

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

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LOS
BASIDIOMICETOS COMESTIBLES: *Cantharellus lateritius* Singer (Berk) Singer,
Armillariella polymyces (Pers.: Letell.) Sing & Clem, *Laccaria amethystina* Cooke, *Lactarius
deliciosus* (L. ex Fr) S. F. Gray y *Pleurotus ostreatus* (Jacquim ex Fries) Kummer.**

PRESENTADO POR:

CLAUDIA MARIA RODRÍGUEZ MARROQUÍN
KRISTEL PAOLA RAMÍREZ VALDEZ
NANCY CAROLINA GONZÁLEZ PELLECCER
SILVIA LUCRECIA OLIVA FLORES
STEPHANY WALESKA SÁNCHEZ OVANDO

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
QUÍMICAS BIOLÓGAS

GUATEMALA, AGOSTO DE 2009

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	3
II. RESUMEN	5
III. ANTECEDENTES	7
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. OBJETIVOS	19
VI. HIPÓTESIS	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
VIII. RESULTADOS	35
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
X. CONCLUSIONES	46
XI. RECOMENDACIONES	47
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
XIII. ANEXOS	51

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

El término inmunidad se refiere a la respuesta de un hospedero a un agente agresor y a las consecuencias de ella derivadas. El sistema inmune es el encargado de proteger y mantener la integridad del organismo ante una agresión de agentes patógenos, siendo sus funciones básicas: distinción de lo propio ante lo extraño, especificidad y memoria. Posee una complejidad que compromete a diversos órganos y tejidos que se divide en dos líneas principales de defensa: la inmunidad innata que es una línea que permite controlar a la mayor parte de agentes patógenos y la inmunidad adquirida que suministra una respuesta específica frente a cada agente infeccioso. Se entiende por inmunomodulación la inhibición o activación de una respuesta inmunitaria específica; el control regulador estricto de la respuesta inmunitaria es de importancia fundamental para evitar la destrucción de los propios tejidos del huésped.

En Guatemala la medicina natural se enfoca principalmente en las plantas, mientras que los hongos son considerados solamente como una fuente de alimento. Sin embargo en países como China y Japón, diversas especies de hongos han sido utilizadas como agentes terapéuticos y profilácticos de enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, cáncer y otras.

Un amplio rango de polisacáridos inmunoestimulantes con diferentes estructuras químicas se han aislado de hongos basidiomicetos. La mayoría de la actividad inmunitaria de polisacáridos derivados de hongos se debe a los β -glucanos contenidos en ellos, estas moléculas son responsables de ciertas respuestas inmunes como lo son la liberación de citocinas, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), formación de óxido nítrico (NO) y liberación de metabolitos del ácido araquidónico.

Masihi (2000) sugirió que la actividad ejercida frente a enfermedades infecciosas de los macromicetos y otros agentes fitoterápicos, reside en su capacidad de estimular los mecanismos de defensa del hospedero induciendo la producción de citocinas endógenas. Hu y cols. (2002) indican que polisacáridos antitumorales obtenidos de macromicetos no poseen citotoxicidad directa contra las células tumorales sino que muestran profundos efectos moduladores en el sistema inmune del hospedero.

Mei-Chun Kuo y cols. (2006) reportaron que *Ganoderma lucidum* (Curt. ex Fr.) Karst. induce la liberación de TNF- α e IL-6. Así mismo, Chen y cols. (2004) demostraron que diferentes fracciones de este hongo activan la expresión de IL-1, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, G-CSF y M-CSF.

La especie *Armillariella tabescens* posee actividad hepatoprotectora por intoxicación con etanol; también se ha observado actividad detoxificante contra aflatoxinas B1. Otra de las especies de *Armillariella* que posee actividad importante es *Armillariella mellea* (Vahl.: Fries) Quélet de cuyos cuerpos fructíferos se aisló una metaloproteasa capaz de lisar las cadenas A α y B β del fibrinógeno humano, postulándose así como candidato a la terapia oral fibrinolítica.

Armillariella polymyces (Pers.: Letell.) Sing & Clem es un hongo comestible que puede ser encontrado en los departamentos de Cobán y Huehuetenango, respectivamente. *Laccaria amethystina* Cooke es de suma importancia ecológica, además de que es utilizada como comestible en varias localidades del país. Puede encontrarse a la venta en los mercados de Chimaltenango, El Quiché y Totonicapán.

El basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (Jacquim ex Fries) ha demostrado tener actividad hipoglucemiante prolongada sobre ratones a los que se les indujo diabetes. Se han realizado estudios sobre la máxima productividad de un α -glucano de bajo peso molecular, el cual presenta actividad antiproliferativa de células cancerígenas HT-29 de colon. Así mismo, poseen un proteoglucano proveniente del micelio, el cual presenta actividad estimuladora *in vitro* de los macrófagos peritoneales, sobre las células asesinas naturales y actividad inhibitoria del crecimiento de células tumorales del sarcoma.

Del basidiomiceto ectomicorrízico *Lactarius deliciosus* F. Gray, pocas son las publicaciones enfocadas a la actividad inmunomoduladora del mismo, sin embargo se ha demostrado la actividad antioxidante de los sesquiterpenos de algunas especies del género, que protegen químicamente al hongo contra las agresiones causadas por bacterias, hongos y animales. Así mismo han caracterizado lectinas involucradas en la formación de ectomicorrizas en sus etapas iniciales.

El presente trabajo se encuentra en el ámbito de la investigación de actividad inmunomoduladora en especies de hongos comestibles, y está adscrito al siguiente proyecto de investigación que se llevó a cabo en la Unidad de Bioensayos acreditada por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas que opera en el Departamento de Citohistología:

“Composición química y actividad inmunomoduladora y biocida de basidiomicetos comestibles de Guatemala”

Proyecto FODECYT 30-2007, duración de 18 meses.

II. RESUMEN

La inmunomodulación es la manipulación inespecífica del sistema inmunitario y en algunos países asiáticos se han atribuido efectos inmunomoduladores a diversas especies de hongos comestibles, lo que ha generado todo un campo de investigación alrededor del mundo. Hasta hoy han sido encontradas algunas moléculas responsables de la actividad sobre la respuesta inmune tales como polisacáridos α y β -glucanos y triterpenos, los cuales influyen sobre la inmunidad inespecífica y la inmunidad mediada por células.

El presente estudio tuvo como objetivo la búsqueda de actividad inmunomoduladora de extractos acuosos y etanólicos preparados a partir de los hongos comestibles *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus* por medio de ensayos *in vitro* para la determinación de acción sobre la población linfocítica y sobre el sistema sérico del complemento humano. El criterio de selección de las especies de hongos fue su uso como fuente de alimento en distintas poblaciones de Guatemala.

Previamente a la realización de dichos ensayos *in vitro* los basidiomicetos fueron recolectados en diferentes puntos del país de acuerdo a su ecología y estacionalidad; posterior a la determinación de la especie, cada hongo fue desecado y sometido a extracción por percolación con etanol al 95% como solvente y concentración con rotavapor. El extracto acuoso fue preparado por medio de una infusión con agua desionizada y posterior liofilización. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron bajos, 6.4 % para *A. polymyces*, 2.9 % para *C. lateritius*, 4.3 % para *L. amethystina*, 12.3 % para *L. deliciosus* y 7.8 % para *P. ostreatus*.

El ensayo de linfoproliferación fue realizado mediante la separación de linfocitos de sangre completa de donantes humanos sanos resuspendidos en medio para cultivo celular RPMI-FBS (Sigma Aldrich) los cuales posteriormente fueron enfrentados con diferentes concentraciones de extracto acuoso y etanólico de cada basidiomiceto estudiado. La mezcla fue incubada por cuatro días a 37°C con 5% de CO₂ y la viabilidad celular fue determinada mediante la adición de una sal de tetrazolio (XTT) (Sigma Aldrich) y medición espectrofotométrica a 490 nm.

Para la evaluación de la activación del sistema de complemento se aplicaron bioensayos basados en la hemólisis de eritrocitos de carnero y de conejo para la vía clásica y la alterna, respectivamente. La lectura de la absorbancia producida por la hemoglobina liberada al momento de ocurrir la lisis eritrocitaria por las proteínas del sistema de complemento es usada para la estimación de la actividad de los extractos sobre el mismo.

El análisis estadístico de los porcentajes de inhibición obtenidos se realizó por estadística descriptiva, prueba de hipótesis binomial, ANOVA y prueba de Tukey.

Los cinco basidiomicetos estudiados presentaron actividad inmunomoduladora significativa ($p < 0.05$). En el ensayo linfoproliferativo, los extractos acuoso y etanólico del basidiomiceto *P. ostreatus* (Extracto acuoso: 52 ± 14 % de inhibición a $500 \mu\text{g/mL}$; extracto etanólico: 98 ± 3 % de inhibición a $1000 \mu\text{g/mL}$) y el extracto etanólico de *C. lateritius* (119 ± 13 % de inhibición a $500 \mu\text{g/mL}$) exhibieron actividad inhibitoria sin efecto de dosis-respuesta.

En el ensayo sobre la activación de la vía clásica del complemento, los extractos acuoso y etanólico de *A. polymyces* y *C. lateritius* y los extractos acuosos de *L. amethystina* y *L. deliciosus* mostraron actividad inhibitoria; observándose efecto dosis- respuesta para todos los extractos acuosos, menos para *C. lateritius*. No obstante, la actividad inhibitoria de dichos hongos es observable a concentraciones que exceden la concentración inhibitoria media o CI_{50} ($12 \mu\text{g/mL}$ para *A. polymyces*, $14 \mu\text{g/mL}$ para *L. amethystina* y $0.04 \mu\text{g/mL}$ para *L. deliciosus*).

En la evaluación de la activación de la vía alterna del complemento, los extractos acuosos de *L. amethystina* y *A. polymyces* exhibieron actividad inhibidora con efecto dosis-respuesta (CI_{50} de $5 \mu\text{g/mL}$ para ambos) y el extracto acuoso de *C. lateritius* mostro actividad inhibidora pero sin efecto dosis respuesta.

III. ANTECEDENTES

La medicina natural en Guatemala se basa principalmente en el uso de plantas, mientras que los hongos son considerados solamente como fuente de alimento. Sin embargo en países como China y Japón, los hongos comestibles y medicinales han sido utilizados como agentes terapéuticos y profilácticos frente a distintas enfermedades infecciosas, metabólicas y hasta cáncer, entre otras (1).

Los hongos, con un total de especies de 1.5 millones aproximadamente, son, en comparación con las plantas, caracterizados por su falta de fotosíntesis (habilidad de usar la luz del sol para la producción de materia orgánica). Esta es una de las razones por las cuales ellos se encuentran separados de las plantas en su propio reino, el reino Fungi o Mycobiota (1). Los hongos precedieron al hombre en la evolución por millones de años. No obstante, ellos más tarde se convirtieron en acompañantes del hombre en varios aspectos, negativos y positivos. Ellos son un acompañamiento negativo como organismos venenosos o tóxicos, causando enfermedades en el hombre, animales y plantas. Entre sus aspectos positivos también se incluyen la degradación de los alimentos y de materiales naturales o fabricados por el hombre. Entre sus aspectos positivos se incluyen, con mucho mayor peso que sus aspectos negativos, su rol en la ciencia, biotecnología, control ambiental y biológico, medicina, alimentos y producción alimentaria (1).

En adición, se convirtieron importantes en otros asuntos humanos, como la mitología, folklore y religión. Los hongos evolucionaron de organismos primitivos hace aproximadamente 400 millones de años, en el período Devoniano de la era Paleozoica. Los hongos, debido a su estructura frágil y su composición, son preservados en fósiles incompletos, en comparación con los preservados de plantas y animales (2).

A. BASIDIOMICETOS COMESTIBLES

En cuanto a los basidiomicetos guatemaltecos, *Armillariella polymyces* es un hongo comestible que pertenece a la familia *Tricholomatacea* orden *Agaricales*, de píleo globoso, convexo, que va de color café-rosa a café amarillento; de contexto firme y blanco con olor agradable. Puede crecer en conjunto al pie de árboles frutales, principalmente manzano y

durazno (3). *Armillariella polymyces* puede ser encontrado tanto en Tactic y San Mateo Ixtatán en los departamentos de Alta Verapaz y Huehuetenango, respectivamente (1,3).

El género *Laccaria* Berkeley y Broome es un género de hongos cosmopolitas que es poco conocido en Guatemala, habiéndose reportado hasta el año 2001 solamente cinco especies: *Laccaria amethystina* Cooke, *Laccaria laccata* (Scop.: Fr.) Cooke, *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, *Laccaria ohiensis* (Mont.) Singer y *Laccaria major* G. M. Mueller. Tales especies son de suma importancia ecológica, además de que algunas de ellas son utilizadas como comestibles en varias localidades del país (1, 4).

L. amethystina se encuentra confinada a bosques de coníferas en climas fríos de gran altitud (bosques de *Quercus-Pinus*, *Pinus* y *Pinus-Abies*), siendo una especie abundante que puede encontrarse creciendo junto a *L. ohiensis* y *L. bicolor*. *L. amethystina* está ampliamente distribuida en las regiones frías del país, es conocida con los nombres comunes de sombrerito, sombrero de xara ó monja en castellano, jolon xar ó raqän xar en kaqchikel y raqaan chiip en uspanteko. Se caracteriza por presentar basidiocarpos de tamaño mediano a grande, color violeta en fresco, a café cuero en seco. Posee lamelas separadas, color violeta y micelio basal color violeta. Ha sido citada como comestible en Guatemala en diferentes localidades y se vende comúnmente en los mercados de Tecpán Guatemala y Comalapa en Chimaltenango, Uspantán en El Quiché, así como en el mercado de la cabecera departamental de Totonicapán, mezclada con otras especies de hongos comestibles como *L. ohiensis*, *L. major*, *Clitocybe clavipes* (Pers. ex. Fr.), *Hydnum repandum* L.: Fr., *Helvella crispa* (Scop.)Fr., *Helvella lacunosa* Afzel. : Fr. y *Trogia* sp., entre otras (4).

Pleurotus ostreatus posee un cuerpo fructífero sésil o con un pie muy corto, en forma de abanico y repisa, píleo de 5 a 10 cm o más de ancho de color café, café-grisáceo o gris con brillo metálico. Láminas blancas, lisas, delgadas. Carne blanca, algo correosa; no cambia de color al exponerse al aire (5). Hábitat: crece en grandes conjuntos o a veces solitario, sobre troncos, tocones y árboles muertos en los bosques caducifolios, acahuals, cafetales y jardines de julio a septiembre (5). No se ha encontrado en los mercados de la región, pero es una especie comestible en varios departamentos del país. Se sospecha que esta especie corresponde al

llamado hongo de Patancán, que se emplea con fines alimenticios en esta región, pero esto no ha podido comprobarse (5).

Sparassis crispa (Wulfen: Fr.) Fr. es un hongo culinario y medicinal cultivado recientemente en Japón, China, Alemania y Estados Unidos. En estudios previos, se purificó una preparación de un 1,3- β -D-glucano de 6 ramificaciones y fue designado como SCG, y se investigaron sus actividades biológicas. En el estudio presente, se prepararon fracciones de polisacárido extraídas de *S. crispa* por medio de agua caliente (SCHWE), NaOH frío (SCG) y NaOH caliente (SCHA), y se investigaron sus propiedades y actividades inmunomoduladoras. Estas fracciones polisacáridos mostraron una fuerte actividad del factor G debido a la presencia de β -1,3-D-glucanos. Estos también mostraron una fuerte actividad antitumoral contra la forma sólida del Sarcoma 180 en ratones, y respuesta hematopoyética en ratones con leucopenia inducida por ciclofosfamida. Estos también indujeron a esplenocitos en ratones para producir factor estimulante de colonias de macrófagos/granulocitos (GM-CSF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ) en ensayos *in vitro*. Por el tratamiento con NaOH de SCHWE, la respuesta hematopoyética fue aumentada pero la inducción de citocinas fue disminuida. Tomando todos los resultados juntos, estos sugieren fuertemente que el método de preparación se relacionó con la conformación de la fracción de β -glucano, y las actividades inmunomoduladoras *in vivo* e *in vitro* fueron moduladas significativamente por los métodos de preparación (6).

B. INMUNIDAD INNATA

La constitución genética origina el que una especie sea resistente a un determinado microorganismo patógeno para otra (7). Diferentes investigadores han logrado localizar genes específicos en ratones que la confieren a todos los individuos de una cepa determinada, resistencia contra antígenos específicos. Estos diferentes tipos de comportamiento en la relación huésped-agente patógeno, se prestan a importantes elucubraciones en cuanto al desarrollo evolutivo del sistema inmunitario en el humano. La especie humana controla de manera ademada una serie de enfermedades con las cuales ha estado en contacto durante muchos milenios y que en conjunto reciben el nombre de antroponosis (7).

C. INMUNIDAD ADQUIRIDA E INMUNOMODULACIÓN

Este sistema refuerza los anteriores y difiere de ellos en su alta especificidad, ya que debido a él desarrollan mecanismos de defensa contra cada uno de los antígenos que puedan agredir al organismo. Esta alta especificidad requiere un proceso de aprendizaje que se cumple durante el primer contacto con cada uno de los distintos antígenos, debido a este sistema es que los linfocitos adquieren nuevas características y “aprenden” procesos metabólicos especiales que les permiten responder en forma muy rápida contra un segundo ataque por el antígeno con el cual han estado previamente en contacto y producir las moléculas responsables de la inmunidad de tipo celular, llamadas citoquinas o los anticuerpos propios de la inmunidad humoral (7).

Se entiende por inmunomodulación la inhibición o activación de una respuesta inmunitaria específica; el control regulador estricto de la respuesta inmunitaria es de importancia fundamental para evitar la destrucción de los propios tejidos del huésped (8).

D. BASIDIOMICETOS E INMUNIDAD

El sistema inmune puede ser manipulado de forma específica (inmunización) o inespecífica (inmunomodulación). Dentro de los inmunomoduladores se incluyen inmunoestimuladores e inmunosupresores. Los mecanismos de inmunoestimulación incluyen aumento de la inmunidad anti-infecciosa por medio de células o por inducción o restauración de las funciones inmunes efectoras. El control regulador estricto de la respuesta inmunitaria es de importancia fundamental para evitar la destrucción de los propios tejidos del huésped (8).

Un amplio rango de polisacáridos inmunoestimulantes con diferentes estructuras químicas se han aislado de hongos basidiomicetos. La mayoría de la actividad inmunitaria de polisacáridos derivados de hongos se debe a los β -glucanos contenidos en ellos, estas moléculas son responsables de ciertas respuestas inmunes como lo son la liberación de citocinas, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), formación de óxido nítrico (NO) y liberación de metabolitos del ácido araquidónico (9, 10).

El polisacárido SHE es un agente inmunomodulador aislado de *Salicornia herbacea* (L.) L., es usado con eficiencia en fitomedicamentos, debido a su capacidad de activar fuertemente a

los monocitos e induce la diferenciación de monocitos a macrófagos, el efecto de este polisacárido fue medido en cultivos de células RAW de ratones en lo cual se determinó que la presencia de SHE en este cultivo activa a las células RAW para que produzcan citoquinas como TNF-alfa y IL-1beta los cuales son mediadores claves en la fagocitosis de LPS de bacterias y NO el cual puede ser un indicador cuantitativo clave de la activación de los macrófagos. Otro de los efectos que produce este polisacárido es la activación de co-estimuladores como B7-1, CD40 sin embargo es incapaz de inducir la expresión de MHC II. Fue demostrado que SHE es un activador de macrófagos y además aumenta la actividad fagocítica opsonizando los eritrocitos (11).

Los β -glucanos (BG) muestran un diverso rango de actividades biológicas, y esta diversidad es tan grande que una “actividad común” no ha sido identificada hasta el momento. La determinación de qué actividad es realmente significativa puede ser determinada probablemente desde el punto de vista del uso efectivo de BGs, una de las características de las BGs es que son de amplio espectro, y se espera que en el futuro las investigaciones van a dirigirse para aclarar este punto. En adición, las BGs se encuentran presentes en grandes cantidades en el ambiente, y se ha encontrado que humanos y animales no solamente reaccionan a la BGs en la forma de inmunidad innata, sino que también reconocen BGs por medio de la inmunidad adquirida. Este dato sugiere que es necesario el expandir y revisar el mecanismo convencional de acción que se asocia con las BGs para desarrollar nuevos mecanismos de acción. Cuando se considera inmunoregulación, existe la interrogante de que si las citocinas de reciente descubrimiento, terapia de genes o vacunas contra el cáncer pueden servir como sustitutos de BGs (12).

Masihi (2000) sugirió que la actividad ejercida frente a enfermedades infecciosas de los macromicetos y otros agentes fitoterápicos, reside en su capacidad de estimular los mecanismos de defensa del hospedero induciendo la producción de citocinas endógenas. Hu y cols. (2002) indican que polisacáridos antitumorales obtenidos de macromicetos no poseen citotoxicidad directa contra las células tumorales sino que muestran profundos efectos moduladores en el sistema inmune del hospedero (9).

Mei-Chun Kuo y cols. (2006) reportaron que *Ganoderma lucidum* induce la liberación de TNF- α e IL-6. Así mismo, Chen y cols. (2004) demostraron que diferentes fracciones de este hongo activan la expresión de IL-1, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, G-CSF y M-CSF (13, 15). El efecto de estas citocinas es variado, pero sus aplicaciones terapéuticas más importantes incluyen: aumento de respuesta frente a enfermedades infecciosas, inhibición de la proliferación de células cancerígenas y estimulación de la hematopoyesis en pacientes con tratamientos mielotóxicos tal como la deoxorubicina (14, 15).

E. EFECTO ANTITUMORAL DE BASIDIOMICETOS

Se han realizado estudios sobre la máxima productividad de un alfa-glucano de bajo peso molecular, el cual a una relación de 1:32 de carbono y nitrógeno se encuentra en mayor producción de la sustancia de interés ya que por su capacidad de dividirse en una fracción DAS y en una HWS la cual presenta actividad antiproliferativa de células cancerígenas HT-29 mediante el aumento o estimulación de la producción de células pro-apoptosis de las células cancerígenas de colón de la línea HT-29 (12).

Los mecanismos sugeridos de citotoxicidad celular anti-cancerígena además de la producción de citocinas, incluyen la inducción de apoptosis y la estimulación de la diferenciación celular o la interrupción del ciclo celular (15). Se ha demostrado inhibición de la proliferación en varias líneas celulares cancerígenas tales como: HL-60, U937, Blin-1, RPMI8226; MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de seno, células PC-3 del cáncer de próstata y células HT-29 (15,16,17,18).

Ganoderma lucidum es un hongo usado en Asia comúnmente por sus propiedades medicinales, entre las que se usa para terapia de cáncer (13). Actualmente Liu, J. y colaboradores(2007) han descubierto como este hongo inhibe la proliferación de las células cancerígenas de la próstata. Los componentes biológicos son polisacáridos y triterpenos con la capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas y metástasis mediante la modulación del sistema inmune mediante la detención del ciclo celular y disparando la apoptosis, también se ha descubierto recientemente que también suprime la angiogénesis (19).

El efecto de extractos de etanol de cuatro especies de hongos capaces de producir cuerpos fructíferos, esporas fúngicas, capaces de crecer en caldos nutritivos fueron analizados para encontrar su capacidad moduladora de proliferación celular y apoptosis en células de un carcinoma de piel de ratón (CH72) y células antitumorales de la epidermis (C50). En comparación con extractos de micelio de *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr) S.F, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus* Persoon, o de otras especies que mostraron poco o ninguna actividad en la proliferación celular mientras que los extractos solubles en etanol de *Lentinula edodes* (Berk.) Sing. disminuyó significativamente la proliferación de células CH72. No ocurrió ningún cambio en la respuesta de proliferación en la línea celular antitumorales de la epidermis, C50, con ninguno de los extractos de micelio utilizados. Para analizar la proliferación celular y apoptosis se utilizó microscopía DNA-fluorescente con bromuro de etidio y naranja de acridina como colorante, revelaron que *L. edodes* reduce la proliferación celular e induce la apoptosis en relación dependiente de tiempo y dosis en células de carcinoma pero no tiene efecto sobre las células no tumorales C50. El análisis del ciclo celular demuestra que el extracto de *L. edodes* induce un arresto en G1 con lo que no se observan cambios en las células antitumorales C50 (19).

Un estudio sobre la actividad citotóxica y antitumoral de *Ganoderma lucidum* demostró que la actividad antitumoral sobre células de linfoma ascítico de Dalton y carcinoma ascítico de Ehrlich se observa marcadamente al emplear extracto metanólico o acuoso por separado así como actividad antioxidante actuando como removedor de radicales libres. No se observó actividad citotóxica (20).

Según la tradición asiática, por cientos de años los curanderos han entendido el concepto de “tonificación inmune” los cuales han hecho uso de sustancias derivadas de plantas naturales que pueden restaurar la armonía tanto inmune como bioquímica del organismo que haya sido alterada por el ambiente y estrés interno. El sistema inmune puede ser reforzado con diferentes sustancias fúngicas como lo son los adaptógenos (inmunomodulación a través del sistema endocrino), inmunoestimulantes de membrana (estimulación de la actividad de macrófagos), tónicos inmunes o tónicos Chi (funcionan estimulando la producción de células blancas en la médula ósea) (21).

Un estudio que pretendió evaluar el efecto benéfico de té de Shiitake (*Lentinula edodes*) preparados a tres diferentes temperaturas sobre el tumor de Erlich y su efecto en el tratamiento de la respuesta inmune encontró que la preparación de extractos a 100°C tiene efectos tóxicos ya que los animales a los que se les proporcionó tal extracto tuvieron una supervivencia menor en comparación con el resto de los grupos. En resumen, se encontró que los té de Shiitake varían en eficiencia en actividad contra el desarrollo de tumores dependiendo la cepa y la temperatura de extracción, se conoció que los extractos acuosos obtenidos a 60°C son capaces de inhibir el desarrollo de células tumorales debido a sus efectos citostáticos, sin embargo las concentraciones de sus componentes inmunoestimulantes como los polisacáridos; pueden ser muy bajos para estimular el sistema inmune (22).

Con el tiempo se ha seleccionado material crudo para la fabricación de drogas, suplementos biológicamente activos, y otros productos alimenticios; en el caso de los basidiomicetos la purificación química de sustancias importantes depende de los efectos observados encontrándose problemas en el desarrollo de sistemas de investigación de sustancias antitumorales en hongos comestibles, incluyendo su efectividad y costo (23).

La eficacia inmunopotenciadora de un (1→3)- β -D-glucano extraído del hongo medicinal y culinario *Lentinus edodes*, llamado lentinan, ha sido investigada en ensayos *in vivo* e *in vitro*. La administración oral de lentinan a ratones ejerció una fuerte actividad antitumoral, resultando en niveles elevados de linfocitocinas como el interferón gamma (IFN- γ), el factor alfa de necrosis tumoral (INF- α), la interleucina 2 (IL-2) e interleucina 1 (IL-1). Los cultivos titulares de macrófagos, linfocitos HB-284 y linfocitos T que fueron tratados con lentinan mostraron niveles más altos de activación usando un citómetro de flujo. Los inmunocitos activados, particularmente las células T-helper activadas por lentinan, pueden prestar la constitución fisiológica a los huéspedes con alta resistencia a cáncer e infecciones. La inmunoterapia adoptiva, realizada por medio de la transferencia de inmunocitos activados con lentinan a ratones inmunodeficientes como los ratones atímicos, los ratones deficientes en células B y los ratones con inmunodeficiencias severas combinadas (SCID), resultó en la inhibición del crecimiento tumoral. El lentinan aparentemente representa una clase única de potenciadores de defensa en el huésped (HDP), protegiendo a los huéspedes de los efectos colaterales de medidas terapéuticas

convencionales y aumentando varios tipos de parámetros inmunológicos con efectos no tóxicos en modelos animales (24).

Boletus edulis Bull.: Pers. Fr. y *Calvatia (Langermannia) gigantea* (Batch: Pers.) Lloyd son dos de las primeras especies de hongos basidiomicetos, que en la quimioterapia temprana de cáncer, se encontró que producen agentes antitumorales durante las décadas de 1950s y 1960s. Los compuestos avanzaron solamente a la fase de prueba en el tratamiento de cáncer. Varios métodos de ensayo fueron desarrollados empleando células, tejidos y sistemas microbianos diseñados para la identificación de potenciales agentes antitumorales. Nuevos compuestos más específicos, eficientes y menos tóxicos en la erradicación de varias formas de cáncer permanecen desconocidos y pueden ser descubiertos en el futuro. En el futuro, el tratamiento de cáncer puede ganar muchos progresos de compuestos producidos por basidiomicetos (25).

F. LINFOPROLIFERACIÓN

En otros estudios, respecto actividad inmunomoduladora de hongos comestibles como *Ganoderma lucidum*, se encontró que en los extractos de esporas de dicho hongo, los derivados carboximetilados de las fracciones (1→3) α -D-glucanos con bajos grados de sustitución ejercen un efecto energético sobre la proliferación linfocitaria (26).

De la misma forma, el hongo comestible *Lentinula edodes*, ha mostrado inducción selectiva de apoptosis en el ciclo celular incidiendo en la fase G1 del ciclo celular de células dérmicas murinas (27). En un estudio sobre la fracción MD (MDF) de los Beta-glucanos de los cuerpos fructíferos de *Grifola frondosa* (Maitake), se observó que MDF causa el incremento de la respuesta de la formación de unidades formadoras de colonias de granulocitos-monocitos (CFU-GM) de progenitores de las células de la médula ósea y la recuperación de la respuesta CFU-GM luego de la inducción de supresión hematopoyética por doxorubicina el cual es un fármaco tóxico para médula ósea (28).

G. EFECTO ANTIOXIDANTE, HIPOGLUCEMIANTE Y OTROS

Se han estudiado las diferentes estructuras del cuerpo fructífero de *Pleurotus citrinopileatus* Singer y su actividad antioxidante, demostrándose que los extractos etanólicos, tanto en agua fría

como en agua caliente de la totalidad del cuerpo fructífero, ejercen mayor efecto antioxidante que los extractos de micelio o de filtrado; siendo de estos el mejor el extracto etanólico por sus propiedades antioxidantes y capacidad de oxidar radicales hidroxilo libres (10).

Se tienen identificadas tres porciones derivadas de un proteoglicano proveniente del micelio de *Pleurotus ostreatus* que presentan actividad estimuladora *in vitro* de los macrófagos peritoneales, sobre las células asesinas naturales y actividad inhibitoria del crecimiento de células tumorales del sarcoma 180 (10). La especie *Pleurotus ostreatus* ha demostrado tener actividad hipoglucemiante prolongada sobre ratones a los que se les indujo diabetes además previno la considerable pérdida de peso en estos (10).

El género *Pleurotus* sp. produce una enzima llamada laccasa capaz de degradar compuestos de difícil descomposición (10), se ha determinado que la mayor producción de esta enzima se logra sobre cáscara de mandarina por *Pleurotus eryngii* (D.C. ex Fr.) y se *Pleurotus ostreatus* sobre la paja de uva (10).

Respecto a la actividad de hongos del género *Armillariella* para uso terapéutico, se ha observado que el micelio de la especie *Armillariella tabescens* (Scop. ex Fr.) Emel syn. posee actividad hepatoprotectora por intoxicación con etanol (29). También se ha encontrado actividad detoxificante contra aflatoxinas B1 mediante la acción de enzimas aisladas de esporas de *A. tabescens* (30). Las multienzimas de *A. tabescens* han exhibido capacidad detoxificante contra las mencionadas aflatoxinas a través de la modificación de su estructura química (31).

Otra de las especies de *Armillariella* que posee actividad importante es *Armillariella mellea* de cuyos cuerpos fructíferos se aisló una metaloproteasa capaz de lisar las cadenas A α y B β del fibrinógeno humano, postulándose así como candidato a la terapia oral fibrinolítica (32).

H. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Los efectos adyuvantes de varios formadores de gel: beta-glucanos, grifolanos de *Grifola frondosa*, glucanos de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary FO 9395, y lentinas de *Lentinula edodes* fueron evaluados en ratones inmunizados con antígenos solubles de ovoalbúmina

trinitrofenil (TNP-OVA), se observó que la inyección intraperitoneal de TNO-OVA con grifolanos puede inducir la actividad máxima de producción de anticuerpos, se encontró que la administración de TNP-OVA con glucanos de *S. sclerotiorum* (SSG) no aumenta la producción de anticuerpos. La administración de grifolanos y SSG disueltos en NaOH incrementaron la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a contra la TNP-OVA. La producción de interferón gamma se produce por células Th1 estimuladas con SSG observándose también inducción por estas mismas moléculas en la producción de IL-12 en esplenocitos (33).

Según este estudio, se ha podido cuantificar la cantidad exacta de polisacáridos en hongos comestibles empleando la técnica de ELISA; en el cual se cuantificó la cantidad de lentinan el polisacárido antitumoral de *L. edodes*. Se demostró que el almacenaje de hongos comestibles en temperaturas bajas (1°C) es más efectivo para mantener sin cambios los contenidos de polisacáridos antitumorales así como la calidad del hongo comestible. Se observó que la producción de factor de necrosis tumoral alfa ocurre luego de 8 horas más tarde que la producción de óxido nítrico, al incubar los macrófagos con lentinan la producción de óxido nítrico se inhibió por completo (34).

IV. JUSTIFICACIÓN

Desde la antigüedad, los hongos desempeñan múltiples e importantes roles para la humanidad: unos beneficiosos, tales como la contribución con el medio ambiente a través de la degradación de materia orgánica y el establecimiento de relaciones interespecíficas con plantas y otros perjudiciales, como la producción de patologías en el hombre por hongos parásitos. Históricamente se utilizaban ciertas especies en ceremonias mayas y aztecas por sus efectos alucinógenos; hoy en día son consumidos debido a su alto contenido nutricional.

El surgimiento de enfermedades de carácter autoinmune e infeccioso, es un problema que está siendo estudiado para el tratamiento de dichas patologías. Sin embargo, existen limitaciones que no permiten al organismo humano responder adecuadamente a la terapéutica vigente hasta la fecha; es por ello que se reconoce la importancia de aplicar terapias preventivas más factibles para la mejora de la salud de la población.

En países orientales, donde el uso de hongos comestibles con fines terapéuticos ha sido practicado por generaciones, se ha descrito que los basidiomicetos poseen actividad moduladora del sistema inmune. La importancia de dicha actividad radica en que estos alimentos pueden ser empleados en el tratamiento o prevención de enfermedades degenerativas o depresoras del sistema inmune. Esta medida terapéutica se ha basado en el estudio de los efectos de diversos metabolitos presentes en los hongos con poder antiinflamatorio, antitumoral y citotóxico, entre otros. Para aplicar este tipo de terapia inmunomoduladora, los mecanismos, efectos y procesos de la misma deben ser estudiados con mayor detenimiento.

En Guatemala, la mayoría de estudios realizados se han enfocado en la caracterización taxonómica y mejoramiento genético, siendo nulos los orientados a la inmunomodulación, ya que este aspecto ha sido solamente evaluado en plantas. Con base en estos hechos es de suma importancia el análisis y estudio detenido de la posible actividad inmunomoduladora de basidiomicetos comestibles, cultivados o silvestres y de fácil obtención en el territorio nacional.

Por su importancia y alto consumo, se evaluó la actividad inmunomoduladora de los basidiomicetos: *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL:

Determinar la actividad inmunomoduladora presentada por extractos de los hongos comestibles *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*.

B. ESPECÍFICOS:

1. Obtener extractos etanólicos y acuosos de las especies de basidiomicetos comestibles *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*.
2. Medir la actividad linfoproliferativa presentada por los basidiomicetos comestibles *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*, por medio de un ensayo *in vitro*.
3. Medir la actividad sobre el sistema del complemento (vía clásica y vía alterna) presentada por los basidiomicetos comestibles *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*, por medio de un ensayo *in vitro*.

VI. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos de los basidiomicetos comestibles *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus* presenta alguna actividad inmunomoduladora.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA

El universo de trabajo estuvo constituido por los basidiomicetos comestibles nativos de Guatemala. La muestra estuvo constituida por los extractos etanólico y acuoso de los basidiomicetos *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*; obtenidos por las técnicas de extracción por percolación e infusión.

B. RECOLECCIÓN Y DETERMINACIÓN DEL HONGO

Se efectuó la recolección de ejemplares de los basidiomicetos *Laccaria amethystina* y *Lactarius deliciosus*, *Cantharellus lateritius* y *Armillariella polymyces* en los mercados municipales de Tecpán Guatemala, Guatemala y Alta Verapaz, respectivamente. *Pleurotus ostreatus* se obtuvo de cultivos artesanales en Tecpán Guatemala. La identidad de los basidiomicetos recolectados se aseguró a través de la identificación taxonómica realizada por el Licenciado Osberth Morales, experto en micología y mediante la aplicación de un procedimiento estándar para la determinación de macrohongos.

C. DESECACIÓN DE HONGOS

1. Equipo

- Desecadora para hongos
- Congelador a -20° C
- Balanza analítica
- Lector de humedad

2. Materiales

- Bisturí
- Bolsas de polipapel
- Papel encerado
- Lata para almacenamiento

3. Procedimiento

a) Desección de hongos comestibles

- i) Pesar los hongos frescos en una balanza analítica.
- ii) Cortar los hongos transversalmente con un bisturí.
- iii) Colocar los hongos ya cortados dentro de una desecadora, cuidando que no estén unos sobre otros.
- iv) Dejarlos secando por 72 horas, revisando que no se quemem.
- v) Retirar los hongos de la desecadora.
- vi) Determinar el porcentaje de humedad de los hongos secos en un lector de humedad. (La humedad debe ser menor del 10%, si no es así, secar nuevamente).
- vii) Pesar los hongos secos en una balanza analítica.
- viii) Determinar el porcentaje de rendimiento:
$$\% \text{ de rendimiento} = (\text{peso hongos secos} / \text{peso hongos frescos}) \times 100$$
- ix) Guardar los hongos secos en una bolsa de polipapel.

b) Curación de los hongos secos

- i) Colocar la bolsa conteniendo los hongos secos en un congelador a -20°C .
- ii) Congelar por dos semanas.
- iii) Retirar la bolsa del congelador.
- iv) Secar nuevamente los hongos en una desecadora por 72 horas.
- v) Determinar el porcentaje de humedad de los hongos secos en un lector de humedad. (La humedad debe ser menor del 10%, si no es así, secar nuevamente).
- vi) Guardar los hongos secos en una bolsa de polipapel.

c) Conservación de los hongos secos

- i) Guardar la bolsa de polipapel conteniendo los hongos en una lata. La lata cerrada debe estar en un lugar fresco, sin luz del sol directa.

D. EXTRACCIÓN POR PERCOLACIÓN

1. Equipo y Material

Percolador de vidrio o de acero inoxidable

Balanza

Algodón

Papel filtro

Vasos de precipitar

Erlenmeyers

2. Procedimiento

- a) En un percolador previamente limpio y seco, colocar un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro de acuerdo al diámetro del percolador.
- b) Pesar la cantidad de sustrato fúngico a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.
- c) Humedecer la cantidad de material fúngico con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- d) Transferir todo el material al percolador y agregar disolvente hasta cubrir el material fúngico.
- e) Dejar reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependerá del material fúngico, el solvente y la temperatura de trabajo.
- f) Abrir la llave de la parte inferior y dejar gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- g) Recoger el líquido en un Erlenmeyer, añadir suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- h) Presionar fuertemente el material sólido que ha quedado.
- i) Añadir el líquido obtenido al percolado obtenido anteriormente.
- j) Colocar la solución obtenida en un balón, colocar el balón en un rotavapor.
- k) Procesar la solución obtenida en el rotavapor, con una temperatura de 45° C, hasta obtener un extracto.
- l) Repetir el procedimiento las veces que sea necesario.

E. COMPLEMENTO

1. Equipo

Autoclave
Balanza Analítica
Campana de flujo laminar
Congelador
Centrífuga
Centrífuga para microplacas
Hemocitómetro de Neubauer
Incubadora
Lector de ELISA
Refrigeradora
Espectrofotómetro

2. Materiales

Placas de microtitulación estériles de 96 pozos, fondo en U con tapadera
Pipetas de 10uL, 50uL, 100uL, 200uL, 1000uL
Pipetas Pasteur
Tubos de ensayo
Tubos de 50 mL
Tubos plásticos de 15 mL
Tips amarillos y azules

3. Reactivos

Mezcla de suero humano normal (MSH)
Mezcla de suero humano inactivado
Droga Patrón (Ciclosporina, Levamisol o Difur)
Solución salina
Agua destilada
Agua desmineralizada

Solución Alsever

Eritrocitos de conejo y de carnero

Anticuerpo contra eritrocitos de carnero (AMBOCEPTOR) Dilución 1:100

Amortiguador salino de veronal concentrado 5 veces (VSB), como solución madre

VSB⁺ (no aditivos)

VSB⁺2 (0.5mM de Mg²⁺ y 0.15 mM de Ca²⁺)

EGTA-VB (2.5 mM de Mg²⁺ y 8mM de etilenglicol-bis(beta-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA)).

Agua Milli-A

4. Procedimiento

a) Ensayo hemolítico para la actividad de la vía clásica

i) Preparación de los eritrocitos sensibilizados con el anticuerpo

- Mezclar 2 mL de los eritrocitos con 8 mL de solución salina en un tubo de plástico de 15 mL.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante utilizando una pipeta, resuspender el botón en 10 mL de solución salina y volver a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
- Repetir el proceso del paso c. Tras la tercera centrifugación guardar el botón de células en hielo.

ii) Preparación de la suspensión de eritrocitos

- Resuspender el botón de células (500 μ L) en 9.5ml de VSB⁺2 en un tubo de 50 mL, mantener en hielo.
- Mezclar 100 μ L de esta suspensión con 4.9 mL de agua desmineralizada en un tubo de 15 mL.
- Determinar la densidad óptica a 410 nm. La concentración de eritrocitos debe ser ajustada a 4×10^8 células/mL, cuya densidad óptica es de 0.522; utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de VSB}^{+2} = (\text{V inicial}) \times [(\text{OD medida} - 0.522) / 0.522]$$

- Mantener la suspensión eritrocítica en hielo.
- iii) Sensibilización de los eritrocitos (ShEA)
- Mezclar 1 mL de la dilución 1:100 Amboceptor con 7 ml de VSB⁺², en un tubo de 50 ml.
 - Añadir 8 mL de la suspensión de eritrocitos e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 16 mL de VSB⁺².
 - Mantener la solución en hielo.
- iv) Dilución de las muestras en placas de microtitulación fondo U
- Agregar 50 μL de VSB⁺² a los pozos en las filas B a G.
 - Agregar 100 μL de muestra en solución en triplicado a la fila A.
 - Transferir 50 μL de la solución en la fila A a la fila B y después mezclar.
 - Transferir 50 μL de la fila B a la siguiente fila. Repetir este procedimiento hasta la fila G.
 - Descartar 50 μL de la mezcla final en la fila G.
- v) Preparación de controles de actividad hemolítica
- Añadir 50 μL de VSB⁺² a los pocillos H₁ a H₃. H₁-H₃ será la actividad del extracto. H₄-H₆ será el blanco (suero inactivado).
 - Añadir 100 μL de VSB⁺² a los pocillos H₇-H₉ (0% de hemólisis).
 - Añadir 100 μL de agua Milli-A a los pocillos H₁₀-H₁₂ (100% de hemólisis).

- vi) Preparación de la dilución del suero y preincubación
- Añadir 50 μL de la solución de suero inactivado (63 μL de suero inactivado + 5 mL de VSB⁺²) a los pocillos H₄-H₆ y blancos de las muestras.
 - Mezclar 125 μL de extracto con 10 mL de VSB⁺² y añadir 50 μL a los pocillos control y muestras problema (suero mas extracto).
 - Cubrir la placa y preincubar a 37° C durante 30 minutos.
- vii) Incubación
- Añadir 50 μL de los eritrocitos sensibilizados (ShEA) a cada pocillo. Incubar a 37° C durante 60 minutos.
- viii) Medición de la hemólisis
- Centrifugar las microplacas a 2500 rpm, durante 2 minutos.
 - Añadir 200 μL de agua desmineralizada a los pocillos de otra placa de fondo plano.
 - Medir la densidad óptica a 405 nm en un lector de ELISA.

b) Ensayo hemolítico de actividad sobre la vía alternativa del complemento

- i) Preparación de la suspensión de eritrocitos
- Mezclar 4 mL de los eritrocitos con 6 ml de solución salina en un tubo de plástico de 15 mL.
 - Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
 - Eliminar el sobrenadante utilizando una pipeta, resuspender el botón en 10 mL de solución salina y volver a centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos.
 - Repetir el proceso del paso c. Tras la tercera centrifugación guardar el botón de células en hielo.

ii) Preparación de la suspensión de eritrocitos

- Resuspender el botón de células (500 μL) en 9.5ml de EGTA-VB en un tubo de 50 mL, mantener en hielo.
- Mezclar 100 μL de esta suspensión con 4.9 ml de agua desmineralizada en un tubo de 15 mL.
- Determinar la densidad óptica a 410 nm. La concentración de eritrocitos debe ser ajustada a 4×10^8 células/mL, cuya densidad óptica es de 0.522; utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de EGTA-VB} = (V \text{ inicial}) \times [(\text{OD medida} - 0.522) / 0.522]$$

- Mantener la suspensión eritrocítica en hielo.

iii) Dilución de las muestras en placas de microtitulación en U

- Agregar 50 μL de EGTA-VB a los pozos en las filas B a G.
- Agregar 100 μL de muestra en solución en triplicado a la fila A.
- Transferir 50 μL de la solución en la fila A a la fila B y después mezclar.
- Transferir 50 μL de la fila B a la siguiente fila. Repetir este procedimiento hasta la fila G.
- Descartar 50 μL de la mezcla final en la fila G.

iv) Preparación de controles de actividad hemolítica

- Añadir 50 μL de EGTA-VB a los pocillos H₁ a H₃. H₁-H₃ será la actividad del extracto. H₄-H₆ será el blanco (suero inactivado).
- Añadir 100 μL de EGTA-VB a los pocillos H₇-H₉ (0% de hemólisis).
- Añadir 100 μL de agua desionizada a los pocillos H₁₀-H₁₂ (100% de hemólisis).

v) Preparación de la dilución del suero y preincubación

- Añadir 500 μL de la solución de suero inactivado con 500 μL de EGTA-VB. Agregar 25 μL de esta solución a A3-G3, A6-G6, A9-G9, A12-G12 y H4-H6.

- Mezclar 1 mL de suero humano con 1 mL de EGTA-VB. Agregar 25 μ L de esta solución a A1-H1, A2-H2, H3, A4-G4, A5-G5, A7-G7, A8-G8, A10 – G10 y A11-G11.
- Cubrir la placa y preincubar a 37° C durante 30 minutos.

vi) Incubación

- Añadir 25 μ L de la suspensión de eritrocitos de conejo a cada pozo.
- Incubar a 37° C durante 30 minutos.

vii) Medición de la hemólisis

- Centrifugar las microplacas a 2500 rpm, durante 2 minutos.
- Añadir 200 μ L de agua desmineralizada a los pocillos de otra placa de fondo plano.
- Medir la densidad óptica a 405 nm en un lector de ELISA.

F. LINFOPROLIFERACIÓN

1. Equipo y Material

Campana de Flujo laminar

Centrífuga

Espectofotómetro de placas o lector de ELISA

Hemocitómetro de Neubauer

Incubadora 37°C

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

Pipetas de, 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L

Pipetas Pasteur

Tubos de ensayo

Tubos Vacutainer con EDTA de 5 mL

Tubos de 50 mL

Sangre o suspensión de linfocitos

Histopaque

Sal de tetrazolio (XTT ó Hidrato ácido de 3`-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis (4-metoxi-6nitro(bencen-sulfónico de sodio)

Lectinas de Con A y PHA

Metosulfato de phenacina (PMS)

Dimetil formamida

Solución de Türk

Acido acético

Cristal violeta

Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

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

Buffer Salino de Fosfatos (PBS)

Gentamicina

EDTA (sal disódica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético)

2. Procedimiento

- a) Aislamiento y preparación de linfocitos
 - i. Agregar sobre 5 mL de Histopaque un volumen de 5 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA, con una pipeta estéril.
 - ii. Centrifugar en frío a 2400 rpm por 20 minutos.
 - iii. Aspirar con cuidado la capa de linfocitos
 - iv. Transferir la capa de linfocitos a un tubo de centrifuga, agregar 10 mL de PBS y mezclar cuidadosamente.
 - v. Centrifugar a 1400 rpm por 5 minutos
 - vi. Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
 - vii. Resuspender las células en 2 mL de RPMI, y aforar hasta 15 mL.
 - viii. Centrifugar la suspensión a 1400 rpm por 5 minutos
 - ix. Aspirar el sobrenadante y descartarlo.
 - x. Resuspender las células en 2 mL de RPMI-FBS, y aforar a 10 mL.

b) Conteo celular y medición espectrofotométrica

- i. Para calcular la concentración celular, mezclar 10 μL de la suspensión celular con 90 μL de la solución de Türk (factor de dilución 1:10).
- ii. Sumergir la pipeta dentro de la mezcla, permitiendo la formación de una pequeña gota en la punta de la pipeta, colocarla cuidadosamente en la superficie periférica de la cubierta de la cámara de Neubauer.
- iii. 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 x 10 (factor de dilución) x 1×10^4 .

- iv. Ajustar la concentración de linfocitos a 5×10^6 células/ml con RPMI-FBS
- v. Incubándose 7 días a 37°C con 5% de CO_2 , después agregar 50 μL de la solución de XTT, incubándose nuevamente a 37°C por 4 horas, posteriormente se lee espectrofotométricamente a 450 nm, comparándose la viabilidad con el aumento de absorbancia.

G. DISEÑO ESTADÍSTICO

1. Tipo de Estudio

Cuasi- experimental.

2. Variables

a) Dependiente

Extractos acuosos y etanólicos de los basidiomicetos comestibles: *Cantharellus lateritius*, *Pleurotus ostreatus*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Armillariella polymyces*.

b) Independiente

Actividad inmunomoduladora *in vitro* de los extractos acuosos y etanólicos de los basidiomicetos estudiados.

3. Validación de los métodos

a) Ensayo hemolítico para la evaluación de la actividad del complemento

i. Validación del método

Realizar una curva mostrando la actividad sérica del pool del suero humano normal a emplear.

Elegir la concentración que demuestre una actividad entre 30 – 70 % como control para demostrar que todos los componentes del sistema del complemento presentes en el suero son funcionales.

Control positivo: Agua desmineralizada (100 % de hemólisis).

Control negativo: Amortiguador PBS (0 % de hemólisis)

ii. Ensayo de evaluación de la actividad del complemento

Número de réplicas: Cinco, para obtener un nivel $\alpha = 0.05$ (Según la tabla de la distribución binomial) y rechazar o aceptar la hipótesis.

La respuesta a medir es la concentración de hemoglobina liberada por la lisis eritrocitaria.

Determinar la concentración efectiva mínima a los extractos que demuestren efecto inmunomodulador, utilizando diferentes concentraciones: 1000, 333.3, 111.1, 37.0, 12.3, 4.11 y 1.4 $\mu\text{g/ml}$.

La metodología se acepta si los resultados obtenidos tienen un rango de error de $\pm 10\%$ en la repetibilidad.

No existió aleatorización por razones técnicas.

b) Ensayo linfoproliferativo

i. Fase I: Elección de control positivo

- Controles positivos: Lectina de *Phytolacca americana* (PWM), lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) y lectina Conavalina A (ConA).

- Control negativo: Blanco.
- Número de grupos: 3 grupos con dosis única de 1 mg/ml de lectinas, siendo los siguientes, grupo A=PWM, B=PHA y C=Con A. Y el control negativo, correspondiente a un blanco (medio y linfocitos sin lectina).

Se repitió 12 veces cada lectina y la que presentó mayor actividad se utilizó en la siguiente fase (Evaluación de la linfoproliferación).

ii. Fase II: Evaluación de la estimulación o inhibición de la linfoproliferación

Las unidades experimentales son los linfocitos y la respuesta a medir, el recuento linfocitario.

Número de réplicas: Cinco, para obtener un nivel $\alpha = 0.05$ (Según la tabla de la distribución binomial) y rechazar o aceptar la hipótesis.

Grupo A: Lectina (control positivo)

Grupo B: Blanco o control negativo

Grupo C: Extracto etanólico de *Cantharellus lateritius*

Grupo D: Extracto acuoso de *Cantharellus lateritius*

Grupo E: Extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus*

Grupo F: Extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus*

Grupo G: Extracto etanólico de *Laccaria amethystina*

Grupo H: Extracto acuoso de *Laccaria amethystina*

Grupo I: Extracto etanólico de *Lactarius deliciosus*

Grupo J: Extracto acuoso de *Lactarius deliciosus*

Grupo K: Extracto etanólico de *Armillariella polymyces*

Grupo L: Extracto acuoso de *Armillariella polymyces*

Se determinó la concentración efectiva mínima a los extractos, realizando diluciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 $\mu\text{g/ml}$. No hubo aleatorización por razones técnicas.

3. Análisis de Datos

Los datos fueron analizados con estadística descriptiva, ANOVA y una prueba múltiple de medias (Prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95 %) y la

comparación entre hongos se realizó con una prueba de hipótesis binomial con un nivel de confianza de 95 %; las respuestas a medir fueron:

a) Ensayo hemolítico para la evaluación de la actividad del complemento

Los resultados a medir fueron POSITIVOS si el extracto aumentó o disminuyó en un 50 % la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica y si la concentración de la muestra para obtener la CI_{50} fue menor a 15 ug/ml.

Si la concentración de hemoglobina liberada comparada con la actividad sérica y el control negativo se mantuvo inalterada, el resultado fue NEGATIVO.

b) Ensayo linfoproliferativo

Los resultados se evaluaron de acuerdo a la siguiente escala:

Porcentaje de estimulación entre 25 – 30 % = E ±

Porcentaje de estimulación entre 31-100 % = E+

Porcentaje de estimulación entre 101-200 % = E++

Porcentaje de estimulación mayor de 201 % = E+++

Porcentaje de Inhibición de 25-30 % = I ±

Porcentaje de Inhibición de 31 – 100 % = I+

Porcentaje de Inhibición de 101-200 % = I++

Porcentaje de Inhibición mayor de 201 = I+++

Los resultados a medir fueron POSITIVO si el extracto aumentó (estimula) o disminuyó (inhibe) la proliferación de linfocitos y NEGATIVO si no existió alteración de la proliferación de los mismos. Es decir

Ho: $p \leq q$ (no efecto p) = frecuencia de respuesta positiva y

Ha: $p > q$ (Si efecto q) = Frecuencia de respuesta negativa

Si en las cinco réplicas se obtuvo una frecuencia total de resultados positivos (cinco éxitos) se rechaza la Hipótesis nula (Ho: $p \leq 0.5$ y Ha: $p > 0.5$).

VIII. RESULTADOS

Para la evaluación de la actividad inmunomoduladora de extractos acuosos y etanólicos de basidiomicetos comestibles, se realizaron tres bioensayos y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Resultados de actividad inmunomoduladora presentada por basidiomicetos comestibles en tres diferentes bioensayos.

Basidiomiceto	Linfoproliferación		Vía clásica del complemento		Vía alterna del complemento	
	Extracto etanólico	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto acuoso
<i>Armillariella polymyces</i>	-	-	+/I	+/I	+/I	+/I
<i>Cantharellus lateritius</i>	+/I	-	+/I	+/I	-	+/I
<i>Laccaria amethystina</i>	-	-	-	+/I	+/I	+/I
<i>Lactarius deliciosus</i>	-	-	-	+/I	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	+/I	+/I	+/I	-	-	-

Resultado negativo: - Resultado positivo/Inhibición:+/I Fuente: Datos experimentales

Todos los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente para determinar si la actividad inmunomoduladora obtenida fue significativa, utilizándose como punto de corte un valor $F \geq 2.57$ y un valor $p \leq 0.05$ (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de F y valores P obtenidos para los diferentes ensayos realizados.

Basidiomiceto	Linfoproliferación				Vía Clásica del Complemento				Vía Alterna del Complemento			
	Acuoso		Etanólico		Acuoso		Etanólico		Acuoso		Etanólico	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
<i>A. polymyces</i>	1.50	0.21	0.89	0.51	382.19	1.62 E-25	11.75	1.45 E-6	32.30	2.44 E-11	59.71	1.15 E-14
<i>L. deliciosus</i>	0.67	0.67	1.63	0.18	9.43	1.09 E-5	1.13	0.37	0.56	0.76	0.90	0.51
<i>L. amethystina</i>	1.34	0.27	1.76	0.14	130.98	3.66 E-19	0.99	0.45	16.65	4.40 E-8	12.31	9.37 E-7
<i>P. ostreatus</i>	2.80	0.03	3.05	0.02	1.07	0.40	25.26	4.40 E-10	2.06	0.09	1.73	0.15
<i>C. lateritius</i>	1.77	0.14	6.46	0.00	19.33	8.89 E-9	5.76	5.28 E-4	9.04	1.58 E-5	0.42	0.86

Fuente: Datos experimentales

En la etapa inicial de recolección de muestras, se calculó el porcentaje de recuperación o rendimiento de cada basidiomiceto, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. Porcentajes de recuperación obtenidos.

Basidiomiceto	Porcentaje de recuperación (%)
<i>Armillariella polymyces</i>	6.4
<i>Cantharellus lateritius</i>	2.9
<i>Laccaria amethystina</i>	4.3
<i>Lactarius deliciosus</i>	12.3
<i>Pleurotus ostreatus</i>	7.8

Fuente: Datos experimentales

En la vía clásica del complemento se observó actividad inhibitoria por parte de los cinco basidiomicetos estudiados: *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius deliciosus* y *Pleurotus ostreatus*. Los resultados de la actividad fueron interpretados como positivos cuando el porcentaje de inhibición fue mayor de 50 % y además mostraron diferencia estadísticamente significativa al ser analizados con la prueba de Tukey (Tablas 4 y 5). Solamente los extractos acuosos de *Laccaria amethystina*, *Armillariella polymyces* y *Lactarius deliciosus* mostraron actividad inhibitoria con efecto dosis-respuesta (Gráficas 1, 2 y 3).

Tabla 4. Actividad inmunomoduladora de extractos de basidiomicetos sobre la vía clásica del complemento.

Concentración (mg/mL)	<i>Armillariella polymyces</i>				<i>Laccaria amethystina</i>		<i>Lactarius deliciosus</i>	
	extracto acuoso		extracto etanólico		extracto acuoso		extracto acuoso	
	% Inhibición	Actividad*	% Inhibición	Actividad*	% Inhibición	Actividad*	% Inhibición	Actividad*
1000.0	102 ± 2	+	82 ± 3	+	99 ± 3	+	101 ± 3	+
333.3	101 ± 2	+	72 ± 1	- ¹	98 ± 5	+	96 ± 5	+
111.1	100 ± 2	+	69 ± 2	- ¹	81 ± 7	+	87 ± 9	- ¹
37.0	78 ± 5	+	68 ± 4	- ¹	60 ± 2	- ¹	81 ± 12	- ¹
12.3	38 ± 4	-	65 ± 5	- ¹	46 ± 6	-	78 ± 11	- ¹
4.1	24 ± 5	-	68 ± 3	- ¹	35 ± 4	-	71 ± 3	- ¹
1.4	16 ± 5	-	66 ± 4	- ¹	28 ± 6	-	71 ± 4	- ¹

* (+) = POSITIVA con un % hemólisis > 50% (p < 0.05)

(-) = NEGATIVA con un % hemólisis < 50% (p < 0.05)

DS = Desviación estándar

Fuente: Datos Experimentales

¹ Resultados interpretados como negativo porque a pesar de tener un % de inhibición mayor de 50 %, no mostraron diferencia significativa con la prueba de Tukey.

Tabla 5. Actividad inmunomoduladora de extractos de basidiomicetos sobre la vía clásica del complemento.

Concentración (mg/mL)	<i>Cantharellus lateritius</i>				<i>Pleurotus ostreatus</i>	
	extracto acuoso		extracto etanólico		extracto etanólico	
	% Inhibición Media ± DS	Actividad*	% Inhibición Media ± DS	Actividad*	% Inhibición Media ± DS	Actividad*
1000.0	94 ± 2	+	106 ± 7	+	100 ± 2	+
333.3	87 ± 5	+	100 ± 5	+	88 ± 5	+
111.1	82 ± 4	+	98 ± 7	+	78 ± 2	¹
37.0	73 ± 5	¹	95 ± 9	¹	74 ± 4	¹
12.3	71 ± 4	¹	87 ± 9	¹	73 ± 4	¹
4.1	69 ± 5	¹	80 ± 4	¹	73 ± 4	¹
1.4	70 ± 6	¹	86 ± 11	¹	73 ± 6	¹

* (+) = POSITIVA con un % hemólisis > 50% (p < 0.05)

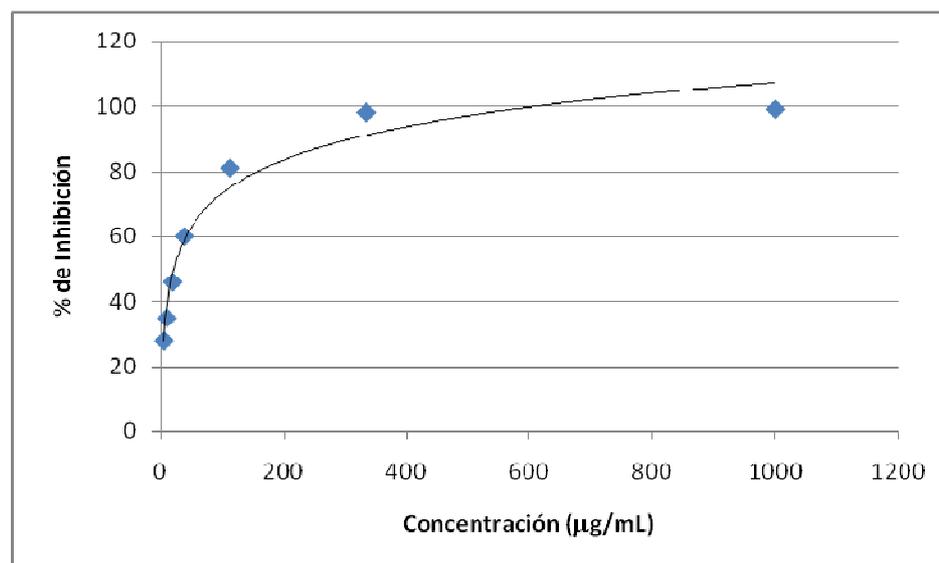
(-) = NEGATIVA con un % hemólisis < 50% (p < 0.05)

.....DS = Desviación estándar

Fuente: Datos Experimentales

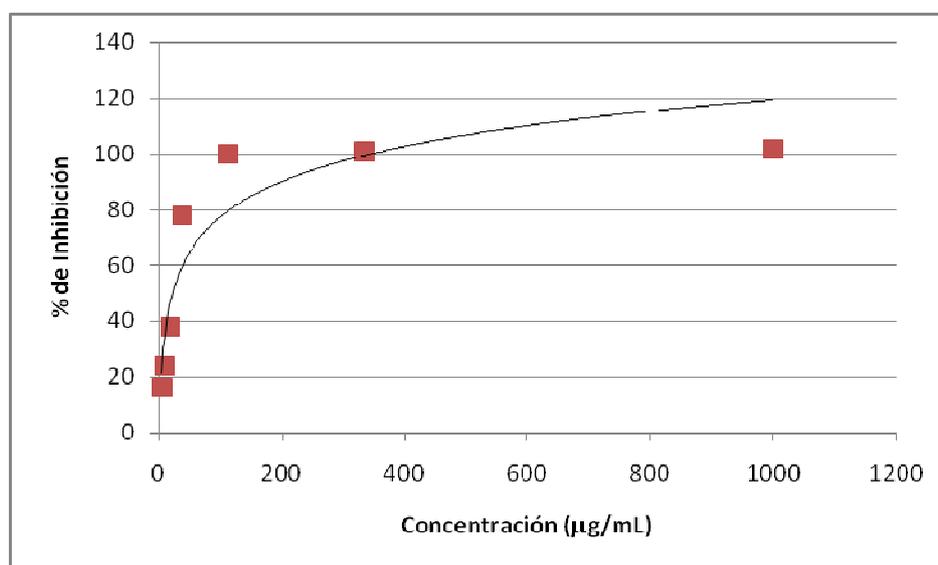
¹ Resultados interpretados como negativo porque a pesar de tener un % de inhibición mayor de 50 %, no mostraron diferencia significativa con la prueba de Tukey.

Gráfica 1. Efecto dosis respuesta del extracto acuoso del basidiomiceto *Laccaria amethystina* sobre la vía clásica del complemento.



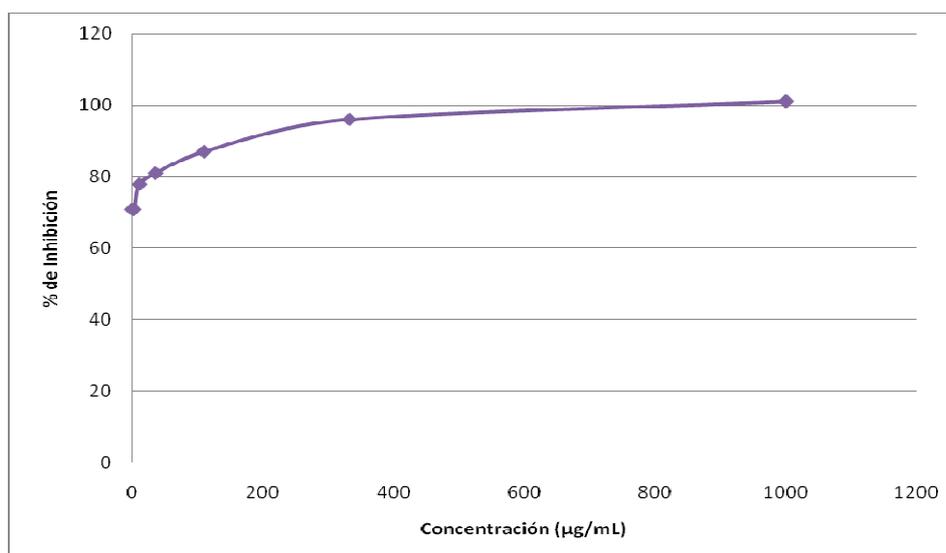
Fuente: Datos Experimentales

Gráfica 2. Efecto dosis respuesta del extracto acuoso del basidiomiceto *Armillariella polymyces* sobre la vía clásica del complemento.



Fuente: Datos Experimentales

Gráfica 3. Efecto dosis respuesta del extracto acuoso del basidiomiceto *Lactarius deliciosus* sobre la vía clásica del complemento.



Fuente: Datos Experimentales

De la misma forma, los extractos acuoso y etanólico de *Armillariella polymyces* y *Laccaria amethystina* mostraron efecto inhibitorio sobre la vía alterna del complemento, el extracto acuoso de *Cantharellus lateritius* también mostró actividad inhibitoria (Tablas 6 y 7). Al igual que para la vía clásica del complemento, los resultados de la actividad solamente fueron interpretados como positivos cuando el porcentaje de inhibición fue mayor de 50 % y la prueba de Tukey demostró que existía diferencia significativa respecto a las otras concentraciones. Al igual que en la vía clásica del complemento, únicamente los extractos acuosos de *Laccaria amethystina* y *Armillariella polymyces* mostraron actividad inhibitoria con efecto dosis-respuesta (Gráficas 4 y 5).

Tabla 6. Actividad inmunomoduladora de extractos de basidiomicetos sobre la vía alterna del complemento.

Concentración (mg/mL)	<i>Armillariella polymyces</i>				<i>Cantharellus lateritius</i>	
	extracto acuoso		extracto etanólico		extracto acuoso	
	% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición
	Media ± DS	Actividad*	Media ± DS	Actividad*	Media ± DS	Actividad*
1000.0	99 ± 7	+	87 ± 3	+	80 ± 2	+
333.3	97 ± 8	+	84 ± 2	+	86 ± 5	+
111.1	98 ± 3	+	62 ± 3	⁻¹	73 ± 9	+
37.0	96 ± 8	+	60 ± 5	⁻¹	58 ± 9	⁻¹
12.3	63 ± 21	⁻¹	56 ± 3	⁻¹	58 ± 13	⁻¹
4.1	38 ± 15	-	58 ± 2	⁻¹	50 ± 7	-
1.4	24 ± 5	-	56 ± 4	⁻¹	57 ± 13	⁻¹

* (+) = POSITIVA con un % hemólisis > 50% (p < 0.05)

(-) = NEGATIVA con un % hemólisis < 50% (p < 0.05)

DS = Desviación estándar

¹ Resultados interpretados como negativo porque a pesar de tener un % de inhibición mayor de 50 %, no mostraron diferencia significativa con la prueba de Tukey.

Fuente: Datos Experimentales

Tabla 7. Actividad inmunomoduladora de extractos de basidiomicetos sobre la vía alterna del complemento.

Concentración (mg/mL)	<i>Laccaria amethystina</i>			
	extracto acuoso		extracto etanólico	
	% Inhibición Media ± DS	Actividad*	% Inhibición Media ± DS	Actividad*
1000	92 ± 1	+	99 ± 6	+
333.3	94 ± 6	+	92 ± 4	+
111.1	86 ± 4	- ¹	87 ± 5	- ¹
37.0	74 ± 7	- ¹	80 ± 9	- ¹
12.3	67 ± 6	- ¹	73 ± 3	- ¹
4.11	36 ± 22	-	73 ± 3	- ¹
1.4	37 ± 20	-	80 ± 5	- ¹

(+) = POSITIVA con un % hemólisis > 50% (p < 0.05)

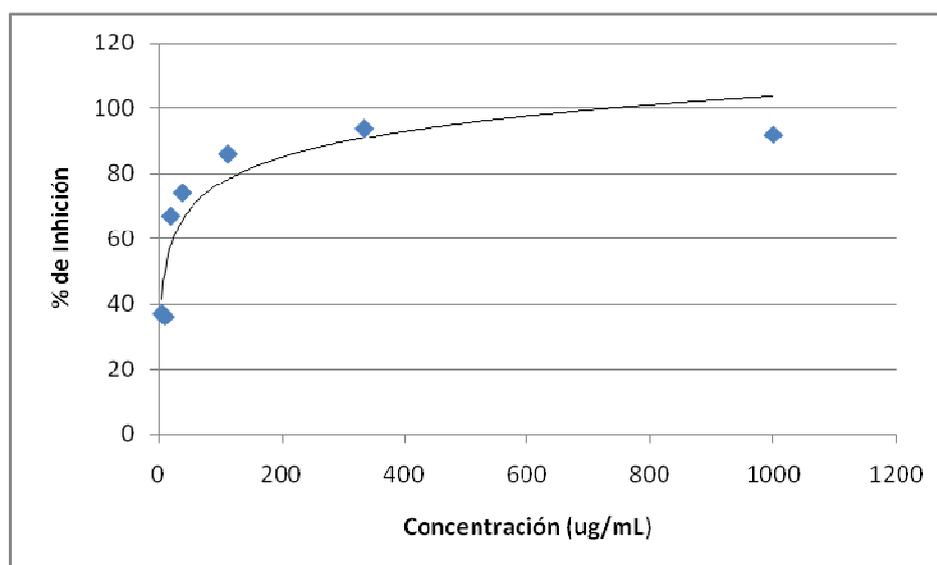
..... (-) = NEGATIVA con un % hemólisis < 50% (p < 0.05)

..... DS = Desviación estándar

¹ Resultados interpretados como negativo porque a pesar de tener un % de inhibición mayor de 50 %, no mostraron diferencia significativa con la prueba de Tukey.

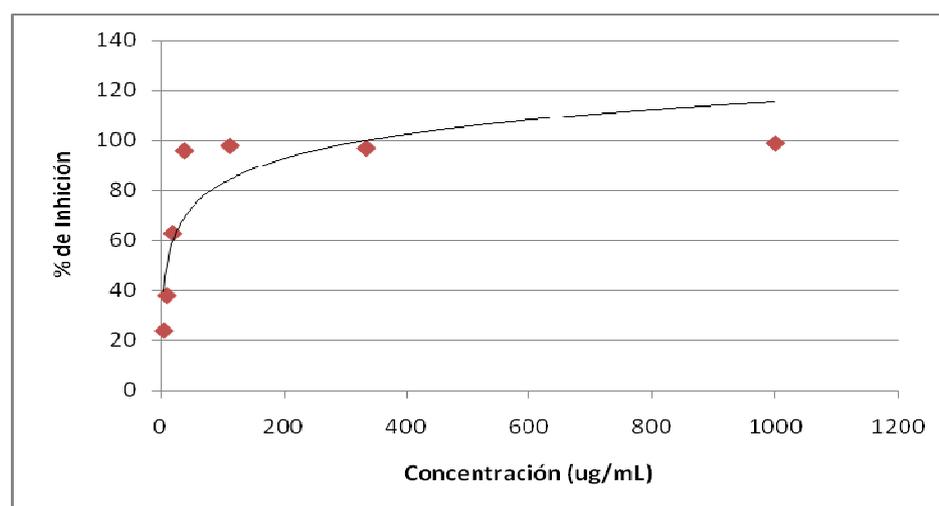
Fuente: Datos Experimentales

Gráfica 4. Efecto dosis respuesta del extracto acuoso del basidiomiceto *Laccaria amethystina* sobre la vía alterna del complemento.



Fuente: Datos Experimentales

Gráfica 5. Efecto dosis respuesta del extracto acuoso del basidiomiceto *Armillariella polymyces* sobre la vía alterna del complemento.



Fuente: Datos Experimentales

Tabla 8. Actividad inmunomoduladora de extractos de basidiomicetos sobre la proliferación de linfocitos.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Pleurotus ostreatus</i> extracto acuoso		<i>Pleurotus ostreatus</i> extracto etanólico		<i>Cantharellus lateritius</i> extracto etanólico	
	% Inhibición		% Inhibición		% Inhibición	
	Media \pm DS	Actividad *	Media \pm DS	Actividad*	Media \pm DS	Actividad*
1000	38 \pm 14	I+	98 \pm 3	I+	119 \pm 13	I++
500	52 \pm 14	I+	80 \pm 8	I+	119 \pm 13	I++
250	28 \pm 15	I \pm	72 \pm 11	I+	91 \pm 10	I+
125	28 \pm 18	I \pm	79 \pm 7	I+	92 \pm 10	I+
62.5	20 \pm 18	-	78 \pm 13	I+	81 \pm 11	I+
31.2	27 \pm 18	I \pm	65 \pm 25	I+	97 \pm 8	I+
15.6	9 \pm 17	-	66 \pm 9	I+	94 \pm 12	I+

*Porcentaje de Inhibición de 25-30 % = I \pm
 Porcentaje de Inhibición de 31-100 % = I+
 Porcentaje de Inhibición de 101 - 200 % = I++
 Porcentaje de Inhibición mayor de 201 = I+++
 DS: Desviación estándar.

Fuente: Datos experimentales

Como puede observarse en la tabla 8, los extractos acuoso y etanólico de *Pleurotus ostreatus* y el extracto etanólico de *Cantharellus lateritius* mostraron actividad inhibitoria sobre la proliferación de linfocitos, pero no se observa un efecto de dosis respuesta, razón por la cual no es posible calcular la concentración inhibitoria media (CI₅₀).

Los basidiomicetos *Laccaria amethystina* y *Armillariella polymyces*, presentaron actividad inhibitoria y efecto dosis respuesta y se les calculó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) (Tabla 9), mientras que a pesar de que *Cantharellus lateritius*, *Pleurotus ostreatus* y *Lactarius deliciosus* presentaron actividad inmunomoduladora, no se les calculó CI₅₀ ya que su efecto no fue dependiente de la dosis.

Tabla 9. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los extractos etanólicos y acuosos de basidiomicetos que presentaron actividad inmunomoduladora.

Basidiomiceto	Tipo de extracto	Bioensayo	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Laccaria amethystina</i>	Acuoso	VCC	12
<i>Laccaria amethystina</i>	Acuoso	VAC	5
<i>Laccaria amethystina</i>	Etanólico	VAC	-*
<i>Armillariella polymyces</i>	Acuoso	VCC	14
<i>Armillariella polymyces</i>	Etanólico	VCC	-*
<i>Armillariella polymyces</i>	Acuoso	VAC	5
<i>Armillariella polymyces</i>	Etanólico	VAC	-*
<i>Cantharellus lateritius</i>	Acuoso	VCC	-*
<i>Cantharellus lateritius</i>	Etanólico	VCC	-*
<i>Cantharellus lateritius</i>	Etanólico	Linfoproliferación	-*
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Etanólico	VCC	-*
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Etanólico	Linfoproliferación	-*
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Acuoso	Linfoproliferación	-*
<i>Lactarius deliciosus</i>	Acuoso	VCC	0.04

* Los resultados de actividad inmunomoduladora no presentan un efecto dosis-respuesta por lo cual no es posible calcular la concentración inhibitoria media.

VCC = Vía del complemento clásica

VAC = Vía del complemento alterna

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha referido el uso de hongos comestibles con fines terapéuticos en países asiáticos, y como ejemplo de ello se puede mencionar *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* y *Grifola frondosa*. Se ha reportado que los principales componentes biológicos presentes en basidiomicetos que pueden ser utilizados como agentes terapéuticos son glucanos, polisacáridos y triterpenos; los cuales pueden actuar sobre la inmunidad inespecífica y sobre la proliferación de linfocitos (6, 8, 19, 23).

Los principales mecanismos de defensa inmunitaria incluyen la activación del complemento y de los linfocitos T y B. Para la evaluación de dichos mecanismos, se realizaron tres bioensayos diferentes: actividad linfoproliferativa y activación de la vía clásica y vía alterna de complemento; utilizando extractos acuosos y etanólicos de los basidiomicetos incluidos en la investigación. Se calculo el porcentaje de recuperación obteniéndose valores bastante bajos, esto principalmente se debe a que los basidiomicetos están conformados por un alto porcentaje de agua, el cual se perdió durante el proceso de desecación.

La evaluación del sistema de complemento se realizó con el ensayo descrito por Klerx *et al.*, que se basa en la hemólisis de los eritrocitos por el complejo de ataque a la membrana (CAM) generado al activarse el complemento (35).

Los cinco basidiomicetos estudiados: *Pleurotus ostreatus*, *Cantharellus lateritius*, *Armillariella polomyces*, *Laccaria amethystina* y *Lactarius deliciosus* presentaron actividad inmunomoduladora inhibitoria (Tabla 1).

En el ensayo linfoproliferativo del presente estudio, fue encontrada actividad inhibitoria en los extractos etanólico y acuoso de *Pleurotus ostreatus* y el extracto etanólico de *Cantharellus lateritius*. En contraste no fue observada ninguna actividad en *Lactarius deliciosus*, *Armillariella polomyces* y *Laccaria amethystina* (Tabla 1).

Así mismo, los cinco basidiomicetos mostraron actividad inhibitoria sobre la activación de vía del complemento. En lo que respecta a la vía clásica, los extractos acuoso y etanólico de *A.*

polymyces y *C. lateritius* y los extractos acuosos de *L. amethystina* y *L. deliciosus* presentaron actividad inhibitoria (Tablas 4 y 5); sin embargo, solamente se observó efecto dosis respuesta para los extractos acuosos de *A. polymyces*, *L. amethystina* y *L. deliciosus* (Gráficas 1, 2 y 3). Se obtuvo una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 111.1 µg/mL y un CI₅₀ de 12 µg/mL para *L. amethystina*, por lo cual a pesar de existir actividad dosis-respuesta, la concentración de extracto a la cual todavía presenta actividad inhibitoria, sobrepasa aproximadamente diez veces la concentración a la cual presenta el 50% de inhibición (CI₅₀). De forma similar, para *Armillariella polymyces*, en el ensayo de activación de la vía clásica, se obtuvo una concentración inhibitoria mínima de 37.0 µg/mL y un CI₅₀ de 14 µg/mL y para *L. deliciosus* se obtuvo CI₅₀ de 0.04 µg/mL y una CIM de 333.3 µg/mL. Para ambos hongos, a pesar de existir actividad y dosis-respuesta, la concentración de extracto a la cual todavía presenta actividad inhibitoria, sobrepasa la concentración a la cual hay 50% de inhibición (CI₅₀) (Tabla 9).

En el caso de la vía alterna del complemento, los extractos acuosos de *Laccaria amethystina* y *Armillariella polymyces* exhibieron una actividad inhibitoria (Tablas 6 y 7), obteniéndose una CIM de 333.33 µg/mL y 37.0 µg/mL, respectivamente; ambos mostraron un efecto dosis respuesta (Gráficas 4 y 5) y una CI₅₀ de 5 µg/mL (Tabla 9). El extracto acuoso de *C. lateritius* también mostró actividad inhibitoria, pero sin efecto dosis-respuesta.

Schepetkin y colaboradores encontraron una actividad estimuladora en macrófagos peritoneales y células asesinas naturales por *Pleurotus ostreatus* (10), y en la presente investigación fue encontrada una acción de tipo inhibitorio para la población linfocítica (Tabla 8). Esto reafirma la influencia que presenta este basidiomiceto en la inmunomodulación en diferentes tipos de células inmunes, aunque queda por determinarse el tipo de compuestos responsables. En los estudios mencionados se utilizaron porciones derivadas de proteoglicanos y en el presente estudio se emplearon extractos crudos. Sin embargo, no se observa ninguna tendencia o un efecto dosis-respuesta.

El extracto etanólico de *Cantharellus lateritius* presentó actividad inhibitoria sobre la proliferación de linfocitos sin observación de efecto dosis-respuesta. Al no existir efecto dosis-respuesta en las diferentes concentraciones de los extractos antes mencionados, no es posible calcular un CI₅₀ (Tabla 9), pudiendo inferir que no es segura su utilización como

inmunomodulador; del mismo modo tampoco puede asegurarse que el extracto etanólico sea mejor que el acuoso o viceversa.

Los resultados obtenidos, aunados al bajo porcentaje de recuperación resultan en efectos inmunomoduladores difícilmente aplicables, ya que se requieren elevadas cantidades de los basidiomicetos estudiados para lograr un efecto considerable. Sin embargo, es probable que mediante el aislamiento de los compuestos responsables de las actividades observadas, se puedan obtener mejores resultados.

X. CONCLUSIONES

1. Los basidiomicetos *Pleurotus ostreatus*, *Armillariella polymyces*, *Cantharellus lateritius*, *Laccaria amethystina* y *Lactarius deliciosus* presentan actividad inmunomoduladora significativa ($p < 0.05$).
2. Los extractos acuoso y etanólico del basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* y el extracto etanólico de *Cantharellus lateritius*, exhibieron actividad inhibitoria significativa ($p < 0.05$) de la linfoproliferación sin efecto dosis-respuesta.
3. Los extractos acuoso y etanólico de *Armillariella polymyces* mostraron actividad inhibitoria significativa ($p < 0.05$) sobre la acción del complemento tanto en la vía clásica como en la vía alterna.
4. Los extractos acuoso y etanólico de *Cantharellus lateritius* y los extractos acuosos de *Laccaria amethystina* y *Lactarius deliciosus* exhibieron actividad inhibitoria significativa ($p < 0.05$) sobre la vía clásica del sistema de complemento.
5. Los extractos acuosos de *Cantharellus lateritius* y *Laccaria amethystina* mostraron actividad inhibitoria significativa ($p < 0.05$) sobre la vía alterna del complemento.
6. El extracto acuoso de *Armillariella polymyces* posee actividad inhibitoria sobre las vía clásica y alterna del complemento con efecto dosis-respuesta y una concentración inhibitoria mínima de 37.0 $\mu\text{g/mL}$.
7. El extracto acuoso de *Laccaria amethystina* posee actividad inhibitoria sobre la vía clásica del complemento con efecto dosis-respuesta y una concentración inhibitoria mínima de 111.1 $\mu\text{g/mL}$ y sobre la vía alterna con una concentración inhibitoria mínima de 333.33 $\mu\text{g/mL}$.
8. El extracto acuoso de *Lactarius deliciosus* posee actividad inhibitoria sobre la vía clásica del complemento con efecto dosis-respuesta y una concentración inhibitoria mínima de 333.3 $\mu\text{g/mL}$.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar la búsqueda de actividad inmunomoduladora sobre otros mecanismos y células inmunes, tales como la respuesta inmune humoral, macrófagos y fagocitosis, entre otros.
2. Realizar los mismos bioensayos con compuestos aislados de los extractos de los hongos y demostrar una mejor actividad inmunomoduladora.
3. Establecer controles celulares de los donantes de linfocitos, ya que es un factor que varía cada vez que se realiza el bioensayo de linfoproliferación.
4. Crear un pool de sueros y conservarlo bajo condiciones controladas para su uso periódico como fuente de complemento en los ensayos hemolíticos.
5. Controlar las condiciones de cautiverio de los donantes animales, siguiendo los estándares recomendados para bioterios.
6. Realizar los ensayos en condiciones ambientales similares durante todo el proceso (temperatura y humedad).

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bran MC, *et al.* Contribución al conocimiento de los hongos comestibles en Guatemala. IIQB Revista Científica 2003; 1: 5-10.
2. Molitoris H. Fungi: companions of man in good and evil. International Journal of Medicinal Mushroom 2005; 7:49-73.
3. Sommerkamp, YS. Hongos comestibles en los mercados de Guatemala; Cuadernos de investigación. Guatemala: Dirección General de Investigación, Documento Técnico No.3-90, 1990. 77p. (p.11,27).
4. Morales O, *et al.* Las especies de género *Laccaria* (Agaricales) en Guatemala. IIQB Revista Científica 2002; 16: 89-94.
5. López A. Hongos comestibles y medicinales de México. p. 208
6. Harada T, *et al.* Comparison of the immunomodulating activities of 1,3- β -glucan fractions from the culinary-medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf.:Fr. (Aphyllophoromycetidae) International Journal of Medicinal Mushroom 2006; 8: 231-244.
7. Rojas W. 1995. Inmunología. Medellín, Colombia. Décima Edición. Impresiones Rojo.
8. Parslow G, Stites P, Imboden B. Inmunología básica y clínica. México: Editorial Manual Moderno, 2002. 917p.
9. Masihi K. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. International Immunopharmacology 2002; 22:1083–1091.
10. Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation therapeutic potential. International Immunopharmacology 2006; 6:317–333.
11. Im SA, *et al.* Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*. International Immunopharmacology 2006; 6:1451-1458.
12. Ohno N. Structural diversity and physiological functions of β -glucans. International Journal of Medicinal Mushroom 2005; 7:167-173.
13. Lu QY, *et al.* *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. Cancer Letters 2004; 216:9–20.

14. Chen HS, *et al.* Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004; 12:5595–5601.
15. Kim KC, *et al.* Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells by the *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts. *Cancer Letters* 2006; 20:1–8.
16. Johnston N. Medicinal mushroom cuts off prostate cancer cells' blood supply. *DDT* 2005; 10: 23/24.
17. Müller C, *et al.* *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Research* 2006; 30:841–848.
18. Wang HX, Ng TB. A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 313:37-41.
19. Liu J, *et al.* Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry* 2007; 100:1691–1696.
20. Jones S, Janardhanan K. Antioxidant and Antitumor Activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Krast.-Reishi (Aphyllophoromycetidae) from South India. *International Journal of Medicinal Mushroom* 2000; 2:195-200.
21. Hobbs C. *Medicinal Mushrooms: an exploration of tradition, healing & culture*. Canada: Botanica Press, 1995. 208 p. (p 18).
22. Kaneno R, *et al.* Antitumor and immunomodulatory effects of culinary medicinal Shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer: Analysis of NK activity, lymphoproliferative response, and antibody production. *International Journal of Medicinal Mushroom* 2004; 6:
23. Krasnopolskaya L, *et al.* Screening systems for medicinal Basidiomycetes antitumor effects. *International Journal of Medicinal Mushroom* 2005; 7: 145-149.
24. Yap A, Ng M. Immunopotentiating properties of lentinan (1→3)- β -D-glucan extracted from culinary-medicinal Shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (*Agaricomycetidae*). *International Journal of Medicinal Mushroom* 2003; 5:339-358.
25. Volz P. Early historic cancer chemotherapy work involving basidiomycetous mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushroom* 1999; 1:191-194.

26. Xingfeng B, *et al.* Chemical modifications of the (1₃)- β -D-glucan spores of *Ganoderma lucidum* and investigation physicochemical properties and immunological. *Carbohydrate Research* 2001; 336:127–140.
27. Yu-Huan G, *et al.* Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. *Cancer Letters* 2005; 220: 21–28.
28. Hong L, *et al.* Maitake beta-glucan MD-fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. *International Immunopharmacology* 2004; 4:91–99.
29. Lu ZM, *et al.* Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillariella tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 1998; 36:563-574.
30. Liu DL, *et al.* Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39:461-466.
31. Liu DL, *et al.* Detoxification of aflatoxin B₁ by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Enzyme Engineering* 2006; 864: 586-591.
32. Kim JH, Kim YS. A Fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1999; 63 (12):2130-2136.
33. Adachi Y, *et al.* Th1-oriented immunomodulating activity of gel-forming fungal (1 \rightarrow 3)-beta-glucans. *International Journal of Medicinal Mushroom* 2002; 4: 95-109.
34. Mizuno M, *et al.* Antitumor polysaccharides from edible and medicinal mushrooms and immunomodulating action against murine macrophages. *International Journal of Medicinal Mushroom* 2001; 3:355-360.
35. Klerx JP, *et al.* Microscopy for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *Journal of Immunological Methods* 1983; 63:215-220.

ANEXOS

Anexo 1: Fotografías de hongos comestibles captadas durante su recolecta.



Lactarius deliciosus. Cortesía de Roberto Cáceres.



Pleurotus ostreatus. Cortesía de Roberto Cáceres.



Cantharellus lateritius. Fuente: www.mushroomexpert.com

Anexo 2: Nombres comunes de los basidiomicetos comestibles estudiados.

Nombre científico	Nombre Común	Localidad donde recibe ese nombre
<i>Lactarius deliciosus</i>	Amacaria Cabeza de Xara Kaqix (Kaqchikel) Mancel (Chuj) Xara Xara Amarilla	Chipotón (Sumpango) Guatemala Tecpán, Guatemala San Mateo Ixtatán Guatemala, Salamá, Cobán, Totonicapán Chimaltenango
<i>Cantharellus lateritius</i>	Anacate	Mixco, Guatemala, Antigua, Chimaltenango, Santa Cruz del Quiché, Sololá, Cuilapa, Jalapa, Jutiapa.
<i>Laccaria amethystina</i>	Jolon Xar (Kaqchikel) Pawi' Xar (Kaqchikel) Monja Sombrerito	Tecpán, Guatemala
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Saq Itzaj (Mam)	Todos Santos Cuchumatán
<i>Armillariella polymyces</i>	Silip (Q'eqchi')	Cobán

Fuente: Bran González, MC. Hongos comestibles de Guatemala: diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. Dirección General de Investigación. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Universidad de San Carlos de Guatemala, Enero 2002. 77p.