

I. RESUMEN

Los hongos medicinales constituyen un recurso terapéutico contra muchas enfermedades. El hongo *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray es un hongo comestible de origen asiático muy apreciado en Japón por sus cualidades culinarias y medicinales. Sus beneficios para la salud han sido ampliamente estudiados y comprobados, su compatibilidad con los tratamientos médicos convencionales lo convierten en un excelente complemento para el tratamiento de enfermedades crónicas. Actualmente han sido encontradas cepas silvestres del hongo *Grifola frondosa* en bosques de Guatemala, cuando anteriormente en el continente americano sólo se podía localizar en el norte de los Estados Unidos. Este hallazgo realza la importancia de este tipo de estudios por la posible aplicación terapéutica del hongo *G. frondosa* para el tratamiento de diversas enfermedades debido a su accesibilidad.

En esta investigación se determinó la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso y etanólico del cuerpo fructífero seco del hongo *G. frondosa* sobre las vías clásica y alterna del sistema del complemento. Se realizaron dos ensayos para evaluar dicha actividad, en cada una de las vías se corrieron cuatro repeticiones utilizando 7 diluciones (1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729 y 1:2187), con una concentración inicial del extracto de 500 µg/mL.

Los resultados demostraron que la actividad del hongo *Grifola frondosa* está ligada a una acción inhibitoria del sistema del complemento en ambas vías (clásica y alterna). Esto se afirma al observar que la actividad hemolítica del suero se incrementa cuando la concentración del extracto etanólico o acuoso del hongo disminuye.

Debido a que ambas vías del complejo de ataque a la membrana (CAM) fueron inhibidas, es posible que la regulación del complemento se de a partir del complejo C3 común para ambas vías. Sin embargo, por el ensayo utilizado es muy difícil determinar el punto exacto y la forma de regulación ejercida por el hongo.

No fue posible realizar una comparación entre el extracto acuoso y etanólico del hongo debido a que ambos presentaron actividad inmunomoduladora sin mostrar una diferencia significativa en el potencial de inhibición de ambas vías del sistema del complemento.

Tomando en cuenta la actividad inmunomoduladora sobre el sistema del complemento, este hongo podría ser utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas

por el complemento en cualquiera de sus vías, siempre y cuando los resultados de esta tesis sean corroborados por estudios más profundos.

II. INTRODUCCIÓN

Las preparaciones con hongos medicinales constituyen un recurso terapéutico contra enfermedades tan variadas como cáncer, hipertensión arterial, diabetes, infecciones bacterianas, enfermedades virales y obesidad, entre otras. Este tipo de tratamiento ha sido utilizado ampliamente en países orientales, ya que estos no producen ningún efecto adverso y ningún tipo de intolerancia, lo que convierte a los hongos en los inmunocéuticos de primera elección en el manejo de muchas enfermedades. Sin embargo en Guatemala son pocas las comunidades que consumen hongos dentro de su dieta cotidiana y menos aun las que los utilizan con fines terapéuticos (1).

La fracción soluble en agua del hongo comestible *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray conocido comúnmente en Japón como maitake, ha demostrado tener una actividad inmunoestimulante de utilidad antineoplásica y antiretroviral; por otro lado también ayuda a controlar la presión arterial y disminuye los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en pacientes que padecen de diabetes. Su excelente tolerabilidad y compatibilidad con tratamientos basados en fármacos sintéticos convierten a este hongo en un extraordinario complemento durante el tratamiento de enfermedades crónicas (1, 2).

Grifola frondosa se distribuye geográficamente desde Estados Unidos, Canadá, el Norte de Europa, China hasta Japón (1). En los últimos años se ha registrado el crecimiento de cepas silvestres en Chimaltenango, Guatemala, por lo que este estudio cobra mayor validez al tomar en cuenta que en un futuro podría ser utilizado como tratamiento adyuvante de distintas enfermedades debido a su fácil acceso.¹

El sistema del complemento es un grupo de proteínas del plasma y de la membrana celular que se encargan de originar lisis celular, mediar los procesos de opsonización para la fagocitosis y generar fragmentos peptídicos que regulan las características de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Este opera por medio de tres vías que son: la vía clásica, la vía alterna y la vía de las lectinas por unión a mananos (3).

El siguiente estudio pretendió determinar la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso y etanólico del cuerpo fructífero seco del hongo *Grifola frondosa* por medio de un

¹ Sommerkamp I. 2006. Ubicación de *Grifola frondosa* en Guatemala. Guatemala. (Comunicación personal).

ensayo hemolítico *in vitro* que valoró la actividad del sistema de complemento sobre eritrocitos de carnero y conejo.

Los resultados que se obtuvieron utilizando los extractos producidos en el laboratorio, servirán para iniciar un proceso de validación y confirmación de los resultados obtenidos en otros países, siendo de gran utilidad para encontrar un efecto del hongo en enfermedades que requieran de la acción pro-inflamatoria del complemento.

III. ANTECEDENTES

A. SISTEMA INMUNE

La inmunología estudia los diferentes mecanismos mediante los cuales el cuerpo se defiende de agentes infecciosos y otras sustancias extrañas en su ambiente. Definida de modo amplio, la inmunología cubre muchas líneas de defensa, incluso las barreras físicas como piel, sustancias químicas protectoras en la sangre y en los líquidos tisulares, y las reacciones fisiológicas de los tejidos a la lesión o a la infección. Pero con mucho, las estrategias de defensa más elaboradas dinámicas y eficaces se realizan por las células que han evolucionado adquiriendo capacidades especializadas para reconocer y eliminar sustancias y organismos perjudiciales en potencia. Algunas de estas células defensoras circulan de manera continua por todo el cuerpo en busca de invasores extraños; otras son centinelas estacionados a la espera en tejidos sólidos o en superficies corporales. Debido a las funciones centrales que desempeñan en la defensa del huésped, estas células son el objetivo principal de la inmunología contemporánea (3, 4).

Siempre que un patógeno logra superar las barreras de la superficie y penetra el cuerpo humano, éste se enfrenta a una cascada de diversos factores que vigilan los tejidos internos. Generalmente, estas defensas internas se agrupan en dos sistemas funcionales con base a la resistencia que confieren contra un patógeno particular, así pues se puede hablar de la inmunidad innata o natural que es aquella que se activa y opera desde la primera vez que el cuerpo se enfrenta a un patógeno; no requiere de un encuentro o exposición previa al agente, ni tampoco se modifica significativamente con exposiciones repetidas al patógeno durante toda la vida de un individuo; y la inmunidad adquirida que es la resistencia del cuerpo humano 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 específico (3-5).

Los sistemas inmunes innato y adquirido se componen, cada uno, de numerosos elementos que tienen la capacidad para llevar a cabo diferentes funciones protectoras. 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 mediada por células o inmunidad celular. El resto de componentes son macromoléculas solubles que circulan en la sangre y en el líquido extracelular, haciendo a estos fluidos inhóspitos para los organismos invasores, aun en ausencia de los tipos de células defensoras; las defensas de este tipo, libres de células, se denominan inmunidad humoral (3, 4).

B. INMUNIDAD INNATA

La resistencia del cuerpo contra muchos patógenos la proporcionan proteínas y enzimas del torrente circulatorio y líquidos titulares. Estas proteínas son los efectores de la inmunidad innata humoral, y comparten rasgos comunes, los cuales también son características del sistema inmune innato global. La primera de tales características es que dichas proteínas se expresan continuamente durante toda la vida, sin importar si sus efectos protectores se requieran o no en un momento determinado; segunda, aun cuando muchas de estas proteínas se pueden producir en grandes cantidades durante periodos de mayor necesidad, sus propiedades intrínsecas nunca se modifican. Las características de estas proteínas ya se encuentran presentes desde el nacimiento, de manera que no sufren variación durante la vida del individuo. Tercera, aunque estas proteínas llevan a cabo funciones muy específicas a nivel molecular, por lo general, reconocen blancos o sustratos identificables dentro de una amplia gama de microorganismos diferentes pero no se encuentran presentes en el cuerpo en condiciones normales. La capacidad de reconocer y responder a carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos distintivos es una propiedad clave que distingue al sistema inmune innato del sistema adquirido (3-5).

C. INMUNIDAD ADQUIRIDA

La inmunidad adquirida se desarrolla cuando el cuerpo está expuesto a varios antígenos y construye una defensa que es específica para dicho antígeno. Los linfocitos son glóbulos blancos que pueden ser de tipo B o T. Los linfocitos B producen anticuerpos, los cuales se adhieren a un antígeno específico y facilitan la destrucción del antígeno por parte de los fagocitos y los linfocitos T atacan los antígenos directamente y proporcionan control de la

respuesta inmune. Las células B y T se desarrollan específicamente para un tipo de antígeno y cuando hay exposición a un antígeno diferente, se forman células B y T diferentes (6).

A medida que los linfocitos se desarrollan, aprenden normalmente a reconocer los tejidos que son parte del cuerpo (propio) y a distinguirlos de los tejidos y partículas que no se encuentran normalmente en él (no propio). Una vez que se forman las células B y T, algunas de ellas se multiplican y brindan "memoria" para el sistema inmunológico, lo que le permite responder más rápida y eficientemente al estar en contacto por segunda ocasión con el mismo antígeno, y en muchos casos puede prevenir la enfermedad (3, 7).

D. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es una secuencia compleja e intrincadamente regulada de procesos que involucra varios tipos celulares. Se desencadena cuando un antígeno ingresa al cuerpo y encuentra una clase especializada de células llamadas células presentadoras de antígeno; estas células capturan una cantidad diminuta del antígeno y la exhiben de manera que puede ser reconocida por linfocitos T cooperadores específicos de antígeno. 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 la mayor parte de los casos, estos inactivan o eliminan exitosamente al antígeno. 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 reguladoras. También pueden interactuar de modo simultáneo con otros tipos celulares o componentes del complemento, cininas o sistemas fibrinolíticos, lo cual origina la activación de los fagocitos, la coagulación de la sangre o el inicio de la cicatrización de las heridas. Las respuestas inmunitarias pueden ser tanto localizadas como sistémicas, pero casi siempre son específicas y centran su fuerza total contra el antígeno mientras originan poco o ningún daño a los tejidos normales del huésped. Las respuestas también se controlan de manera precisa y terminan normalmente poco después de que se elimina al antígeno en cuestión (3, 4).

E. LINFOCITOS

Las células del sistema inmune adaptativo son los linfocitos B y T que derivan de células madre hematopoyéticas pluripotenciales de la médula ósea. Las células B están involucradas en la respuesta inmune humoral, mientras que las células T en la respuesta inmunitaria mediada por células.

1. Linfocitos B

La característica definitiva para la línea celular B es su capacidad para sintetizar proteínas llamadas inmunoglobulinas. Ninguna otra célula expresa estas proteínas. Las inmunoglobulinas son una familia muy diversa de proteínas, 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. En los linfocitos B en reposo o células de memoria, las inmunoglobulinas se expresan sólo en la superficie celular, donde actúan como receptores unidos a la membrana para antígenos específicos. En contraste, las células efectoras de línea celular B o células plasmáticas están especializadas de modo único para secretar cantidades grandes de inmunoglobulinas en su medio circundante. Las inmunoglobulinas secretadas conservan su característica de reconocer y fijar a sus ligandos específicos.

El enlace de un anticuerpo a su antígeno blanco puede originar diversos efectos benéficos para el huésped, por ejemplo, inactivar toxinas, evitar que los virus puedan adherirse a las células del huésped o actuar como opsoninas que promueven la fagocitosis, entre otros. Las células B también desempeñan dos funciones adicionales en el sistema inmunitario. En primer lugar, pueden funcionar como células presentadoras de antígeno al transformar y mostrar las sustancias extrañas de manera que los linfocitos T puedan reconocerlas. En segundo lugar, las células B activadas pueden secretar ciertas linfocinas, así como otros factores que influyen en el crecimiento y las actividades de otras células inmunológicamente importantes (3, 4, 7).

2. Linfocitos T

Los linfocitos T, detectan la presencia de sustancias extrañas por medio de proteínas de superficie conocida como receptores de célula T. Estos receptores están relacionados de

cerca con las inmunoglobulinas, comparten con ellas varias propiedades estructurales y funcionales, sin embargo, a diferencia de las inmunoglobulinas, las proteínas del receptor de célula T nunca se secretan y como resultado, las células T carecen de la propiedad de atacar sus blancos a grandes distancias. Los dos subgrupos de células T más importantes pueden distinguirse por dos proteínas de superficie conocidas como CD4 y CD8. La mayor parte de linfocitos T que expresan la proteína CD8 tienen actividad citotóxica, es decir, la propiedad de matar células que tengan moléculas extrañas en su superficie, estos son de extrema importancia en infecciones virales. A diferencia los linfocitos que expresan la proteína CD4 en su superficie, casi nunca son citotóxicos, sino más bien funcionan como células T cooperadoras promotoras de la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares (8).

F. SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El complemento es un término colectivo utilizado para referirse a un grupo de proteínas del plasma y de la membrana celular, que desempeñan una función crítica en el proceso de defensa del individuo. Este sistema del que en la actualidad se conocen más de 30 proteínas, actúa al menos en cuatro vías principales. La primera función y la mejor conocida del sistema, es originar lisis de células, bacterias y virus recubiertos. La segunda es mediar el proceso de opsonización en el cual células ajenas, bacterias, virus y hongos entre otros, se preparan para fagocitosis. Este proceso incluye recubrir la partícula extraña con fragmentos específicos del complemento que pueden reconocerse por receptores situados en las células fagocíticas. La tercera función es la generación de fragmentos peptídicos que regulan las características de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Estas proteínas tienen una función principal en la vasodilatación en el sitio de inflamación, adherencia de los fagocitos del vaso, la emigración dirigida de las células fagocíticas hacia áreas de inflamación y, al final, la eliminación de agentes infecciosos del cuerpo. La cuarta función del complemento es ayudar a regular la actividad biológica de las células (3, 4).

1. Nomenclatura

Las proteínas de la vía clásica y los componentes terminales se denominan con números que siguen a la letra C. Las proteínas de la vía alterna, por lo general, se

denominan con letras. Las proteínas de cada vía interactúan en una secuencia precisa. Cuando falta una proteína, como sucede en algunas deficiencias genéticas, la secuencia se interrumpe en ese punto. Los primeros pasos en el proceso de activación se asocian con el ensamble de fragmentos del complemento para activar enzimas que se unen a las proteínas siguientes en la secuencia, con el objeto de continuar la reacción en cascada. Estas enzimas se identifican con una barra colocada sobre el símbolo del componente, para identificar actividad enzimática. En la ruta clásica (incluyendo el sistema de ataque a la membrana), los componentes son (según su orden de actuación): C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. Muchos de ellos son proenzimas (zimógenos) que requieren su rotura proteolítica para convertirse en enzimas activas, las formas inactivas se denominan colocando una "i" delante del componente respectivo. Cuando un componente se escinde proteolíticamente en dos, el fragmento de mayor tamaño se designa colocando tras la denominación del componente original una "b"; el fragmento de menor tamaño se designa con una "a" tras el nombre del elemento original. Para esta regla existe una excepción: el fragmento grande derivado de C2 se llama C2a, y el fragmento pequeño, C2b (3, 4, 9).

2. Vías de activación del complemento

La mayor parte de las proteínas de acción temprana de la cascada del complemento están presentes en la circulación de manera inactiva. Las proteínas sufren activación secuencial para ejercer finalmente sus efectos biológicos. En el plasma operan tres vías principales para la activación del complemento:

- a) Vía clásica
- b) Vía alterna
- c) Vía de la lectina de unión a mananos

a) Activación del complemento por la vía clásica: En la mayor parte de los casos, la vía clásica se inicia mediante la unión del anticuerpo a un antígeno. Una molécula única de inmunoglobulina M (IgM) en una superficie antigénica, o bien dos moléculas de IgG de subclases apropiadas unidas, pueden activar el primer componente de la vía clásica C1. El C1 es un complejo macromolecular constituido por tres proteínas distintas (C1q, C1r y C1s) que se mantienen juntas por iones calcio. El C1q tiene un centro y seis brazos radiales cada

uno de los cuales termina en una formación globular. La porción globular reconoce y se une a los fragmentos Fc de la inmunoglobulina. Después de activarse el C1, este se enlaza y corta a C4, entonces se libera el fragmento más pequeño, C4a, el péptido más grande, C4b se une a la célula blanco para continuar la cascada del complemento. En presencia del ion magnesio, el C4b puede interactuar y unirse con el siguiente componente de la serie, una molécula de cadena única, denominada C2. El C2 se une al C4b, y se corta en presencia de C1s. El fragmento mayor de la rotura del C2 (C2a), que contiene el sitio enzimático, permanece en el complejo con C4b para continuar la cascada del complemento. El complejo C4b y C2a desarrolla una nueva propiedad: la de unir y escindir el siguiente componente de la serie, el C3; por esta razón, se denomina convertasa C3 de la vía clásica. El complejo peptídico C4b2a es inestable y puede liberar el péptido C2a como fragmento enzimáticamente inactivo; no obstante, el C4b unido al blanco puede aceptar otro C2 y, en presencia de C1 activo, regenera una convertasa con la propiedad de continuar la cascada de complemento. La convertasa C3 se une y activa al C3 cortando esta molécula en dos fragmentos C3a y C3b. Se libera el fragmento más pequeño C3a y el mayor C3b puede unirse covalentemente con un aceptor adecuado. Las moléculas de C3b que se unen directo al C4b, continúan la cascada. El complejo formado por C2a, C4b y C3b, puede unirse y escindir a C5 liberando un pequeño fragmento denominado C5a. El fragmento mayor C5b no se une de manera covalente y solo se estabiliza hasta unirse con C6. Cuando el complejo C4b2a3b5b6 se une a C7, tanto C6 como C7 se vuelven hidrofóbicos, este complejo es en parte soluble en lípidos y puede insertarse en la bicapa de la membrana celular. Cuando el C4b2a3b5b67 se une a C8, se forma un pequeño canal en la membrana celular que es ampliado al unirse a una o varias moléculas de C9. El canal tiene una superficie hidrofóbica externa y un canal central hidrofílico que permite el paso de iones y agua, causando lisis celular, este conjunto de proteínas que forman el poro se conocen como: complejo de ataque a la membrana (CAM) (3, 4).

b) Activación del complemento por la vía alterna: Filogenéticamente es más primitiva que la vía clásica. Su activación se lleva a cabo fundamentalmente por polisacáridos y estructuras poliméricas similares. La presencia de anticuerpos no es esencial para su activación. Esta vía es de gran importancia en el sistema inmunitario innato y

representa otro medio adicional para la activación de la cascada del complemento. La cascada se inicia cuando la molécula de C3 circulante en el plasma sufre hidrólisis espontánea en su unión tioéster, generando una especie con una conformación $C3(H_2O)$, esta actúa como C3b en presencia de iones magnesio uniéndose al factor B, e interactuando con el factor D que produce la liberación del Ba. El complejo C3bBb se une a una molécula adicional de C3 y la escinde liberando C3a. El resultado es la formación del complejo C3bBbC3b, que puede unirse a C5 para continuar la cascada del complemento siguiendo los pasos finales de la vía clásica (3, 9).

c) Activación del complemento por la vía de la lectina de unión a mananos: Es una especie de variante de la ruta clásica, mas sin embargo se activa sin la necesidad de la presencia de anticuerpos. Su activación se lleva a cabo por medio de una MBL (Manosa Binding Lectina/Lectina de Unión a Manosa) que detecta residuos de este azúcar en la superficie bacteriana, y activa el complejo C1qrs. Una vez fijada a una superficie, la MBL puede activar dos serina-proteasas relacionadas con MLB: MASP-1 y MASP-2 (MBL-associated serine proteases). Estas proteasas comparten homología estructural con C1r y C1s. La MASP-2 activada lisa C4 y así genera una convertasa de C3: C4b2a. Se cree que MASP-1 lisa C3 y puede activar la vía alterna directamente. Los componentes terminales de esta vía de activación proceden como la vía clásica (10).

3. Reguladores del sistema del complemento

La regulación de este sistema es de importancia fundamental para evitar la destrucción de los propios tejidos. Este sistema esta bien regulado por varias proteínas solubles, que se asocian a las membranas e inhiben la activación del complemento en múltiples pasos. Las principales funciones de la regulación son la limitación o detención de la activación del complemento como respuesta a estímulos fisiológicos y evitar la activación anormal sin la presencia de microorganismos y anticuerpos (3, 9).

a) Inhibidor C1 (C1INH): Esta proteína es un inhibidor de serina proteasa que reconoce a los fragmentos activados de C1r y C1s y los destruye uniéndose físicamente al sitio activo de la enzima.

b) Proteína unida a C4, factor I y factor H: La proteína unida a C4 (C4bp) y el factor I, se encargan de la regulación de C4b. El C4bp se une a C4b y facilita su escisión por medio de la enzima proteolítica factor I. En la superficie del blanco, no se requiere C4bp para la escisión de C4b por el factor I, pero su presencia puede acelerar este proceso. El factor I también actúa de modo proteolítico para inactivar C3b y C3(H₂O). Esta actividad requiere un cofactor denominado factor H. El factor H actúa como un acelerador de la rotura de C3 en la superficie celular formando una sub-unidad iC3b que es inactiva para continuar la cascada del complemento, aunque es activa como opsonina.

c) Proteína S, clusterina y factor J: La proteína de control S o vitronectina, interactúa con el complejo C5b67 y se une al sitio de enlace de su membrana para evitar su unión a las células. Después de la unión de la proteína S al C5b67 en la fase líquida, puede darse la unión de los fragmentos C8 y C9 al complejo, pero este ha perdido la capacidad de unirse a las membranas lipídicas y por lo tanto no puede lisar las células blanco (3).

4. Pruebas para la valoración del Sistema de Complemento

Actualmente pueden medirse los nueve componentes principales de la vía clásica, algunos de la vía alterna e inhibidores; los análisis consisten en la cuantificación de la lisis total y análisis inmunoquímicos (inmunodifusión), estos últimos proveen concentraciones moleculares, pero no aportan datos referentes a la integridad de las diversas moléculas (9).

a) Ensayos hemolíticos para la valoración de la actividad del sistema de complemento: La inhibición de la actividad del Sistema de Complemento se determina mediante ensayos basados en la hemólisis de los eritrocitos por el complejo de ataque a la membrana (CAM) generado al activarse el sistema de complemento, los eritrocitos actúan como activadores y células blanco, tras esta activación se produce la lisis de eritrocitos liberándose hemoglobina, la cual es utilizada como parámetro para medir la actividad del complemento. Para la vía clásica se emplea eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos de conejo anti-eritrocitos de carnero y en la vía alterna el ensayo es similar, dependiendo de la lisis de eritrocitos de conejo, se debe inactivar la vía clásica utilizando

ácido etilenglicol tetracético (EGTA) como agente quelante de calcio (necesario para su activación).

b) Prueba de Fijación del Complemento: Se originó en la interacción antígeno y anticuerpo. Depende de dos etapas, la primera antígeno-anticuerpo, reacciona en presencia de una cantidad conocida del complemento, el cual se consume; la siguiente etapa consiste en medir la actividad hemolítica del complemento fijado, y de esta forma la cantidad de antígeno o anticuerpo de la mezcla inicial (9, 11, 12).

G. INMUNOMODULACIÓN

El término inmunomodulación comprende cambios en el sistema inmunitario del cuerpo por sustancias que activan o debilitan su función. Estas son llamadas inmunomoduladoras. A los inmunopotenciadores se les atribuyen funciones importantes en las inmunodeficiencias causadas por algunos tipos de infecciones virales y bacterianas y en especial en el tratamiento contra el cáncer cuando las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune. Estos agentes generalmente son combinados con la quimioterapia y la radioterapia para mejorar la respuesta del cuerpo y su recuperación. Pueden utilizarse también para potenciar la respuesta inmune del cuerpo contra los antígenos sintéticos de las vacunas, así como para la inmunización experimental en la obtención de antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales. En este último caso a los inmunopotenciadores se les denomina adyuvantes inmunológicos (13, 14).

Los inmunomoduladores pueden actuar en diferentes niveles del sistema inmune, debido a la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células para la respuesta inmune como: linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, neutrófilos, o la producción de mediadores solubles como las citoquinas. Los inmunomoduladores en sus mecanismos de acción pueden actuar de forma específica o inespecífica:

1. Inmunomoduladores de acción inespecífica

Son agentes que logran una estimulación o supresión de la respuesta inmune sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado. Se diferencian en 3 tipos según su acción:

Tipo I: los que actúan sobre el sistema inmune normal.

Tipo II: los que actúan sobre el sistema inmune inmunodeprimido.

Tipo III: los que actúan sobre el sistema inmune funcionalmente normal e inmunodeprimido.

2. Inmunomoduladores de acción específica

Logran su acción sobre células del sistema inmune, por la presencia de un antígeno o inmunógeno dado, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune (15-17).

H. HONGOS MEDICINALES

Los hongos están ampliamente distribuidos en todo el planeta y prosperan en casi todos los climas: tropicales, subtropicales, templados y fríos, donde existan los elementos indispensables para su existencia (materia orgánica y agua). Estos organismos son una fuente alternativa de alimento, debido al gran aporte de proteínas que en algunos casos puede representar hasta el 40% del peso seco del hongo, además son ricos en vitaminas, minerales, aminoácido, fibra y bajos en grasas (18).

Los hongos han sido valorados alrededor del mundo por miles de años por sus características medicinales. En Europa han sido apreciados por su valor gastronómico. En Japón han sido siempre consumidos por sus cualidades curativas y por la creencia en la capacidad que tienen de prolongar la vida. Actualmente los hongos medicinales han cobrado gran importancia debido a su utilización en terapias contra enfermedades como el cáncer y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hipertensión, diabetes, arteriosclerosis, obesidad, entre otros, debido al efecto estimulador del sistema inmune que presentan algunos de sus principios activos. En conclusión son muchos los usos y diversos son los grados de importancia que le dan las distintas sociedades a los hongos, sin embargo

el mayor interés está en las propiedades medicinales que presentan algunas especies exóticas como el Shiitake, Maitake y Reishi. En los últimos 20 años en países como Japón Cuba y Estados Unidos entre otros, se han publicado gran cantidad de estudios que indican el valor terapéutico de muchos de estos hongos, haciendo énfasis en su uso para la creación de nuevos fármacos y tratamientos adyuvantes orientados a aliviar una amplia variedad de padecimientos (1, 19).

I. *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray

1. Generalidades

El hongo *G. frondosa*, en Japón es conocido como maitake, que significa “hongo danzarín”. En Estados Unidos y Europa se le conoce como “gallina de los bosques”. Es un hongo grande, carnoso, de color café grisáceo en las primeras etapas de su crecimiento, y posteriormente adopta una tonalidad gris más clara, aunque algunas variedades pueden llegar a tener un color amarillo claro en la madurez. El cuerpo fructífero está compuesto de múltiples capas sobrepuestas, de 2 a 10 centímetros de diámetro que emergen por ramificaciones del estípote, unidas excéntricamente compartiendo una base común. Los cuerpos fructíferos jóvenes están adornados con finas fibrillas grises. Los poros del reverso del píleo son de color blanco. Este es un hongo de crecimiento lento que suele aparecer en la base de los árboles leñosos, especialmente en robles, olmos, maples, hayas y ocasionalmente en confieras y pinos (1, 2, 20).

2. Consideraciones Taxonómicas.

Grifola frondosa (Dicks.) Gray, se considera el mismo hongo que *Polyporus frondosus* (Dicks.) Fr. y se encuentra estrechamente relacionado con *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. (también conocido como *Grifola umbellata*). *G. frondosa* se diferencia de *G. umbellata* en que el primordio del primero es, café grisáceo a blanco grisáceo, mientras que el cuerpo fructífero inicial de *G. umbellata* es gris claro. Microscópicamente estos dos hongos se distinguen porque las esporas de *G. umbellata* son sustancialmente mas grandes y cilíndricas que las esporas de *G. frondosa* (2, 21).

3. Distribución geográfica

Crece en bosques boreales y septentrionales, en el Norte de América, principalmente en el este de Canadá y a lo largo del noreste y estados meridionales del Atlántico. Raramente es encontrado en el noroeste y en el sureste de los Estados Unidos. También crece en algunas regiones del noreste de Japón y en regiones templadas de China y Europa. Actualmente se ha reportado que el hongo crece de forma silvestre en Chimaltenango, Guatemala (1, 20, 21).²

4. Aspectos microscópicos y miceliares

Posee esporas blancas, ligeramente elípticas (forma de huevo), lisas, hialinas de 6-7 x 3.5-5 μm , con hifas cenocíticas, la hifa madre presenta conexiones empalmadas, con ramificaciones poco frecuentes. El micelio es de color blanco, longitudinalmente lineal, en ocasiones densamente algodonoso en medios enriquecidos, no es rizomórfico. El micelio no forma colonias circulares típicas. Algunas de las regiones del micelio surgen, mientras que otras menguan en su rango de crecimiento. Frecuentemente el micelio desarrolla tonos café claro en las zonas periféricas conforme envejece. Cuando se cultiva en aserrín, el micelio joven es blanco, cuando envejece muchas cepas tienden a desarrollar un micelio con zonas moteadas que van desde amarillo fuerte a naranja oscuro (21).

5. Compuestos activos y mecanismos de acción

Se han identificado fracciones alfa y beta D-glucanos. Los Beta-glucanos están contenidos dentro de la pared celular del hongo y pueden constituir el 10-50% de su peso seco. La estructura natural de la pared celular de polisacáridos, se ramifica en varios componentes (1-6) y (1-3) beta D-glucanos, teniendo un peso molecular cercano a 1.000.000 daltons. La desnaturalización de los compuestos solubles y de los polisacáridos de alto peso molecular en sus subcomponentes más ligeros por medio de una moderada digestión con calor (>100°C) puede mejorar la bioactividad de los beta D-glucanos. Sin embargo el exceso de calor (>250°C) puede reducir los componentes (1-6) y (1-3) beta D-

² Sommerkamp I. 2006. Ubicación de *Grifola frondosa* en Guatemala. Guatemala. (Comunicación personal).

glucanos en fracciones mas pequeñas, disminuyendo la actividad el hongo. Se ha logrado establecer que el grado de ramificación, sustitución y peso molecular de los beta D-glucanos está directamente relacionado con la actividad inmunoestimulante. Otros compuestos encontrados en la estructura del hongo son: Grifolan, grifolin-LE, MT-2, LELFD, grifolan NMF-5N y una proteína fijadora de metales que tiene la capacidad de capturarlos durante la absorción intestinal (1, 20).

Las células dendríticas, son una variedad celular que reside en la piel y mucosas, capaces de detectar sustancias exógenas o endógenas e iniciar la respuesta inmune apropiada, presentando antígenos en su superficie que inducen la activación de otras líneas celulares. Estas células son las primeras en tener contacto con los beta D-glucanos administrados. Cuando los beta D-glucanos entran en la cavidad oral, son detectados por las células de Langerhans de la mucosa oral y luego por las células dendríticas de estómago e intestinos e hígado (células de Kupffer). Los beta D-glucanos que llegan a los ganglios linfáticos son fagocitados por las células dendríticas y presentados en la superficie celular donde estimulan la actividad fagocítica de los leucocitos. La proximidad de estas sustancias a la membrana celular de los linfocitos T (NK) tiene como resultado su activación (22).

Los beta D-glucanos también pueden activar a los linfocitos NK *in situ* en pacientes con cáncer, aumentando significativamente la actividad citotóxica de los linfocitos NK, los niveles de interleucina-2 (IL-2) y mejorando la relación de células T CD4/CD8. Esto explica su utilidad como inmunoestimulante en pacientes con cáncer y sida (23).

Otra vía que explica la acción inmunoestimuladora de *Grifola frondosa*, es el incremento de las citocinas del sistema inmune. Sus principios activos pueden provocar un aumento en la secreción interleucina-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF (factor de necrosis tumoral) y varios interferones.

6. Actividad antihipertensiva

Estudios en Japón han demostrado que el hongo *Grifola frondosa* deshidratado disminuye la presión arterial, peso, niveles de VLDL, colesterol y tejido adiposo. También previene el aumento de la presión arterial si su consumo representa el 5% o más de la dieta diaria. Según estudios realizados en ratas, solo la fracción soluble del hongo en éter muestra actividad hipotensiva significativa al aplicarla por vía oral. Se ha observado que

tres péptidos aislados del hongo tienen la capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina I, disminuyendo considerablemente la presión sanguínea (24-26).

7. Disminución de la grasa corporal y colesterol

Se ha determinado que el consumo diario del hongo *G. frondosa*, inhibe en un 20% el aumento de peso corporal, disminuyendo la acumulación de colesterol en ratas además de disminuir la acumulación de grasas en hígado y tejido adiposo. También se disminuyen los niveles de triglicéridos y colesterol libre mientras se mantienen estables los niveles de HDL. Después de iniciar una dieta con el hongo, el metabolismo de las grasas mejora y la tasa de excreción de colesterol aumenta. Las pruebas de alimentación conducida con ratas hipertensas revelan que si se reconstituye el polvo del hongo con agua y se calienta a 50°C el efecto que inhibe el aumento de peso disminuye un 20% y a 60°C disminuye 80%; al desecar a 80°C el polvo pierde 6% de actividad y a 100°C el 13% (20, 27).

8. Actividad hipoglicemiante

El polisacárido del hongo maitake no afecta los niveles de glucosa en pacientes sanos, sin embargo posee una potente actividad hipoglicémica en pacientes que sufren de diabetes mellitus tipo II. Investigaciones sugieren que la actividad antidiabética producida por el hongo está asociada a los receptores de insulina, el consumo de *G. frondosa*, aumenta la sensibilidad de los receptores facilitando alcanzar niveles normales de azúcar en sangre. La fracción del polisacárido activo consiste en la cadena principal β 1-6 con ramificaciones α 1-4 y en la fracción SX del beta D-glucano (28, 29).

9. Actividad antiviral

Se ha logrado determinar que el extracto de *G. frondosa* sulfatado, previene en un 97% la destrucción *in vitro* de los linfocitos T colaboradores infectados con VIH, además de poseer actividad antiretroviral. El uso del beta D-glucano en pacientes con SIDA mejora la calidad de vida de los pacientes además de disminuir el número de infecciones secundarias asociadas a la enfermedad e incrementar los recuentos de linfocitos CD4.

Se estima que aproximadamente un 40% de los pacientes con SIDA desarrolla sarcoma de Kaposi. Recientemente el Dr. D. Hugnes reportó que una solución de la fracción D de *G. frondosa* mezclada con dimetil sulfóxido (DMSO), puede ser utilizada exitosamente para el tratamiento contra el sarcoma de Kaposi cuando se aplica directamente sobre las lesiones (1, 20).

10. Actividad antitumoral

En 1988 se realizaron ensayos para determinar la actividad inmunomoduladora de *G. frondosa*. A partir del polvo del hongo se aisló un polisacárido crudo ligado a un 30% de proteína, el cual fue nombrado como fracción D (0.4% del hongo deshidratado). La incidencia y aumento del cáncer de vejiga urinaria inducida por un carcinógeno disminuyó cuando se administró una dieta conteniendo 5% de maitake en ratones de laboratorio. Al administrar oralmente la fracción D se produce un aumento de la IL-1, se mejora la actividad de los macrófagos y se potencia la respuesta del sistema inmune. También se ha observado una actividad inhibitoria significativa del extracto acuoso contra células cancerosas del cérvix ($IC_{50} = 2\text{mg/mL}$) y células leucémicas humanas T₄ ($IC_{50}=11\text{mg/mL}$). Debido al potencial del extracto los investigadores concluyeron que los hallazgos preliminares son garantizados. En 1995 H. Namba, reportó que la administración por vía oral de la fracción D reduce la incidencias de tumores en un 91.3% comparando con el 100% de incidencia en ratones control (22, 23).

Namba *et al* notó resultados prometedores para cáncer de pulmón y mama, sin embargo en leucemias, cáncer de huesos y estómago no se obtuvieron los resultados esperados. Se observó disminución de los síntomas y desaparición de los tumores en un 73.3% de los pacientes con cáncer de mama, 46.6% con cáncer de hígado, 66.6% de cáncer de pulmón. Cuando se administró el maitake en conjunto con quimioterapia la respuesta fue del 12-28%. En el 90% de los pacientes la adición de la fracción D del maitake a su régimen, reduce los efectos asociados de la quimioterapia como la pérdida de pelo, leucopenia, náusea vómitos y pérdida del apetito. En el 83% de los pacientes el maitake es efectivo para reducir el dolor. Estos resultados son acordes a los efectos producidos en animales. En dosis altas tanto el extracto acuoso como el metanólico del maitake tienen actividad reductora del dolor en ratas (30, 31).

En 1994 un grupo de investigadores de la universidad médica de Zhejiang y del Hospital de Zhejiang en China, reportaron buenos resultados en el tratamiento de cáncer con maitake. El extracto se utilizó como adyuvante con quimioterapia y radioterapia en un estudio piloto en 63 pacientes con cáncer. Los voluntarios en el estudio recibieron capsulas del extracto después de las comidas, 4 veces al día. En el grupo adyuvante, la tasa total de efectividad contra los tumores sólidos fue de 95.8% y la tasa contra leucemia de 90.91%. Los investigadores dieron una tasa de efectividad de 86.67% al mejoramiento inmune del tratamiento adyuvante (33).

El maitake ha mostrado actividad antitumoral cuando se administra oralmente en ratones con tumores. El constituyente con mayor actividad inmunológica consiste en cadenas ramificadas de β -(1-3)-D-glucanos con un núcleo principal de β -(1-6)-D-glucanos y un 30% de proteína B. Un polisacárido derivado del cultivo del maitake produce una inhibición del sarcoma 180 en un 100% en ratones, con una dosis única de 20mg/kg (IP). Los polisacárido solubles en agua son mas activos que los insolubles, los β -(1-3)-D-glucanos de micelio cultivado en agua mostraron una potente actividad contra el sarcoma 180 en ratones (100mg, IP/5 días), produciendo un radio de inhibición >99% y un regresión completa del tumor en 9/20 ratones. No se encontró actividad cuando el hongo se administró oralmente (23).

11. Incremento de la actividad citotóxica

Una N-acetilgalactosamina específica se aisló del cuerpo fructífero de *G. frondosa*. La lectina aislada aglutinó todos los tipos de eritrocitos de igual forma y fue citotóxica contra células HeLa a una concentración mínima de 25 μ g/mL. Después de incubar la lectina (100 μ g/mL) con el mismo volumen de azúcar GalNAc como hapteno a una concentración de 0.049 mM (10.8 μ g/mL), la lectina no presentó citotoxicidad. La citotoxicidad está asociada a la lectina unida a cadenas de azúcar en las células HeLa y es independiente de la unión de las células por la lectina. Por otro lado, entre componentes de peso molecular más bajos, extraídos con cloroformo (C-1), etil acetato (E-1), n-butanol (B-1) del cultivo líquido de *G. frondosa*, C-1 inhibió marcadamente el crecimiento de leucemia linfoide humana de células Molt 4B basado en la citotoxicidad *in vitro*. La estructura química del C-1, aún no ha sido determinada (32, 33).

J. EXTRACTOS PARA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

En general se acostumbra a extraer los productos activos de un hongo o planta con etanol o metanol, ya que prácticamente todos los constituyentes de interés fitoquímico tienen cierta solubilidad en ellos. Existe una regla general útil para preparar suspensiones o dispersiones acuosas de los extractos obtenidos con distintos disolventes, es que los extractos polares presentan menos problema que los de disolventes no polares. Al respecto, los disolventes que se emplean comúnmente en la preparación de extractos para ensayos biológicos presentan un orden de dificultad creciente:

Agua (menor dificultad)

Metanol

Etanol

Acetona

Acetato de etilo

Éter etílico

Cloroformo

Benceno

Éter de petróleo

1. Preparación de extractos primarios

La forma más eficiente de extraer el material vegetal es por percolación. Este método produce las mayores concentraciones de sustancias extraíbles para un disolvente específico, en el menor volumen y evita el uso de calor. Es el procedimiento más eficiente para extracciones acuosas o hidroalcohólicas, y de no menor éxito cuando se utilizan otros disolventes orgánicos. La eficiencia del método depende fundamentalmente de la forma de empaque del material vegetal en el percolador y de la forma de llevar a cabo el procedimiento (34, 35).

2. Extractos acuosos

Son los que emplean agua como disolvente de extracción (menstruum), el extracto resultante debe congelarse y liofilizarse para obtener un polvo seco. Este debe almacenarse a 2–10°C, de preferencia en un recipiente hermético y en un desecador. Si el extracto se humedece se hace gomoso o líquido, no es conveniente utilizarlo para pruebas farmacológicas. Debe por tanto, prevenirse la absorción de humedad del aire evitando la exposición frecuente o fallas en el cierre del desecador (35).

Otra precaución a considerar es que las soluciones o suspensiones ya preparadas de los extractos liofilizados deben ser siempre frescas, recién elaboradas y cualquier sobrante deber ser eliminado al final de los experimentos (34, 35).

La mayoría de los extractos de plantas constituyen un medio excelente de cultivo para los hongos aún cuando se conserven en el refrigerador. Dado que los hongos pueden alterar la composición química del extracto, los efectos biológicos de tales extractos pueden no ser válidos (34, 35).

3. Extractos hidroalcohólicos

Los extractos hidroalcohólicos pueden ser preparados de la misma manera que los acuosos. El alcohol debe ser eliminado del percolado hidroalcohólico mediante concentración *in vacuo*, manteniendo la temperatura del baño por debajo de los 50°C. Conforme se evapora el etanol, puede precipitar algo de material insoluble. Dado que no puede predecirse si el material insoluble es o no activo, deberá liofilizarse el concentrado completo (34).

4. Extractos con disolventes orgánicos

De acuerdo a los lineamientos de la OMS todos los extractos primarios que sean sometidos a evaluación biológica deber ser preparados con agua, o con mezclas de agua – etanol, ya que son éstos los disolventes más frecuentes y disponibles en las poblaciones indígenas donde se utilizan los recursos vegetales medicinales. Por otra parte, una vez establecida la actividad en éste disolvente inicial, el procedimiento de fraccionamiento con disolventes, mediante una extracción líquido – líquido o bien por separación cromatográfica, proporcionará nuevas fracciones que requerirán de ensayo biológico (34).

IV. JUSTIFICACIÓN

El hongo *Grifola frondosa* ha sido estudiado en muchos países y su actividad inmunomoduladora es bien conocida. El extracto acuoso de este hongo es capaz de activar las células T, tiene actividad antitumoral y aumenta la actividad citotóxica. Existen pocos estudios acerca del efecto sobre el sistema del complemento. Por lo tanto, los resultados obtenidos, utilizando los extractos producidos en el laboratorio, a partir de cuerpos fructíferos secos de cepas provenientes de Japón, proporcionaron los primeros datos en Guatemala sobre la actividad del hongo.

Los perfiles riesgo-beneficio y costo-beneficio de los hongos medicinales como *G. frondosa* son superiores a muchos de los fármacos antineoplásicos y antiretrovirales. La administración durante períodos prolongados es segura, además de mejorar los niveles de energía del paciente, acelerar la recuperación de la médula ósea afectada y proteger y recuperar las funciones hepáticas. Por otro lado también disminuye los efectos secundarios de las terapias anticancerosas y antiretrovirales, al mismo tiempo que incrementa la sensación de bienestar en el paciente.

En los últimos años se ha registrado el crecimiento de cepas silvestres del hongo *G. frondosa* en Guatemala, cuando anteriormente en el continente americano sólo se podía localizar en el norte de los Estados Unidos, por lo que determinar las capacidades inmunomoduladoras del hongo cobra mayor validez al tomar en cuenta que, en el país existen las condiciones adecuadas para el cultivo de cepas seleccionadas para terapia.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la actividad inmunomoduladora del hongo seco *Grifola frondosa* proveniente de Japón sobre el sistema de complemento.
2. Aportar los primeros resultados experimentales sobre la actividad inmunomoduladora sobre el complemento de *Grifola frondosa* en Guatemala.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar a través de un ensayo hemolítico para la actividad del complemento, el efecto inmunomodulador de los extractos acuoso y etanólico de *Grifola frondosa*.
2. Comparar el efecto inmunomodulador del extracto acuoso y etanólico de *Grifola frondosa* y determinar el extracto que posee mayor actividad inmunoestimuladora.

VI. HIPÓTESIS

Los extractos etanólico y acuoso del hongo *Grifola frondosa* tienen un efecto inmunomodulador, sobre la hemólisis producida por el sistema de complemento.

El extracto acuoso del hongo *Grifola frondosa* tiene una mayor actividad inmunomoduladora, que el extracto etanólico, sobre la hemólisis producida por el sistema de complemento.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

Extractos del hongo *Grifola frondosa*.

B. MUESTRA

1. Extracto etanólico del cuerpo fructífero entero y seco del hongo *Grifola frondosa* de una cepa proveniente de Japón.

2. Extracto acuoso del cuerpo fructífero entero y seco del hongo *Grifola frondosa* de una cepa proveniente de Japón.

C. RECURSOS

1. Recursos humanos

a) Asesores

Licenciada Margarita Paz de Ramírez

Madre Ivonne Sommerkamp

b) Tesista

Bachiller Alejandro Mazariegos Lanseros

2. Recursos Institucionales

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

b) Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-

1. Recursos materiales

a) Equipo

Autoclave

Balanza analítica

Campana de Flujo laminar

Congelador

Liofilizador

Rotavapor

Centrífuga

Incubadora 37°C

Lector de ELISA

Refrigeradora

b) Materiales

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

Mezcla de suero humano normal (MSH)

Mezcla de suero humano inactivado (30 min. a 56°C)

Solución salina

Agua destilada

Agua desmineralizada

Solución de Alsever

Eritrocitos de conejo y de carnero

Anticuerpos contra eritrocitos de carnero (AMBOCEPTOR)

Extracto etanólico y acuoso del hongo *Grifola frondosa*

Amortiguador salino de veronal concentrado 5 veces (VSB), como solución madre para preparar: VSB° (no contiene aditivos); VSB+2 (contiene 0.5 mM de Mg⁺² y

0.15 mM de Ca^{+2}); EGTA-VB (contiene 2.5 mM de Mg^{+2} y 8 mM de etilenglicol-bis(β -aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA)).

D. PROCEDIMIENTO

Se realizó un ensayo para determinar la actividad inmunomoduladora del hongo, basado en la hemólisis de los eritrocitos de carnero por el CAM generada tras la activación del sistema de complemento, los eritrocitos fueron los activadores y células diana; la absorbancia de la hemoglobina liberada se utilizó como parámetro en la medida de la actividad del complemento (9, 36).

1. Ensayo hemolítico para la Valoración de la Actividad del Sistema de complemento

a) Determinación hemolítica para la actividad de la vía clásica del complemento.

i. Se sensibilizó y preparó la suspensión de eritrocitos

- Se mezclaron 2 mL de eritrocitos de carnero en Alsever con aproximadamente 8 mL de solución salina.
- Se centrifugó a 2500 rpm (1250x g) por 5 minutos
- Se removió el sobrenadante, se resuspendió el pelet en 10 mL de solución salina y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos. Se repitió este paso una vez y se mantuvo el pelet de células empacadas sobre hielo.
- Se suspendieron 200 μL de células empacadas en 9.8 mL de VSB⁺⁺
- Se mezclaron 100 μL de esta suspensión con 4.9 ml de solución salina.
- Se midió la densidad óptica (DO) a 410 nm. Una DO_{410} de 0.522 corresponde a una suspensión de eritrocitos de carnero de 4×10^8 células/mL. Se mantuvo la suspensión eritrocítica en hielo.
- Se sensibilizó la suspensión eritrocítica con amboceptor, utilizando una mezcla de 1 mL de amboceptor (1:100) y 7 mL de VSB⁺⁺, al que se agregó 8 mL de la suspensión eritrocítica, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se centrifugó; después se lavó con solución salina tres veces

- Se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración de 1.15×10^8 células/mL y se mantuvo en hielo hasta su utilización.
- Fueron agregados 100 μ L de muestra en los pozos respectivos y se realizaron diluciones seriadas, partiendo de una concentración de 500 μ g/mL.

ii. Preparación de controles para la medición de actividad sérica

- Fueron agregados 50 μ L de VSB++ a los pozos H1-H6 (actividad del suero).
- Fueron agregados 100 μ L de VSB++ a los pozos H7-H9 (0% de hemólisis).
- Fueron agregados 100 μ L de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis).

iii. Preparación de la dilución del suero y preincubación

- Fueron agregados 50 μ L de suero inactivo (63 μ L de suero inactivo mezclado con 5 ml de VSB++) a los pozos H4 – H6 y blancos de muestra.
- Se mezcló 125 μ L de la mezcla de suero humano (activo) con 10 mL de VSB++ y se agregó de ésta, 50 μ L a los pozos control y muestra problema.
- Se cubrió la placa y preincubó a 37°C por 30 minutos.

iv. Incubación

- Después de la preincubación fueron agregados 50 μ L de la suspensión de ShEA a cada pozo.
- Se incubó a 37°C por 60 minutos, se cubrió la placa.
- Se centrifugó la placa a 2500 rpm por dos minutos

v. Medición de hemólisis

- Fueron agregados 200 μ L de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
- Se transfirieron 50 μ L de los sobrenadantes a la placa correspondiente.
- Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en lector ELISA (33).

b) Determinación hemolítica para la actividad de la vía alterna del complemento

i. Preparación de la suspensión de eritrocitos

- Se lavaron tres veces los eritrocitos de conejo con solución salina.
- Se preparó con los eritrocitos una suspensión a una concentración de 1.15×10^8 células/mL. Se mantuvo en hielo hasta su utilización.
- Fueron agregados 100 μ l de muestra en los respectivos pozos y se realizó diluciones seriadas iniciando con una concentración de 500 μ g/mL.

ii. Preparación de controles para medición de la actividad sérica

- Fueron agregados 50 μ L de solución tampón (EGTA-VB) a los pozos H1 – H6 (actividad del suero).
- Fueron agregados 125 μ L de EGTA- VB a las filas H7-H9 (0% de hemólisis).
- Fueron agregados 125 μ L de agua desmineralizada a H10-H12 (100% de hemólisis).

iii. Preparación de la dilución del suero y preincubación

- Fueron agregados 25 μ L de solución de suero inactivo (mezclar 500 μ L de suero inactivo con 500 μ L de EGTA-VB) a los pozos H4 –H6 y blancos de muestra.
- Se mezcló 1 mL de suero activo con 1 mL de EGTA-VB, y se añadió 25 μ L de ésta a los pozos control y muestra problema.
- Se cubrió la placa y se preincubó a 37°C por 30 minutos.

iv. Incubación

- Después de la preincubación fueron agregados 25 μ L de la suspensión de eritrocitos de conejo a cada pozo.
- Se incubó a 37°C por 30 minutos, se cubrió la placa.
- Se centrifugó la placa a 2500 rpm por dos minutos.

v. Medición de hemólisis

- Fueron agregados 200 µL de agua desmineralizada a los pozos de una placa de fondo plano.
- Fueron transferidos 50 µL de los sobrenadantes a la placa correspondiente.
- Se midió la densidad óptica (DO) a 405 nm en lector ELISA (9, 34)

c) Cálculos

i. Se determinó la actividad sérica expresada como porcentaje de lisis.

$$\% \text{ de lisis} = \frac{\text{DO}_{405} \text{ promedio (H1,H2,H3)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (H4,H5,H6)}}{\text{DO}_{405} \text{ promedio (H10, H11, H12)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (H7,H8,H9)}} \times 100$$

ii. Actividad inhibitoria de la muestra vrs. Control.

Ejemplo: para la concentración más alta de la muestra (A1,A2 y A3)

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{DO}_{405} \text{ promedio (A1,A2)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (A3)}}{\text{DO}_{405} \text{ promedio (H1, H2, H3)} - \text{DO}_{405} \text{ promedio (H4, H5, H6)}} \times 100$$

iii. Cálculo de CI_{50}

Se realizó la gráfica de % de inhibición vrs. Log de concentración, con la recta de regresión lineal obtenida (al menos 4-5 valores significativos) se extrapola el valor del 50% de inhibición para obtener el CI_{50} (9, 34).

Las respuestas medidas son:

i. Positiva: si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibitoria) en un 50% la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica y si la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria (CI_{50}) fue menor a 25µg/mL.

ii. Negativa: si la concentración de hemoglobina producida por el extracto quedó inalterada comparada frente al resultado de la actividad sérica o la CI_{50} fue mayor a 16µg/mL.

E. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Tipo de estudio:

Experimental totalmente al azar. Se realizó una curva, mostrando la actividad sérica de un pool de sueros humanos normales, eligiéndose la concentración que demostró una actividad comprendida entre 30-70%, que se tomó como control de la funcionalidad de todos los componentes del sistema de complemento presentes en el suero. Durante el ensayo se utilizaron cuatro tratamientos distintos:

- a) Control positivo: agua desmineralizada para obtener un 100% de hemólisis.
- b) Control negativo: solución buffer con una actividad hemolítica de 0%.
- c) Extracto acuoso del hongo *Grifola frondosa*.
- d) Extracto etanólico del hongo *Grifola frondosa*.

2. Variables de interés:

- a) Variable independiente: extracto acuoso y etanólico del hongo *Grifola frondosa*.
- b) Variable dependiente: actividad inmunomoduladora de los extractos de *Grifola frondosa*.

3. Ensayo hemolítico para la evaluación de la actividad del sistema de complemento

Se aceptaron los resultados que tuvieron un rango de repetibilidad de +/- 10%, evaluando la respuesta por medio del porcentaje de hemólisis o de inhibición. Se tomó como positivo si se necesitó una concentración del extracto menor a 15 µg/mL para obtener un 50% de hemólisis (CI₅₀) y como negativo si la CI₅₀ fue mayor a 15 µg/mL. Donde se determinó y detectó actividad inmunomoduladora, se evaluaron rangos de concentración iniciando con 500 µg/mL diluyéndose cinco veces la solución madre (1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243) por quintuplicado (9, 34).

F. ANÁLISIS DE DATOS

El extracto acuoso y el extracto etanólico no presentaron actividad sobre ninguna de las dos vías del complemento. Por lo que no fue necesaria la realización de una prueba de t de Student para determinar cuál de los dos presenta una mayor actividad inmnoestimulante.

VIII. RESULTADOS

El porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en la vía clásica del complemento no alcanzó el 50% para ninguno de los dos extractos en sus distintas diluciones. En ambos extractos se observó que la actividad hemolítica aumentó conforme fue disminuyendo la concentración del hongo. Para la vía clásica la actividad hemolítica del suero sin la adición del extracto etanólico fue de 51.3%, y para el extracto acuoso fue de 35.6%. Ambos extractos presentaron una actividad inmunosupresora sobre el sistema del complemento en todas las diluciones (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1. Ensayo hemolítico de la vía clásica del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto etanólico del
hongo *Grifola frondosa***

Dilución	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Promedio	Desviación estándar
1:03	13.45	8.34	12.60	17.88	13.07	3.91
1:09	24.01	26.39	26.73	24.01	25.28	1.48
1:27	30.48	32.86	29.11	27.24	29.92	2.36
1:81	33.03	36.61	36.78	34.22	35.16	1.84
1:243	38.14	38.48	40.52	37.63	38.69	1.27
1:729	38.65	36.44	37.46	35.93	37.12	1.20
1:2187	43.76	41.03	39.33	35.93	40.01	3.28

Fuente: Datos experimentales

**Tabla 2. Ensayo hemolítico de la vía clásica del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto acuoso del hongo
*Grifola frondosa***

Dilución	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Promedio	Desviación estándar
1:03	18.21	17.90	16.82	18.83	17.94	0.84
1:09	27.16	28.70	23.77	24.23	25.96	2.37
1:27	28.86	29.78	30.25	31.33	30.05	1.03
1:81	32.72	31.33	31.48	31.33	31.71	0.67
1:243	35.96	36.42	36.27	36.11	36.19	0.20
1:729	34.72	37.96	36.88	35.96	36.38	1.38
1:2187	39.20	35.49	39.04	34.88	37.15	2.29

Fuente: Datos experimentales

En la vía alterna el resultado obtenido no fue distinto al resultado de la vía clásica. Aunque el porcentaje de hemólisis del suero activo en presencia del hongo superó el 50%, este resultado no duplicó el porcentaje de actividad del suero sin el hongo en ninguna de las concentraciones. Para la vía alterna la actividad hemolítica del suero sin la adición del extracto etanólico fue de 56.9%, y para el extracto acuoso fue de 61.1%. Como se puede observar en las tablas 3 y 4, la actividad del suero se incrementa a medida que se reduce la concentración del hongo en ambas vías, presentando una actividad inmunosupresora para los dos extractos.

**Tabla 3. Ensayo hemolítico de la vía alterna del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto etanólico del hongo *Grifola frondosa***

Dilución	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Promedio	Desviación estándar
1:03	59.73	58.36	55.89	62.88	59.21	2.91
1:09	61.78	62.19	63.29	68.77	64.01	3.24
1:27	64.93	64.11	64.25	71.51	66.20	3.56
1:81	65.75	66.58	66.99	72.88	68.05	3.26
1:243	68.77	68.36	69.86	75.34	70.58	3.24
1:729	70.41	72.05	74.47	76.03	73.24	2.50
1:2187	75.75	78.36	79.73	81.92	78.94	2.58

Fuente: Datos experimentales

**Tabla 4. Ensayo hemolítico de la vía alterna del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto acuoso del hongo *Grifola frondosa***

Dilución	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Promedio	Desviación estándar
1:03	51.10	52.61	53.12	54.76	52.90	1.51
1:09	55.14	57.42	55.78	60.08	57.10	2.20
1:27	62.10	61.72	61.72	66.27	62.95	2.22
1:81	64.00	66.15	64.50	66.02	65.17	1.08
1:243	69.18	71.21	69.06	71.59	70.26	1.32
1:729	72.34	73.99	73.10	75.13	73.64	1.20
1:2187	78.41	78.04	75.51	80.56	78.13	2.07

Fuente: Datos experimentales

Debido a que el extracto acuoso y el extracto etanólico no presentaron actividad inmunoestimuladora sobre ninguna de las dos vías del complemento no fue necesario aplicar la prueba de t de Student para analizar los resultados obtenidos.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados demuestran que la presencia del hongo *Grifola frondosa* está ligada a una acción inhibitoria del sistema del complemento en ambas vías (clásica y alterna) a partir de una concentración de 500 µg/mL del extracto. Esto se afirma al observar que la actividad hemolítica del suero es directamente proporcional a la concentración del extracto etanólico o acuoso del hongo. Debido a que ambas vías del complejo de ataque a la membrana (CAM) se ven inhibidas, es posible que la regulación del complemento se esté dando a partir del complejo C3 común para ambas vías.

La acción reguladora del hongo puede estar relacionada con la activación de la proteína de unión C4 (C4bp) y el factor I, encargados de la regulación de C4b. Estos actúan de modo proteolítico para inactivar el C3b y el complejo C3(H₂O) por medio del cofactor H que acelera la ruptura de la cadena alfa de C3b y C3(H₂O) para formar una molécula parcialmente degradada (iC3b). Esta última, aunque es inactiva para continuar con la cascada del complemento es activa como opsonina. Sin embargo para demostrar esta actividad el extracto del hongo debe ser evaluado por otro tipo de ensayo (3, 4, 10).

Otro punto de regulación puede estar relacionado con la activación de las proteínas vitronectina, clusterina o el factor J, que interactúan con el complejo C5b67 evitando su unión a las membranas biológicas, evitando así la lisis de los eritrocitos. También existe la posibilidad de que algún componente presente en los extractos del hongo *Grifola frondosa* interfiera directamente sobre las proteínas de la cascada del sistema del complemento. Sin embargo, por el ensayo utilizado es muy difícil determinar el punto exacto y la forma de regulación acontecida (3-5).

La comparación entre el extracto acuoso y etanólico del hongo no fue posible debido a que ambos presentaron una actividad inmunosupresora sin mostrar una diferencia significativa en el potencial de inhibición de ambas vías del sistema del complemento.

Tomando en cuenta la actividad inmunosupresora sobre el sistema del complemento, este hongo podría ser utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas por el complemento en cualquiera de sus vías, siempre y cuando los resultados de esta tesis sean corroborados por estudios más profundos.

X. CONCLUSIONES

1. Los extractos acuoso y etanólico del hongo comestible *Grifola frondosa* demostraron una actividad moduladora inhibitoria sobre el sistema de complemento.
2. El extracto acuoso y el extracto etanólico del hongo *Grifola frondosa* posee una actividad inhibitoria sobre el sistema del complemento a concentraciones menores de 500 µg/mL.
3. No fue posible determinar mediante el ensayo aplicado, el punto de la cascada del complemento en el que el hongo *Grifola frondosa* ejerce su actividad inhibitoria.

XI. RECOMENDACIONES

1. Determinar mediante el fraccionamiento de los extractos, el principio responsable de la actividad inhibitoria del sistema de complemento.
2. Establecer nuevas metodologías *in vitro* para la determinación de la actividad específica del hongo sobre el complemento.
3. Realizar los ensayos *in vivo* necesarios para establecer la actividad del hongo en modelos animales.
4. Incorporar cambios técnicos a la metodología original en el sentido de conservar las células empacadas en refrigeración, hasta el momento de su uso y evitar el arrastre de glóbulos rojos desde la placa de ensayo a la placa de lectura, para evitar el aumento de la absorbancia.
5. Repetir este estudio utilizando cepas guatemaltecas para comparar los resultados obtenidos en otros estudios con hongos asiáticos.

XII. REFERENCIAS

1. Hobbs CL. Medicinal mushrooms an exploration of tradition, healing, & culture. Reichi, Shiitake, Maitake, Kombucha. 2ed. Botanica Press, 1995. 252p. p.175-182.
2. Systematic mycology and microbiology laboratory index of fungi database. U. S. Department of agriculture research service. 1 de marzo de 2009.
<http://inf.ars-gri.gov/fungaldatabases/>
3. Stites DP. Terr AI. Parslow TG. Imboden JB. Inmunología básica y clínica. 10ed. Mérida J, trad. México: El Manual Moderno, 2002. 917p. p.65-90, 199-215.
4. Margani R. Fundamentos de inmunología e inmunoquímica. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1996. 970p. p.324-370.
5. Rodak FB. Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ed. Giovaniello O, Oxemberg J, Rondinone S, Taveira J, trad. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2005. 838p. p.127, 136-205.
6. Pancer Z. Cooper M. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24: 497-518.
7. Holtmeier W. Kabelitz D. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 86: 151-183.
8. Janeway C, *et al.* The development and survival of lymphocytes in immunobiology: The immune system in health and disease. 6th ed. Garland Science, New York, 2005. 438p. p.241-316.
9. Alvarez E. Actividad inmunoestimuladora de rizoma y frondas de *Phlebodium pseudoaureum* y *P. decumanum* (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC). Mayo, 2006. 53p. p.29-46.
10. Berrón P, *et al.* El sistema del complemento, vías clásica y de la lectina que se une a la manosa. *Alergia e inmunología pediátrica*, 2003; 12 (2): 46-52.
11. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Section 12 Chapter 146, Biology of the immune systems. USA: Editorial Whitehouse Station, 1995. 2787p. p.1878-1886.
12. Rose N. Friedman H. Manual of clinical laboratory immunology. 3rd edición. USA: American Society for Microbiology, 1986. 129p. p.43-60.

13. TaKx BC. Immunomodulators. Future prospects. *Pharmacology. Weebi Sci* 1992; 14:24-52.
14. Morris HQ. Martínez C. Abdala RT, Campos DO. Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed* 1999; 18 (2):130-137.
15. Azuma I. Synthetic immunoadjuvant applications to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine* 1992; 10:1000-1006.
16. Stites DP. Stogo JD. Fuderbarg UH. Wule VJ. *Inmunología básica y clínica*. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1985. 349p. p.200-250.
17. Gupta RK, *et al.* The role of adjuvant and delivery systems in modulation of immune response to vaccine. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 397 (1):105-113.
18. Daba AS. Ezeronye OU. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *Af Jou Bio* 2003; 12 (2):672-678.
19. Preuss H. Konno S. Maitake mushroom fractions: capture the force of nature's amazing powerful immune boosters, cancer protectors & metabolic activators. *Maitake Magic*. Freedom Press; 2002. 160p. p.122-127.
20. Stamets P. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. 3ed. Ten Speed Press. 2000. 574p. p.349-356.
21. Konno S, *et al.* Efecto anticarcinógeno e hipoglicémico de los polisacáridos del hongo comestible y medicinal maitake [*Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S. F. Gray]. *Int Jou Med Mush*. 2002; 3 (4):185–195.
22. Zhuang C. Solomon P. Valor medicinal del hongo comestible maitake *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray. *Int Jou Med Mush*. 2004; 11 (6):287–313.
23. Talpur N. Echard B. Dadgar A. Effects of maitake mushroom fractions on blood pressure of zucker fatty rats. *Com Mol Path Pharm* 2002; 112 (1-4):68-82.
24. Kyoko A. Nanba H. Otsuka M. Kuroda H. Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chem Pharm Bull* 1988; 36 (3):1000-1006.
25. Talpur NA. Echard BW. Fan AY. Antihypertensive and metabolic effects of whole maitake mushroom powder and its fractions in two rat strains. department of physiology and biophysics. *Mol Cell Biochem* 2002; 237 (1-2):129-136.

26. Namba H. Power of maitake. *He Con.* 1989; 6 (13):69-72.
27. Keiko K. Aoki H. Nanba H. Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Biol Pharm Bull* 1994; 17 (8):1106-1110.
28. Manohar V. Talpur NA. Echard BW. Effects of a water-soluble extract of maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentrations in KK mice. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4 (1):43-48.
29. Suzuki I, *et al.* Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 1989; 37 (2):410-413.
30. Yang DA. Li SQ. Li XT. Prophylactic effects of zhuling and BCG on postoperative recurrence of bladder cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 1994; 32 (7):433-434.
31. Okazaki M. Adachi Y. Ohno N. Structure-activity relationship of (1-3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18 (10):1320-1327.
32. Kodama N. Komuta K. Nanba H. Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *J Med.Food* 2003; 6 (4):371-377.
33. Bartsch W, *et al.* Acute toxicity of various solvents in mouse and rat. *Arz Fors.* 1996; 26 (4):1581-1583.
34. Berezouvskaia IV. Rudzit EA. Effecto of various solvents on acute toxicity of drugs. *Khim Farm Zh.* 1996; 10 (12):39-41.
35. Lemus L. Inmunomodulación de las vías clásica y alterna del sistema del complemento por seis plantas medicinales de Guatemala. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC). Mayo, 2007. 44p. p.28-35.