inoculación de tocones recién cortados (32,33).

6. Recomendaciones para su producción

Se recomienda el uso de un medio de cultivo como el agar extracto de malta y levadura, agar papa malta levadura, agar papa dextrosa y levadura o granos de cereal como centeno, trigo, sorgo y milo para la generación del primer micelio. Luego este se puede volver a inocular en granos para crear una segunda generación, la cual a su vez puede ser utilizada para inocular aserrín, el micelio obtenido de este sustrato puede utilizarse para inocular troncos de árboles cortados tanto en condiciones cerradas como abiertas (32).

La mayoría de las cepas fructíferas empiezan su producción de 6 a 8 semanas desde su inoculación en aserrín esterilizado y suplementado. El Instituto Mori Mushroom de Japón ha utilizado aserrín de pino o de coníferas suplementado con arroz integral para hacer crecer a este hongo (32).

7. Componentes nutricionales

El cuerpo fructífero fresco de *G. frondosa* contiene aproximadamente 90–91 % de humedad, y la fracción seca contiene 21.9 % de proteína, 59.9 % de carbohidratos, 3.9 % de grasa, y 5.0 % de ceniza. En adición, se ha reportado que el cuerpo fructífero de *G. frondosa* es rico en ergosterol (pre vitamina D) con un porcentaje cercano al 0.78 % (2).