

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



**EFECTOS INMUNOMODULADORES Y ANTIMICROBIANOS
DE BASIDIOMICETOS COMESTIBLES Y CULTIVADOS
DEL GÉNERO *PLEUROTUS* SPP.**

ADOLFO NOÉ SIMÓN DIONICIO

ANGEL ESTUARDO ESCOBAR GARCÍA

QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, AGOSTO DE 2018

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

**EFFECTOS INMUNOMODULADORES Y ANTIMICROBIANOS DE BASIDIOMICETOS
COMESTIBLES Y CULTIVADOS DEL GÉNERO *PLEUROTUS* SPP.**

Seminario de Investigación

Presentado por

ADOLFO NOÉ SIMÓN DIONICIO

ANGEL ESTUARDO ESCOBAR GARCÍA

Para optar al título de
QUÍMICOS BIÓLOGOS

Guatemala, Agosto de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por acompañarnos y guiarnos a lo largo de nuestra carrera, por proporcionarnos fortaleza durante este difícil trayecto además de brindarnos una vida llena de conocimientos.

A NUESTROS PADRES

Natividad Dionicio Reyes, Benjamín Simón, Thelma Elizabeth García Montufar, Fredy Estuardo Escobar. Por su inmenso amor y apoyo constante en cada una de las distintas etapas de nuestra vida, por su esfuerzo y dedicación al proporcionarnos una educación y por ser un ejemplo de vida.

A NUESTROS HERMANOS Y HERMANAS

Juan José Juárez Dionicio, Estuardo Benjamín Simón Dionicio, Dulce Victoria Escobar García, Mery Elizabeth Escobar García, por ser parte importante de nuestra vida, por su apoyo incondicional además de paciencia y cariño.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por ser nuestra *Alma mater* y abrirnos las puertas para nuestra superación profesional, en especial a **La Facultad De Ciencias Químicas y Farmacia**, por ser nuestro segundo hogar y proporcionarnos los conocimientos necesarios para nuestra formación profesional.

A NUESTRAS ASESORAS, Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez y QB Madre Ivonne Sommerkamp

Por su tiempo, dedicación y paciencia para la elaboración de esta investigación.

A NUESTRO REVISOR, Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel

Por su tiempo, dedicación y paciencia para la revisión de esta investigación.

A TODAS LAS PERSONAS E INSTITUCIONES COLABORADORAS

Por brindarnos su apoyo y ayuda en todo momento

ÍNDICE

I.	RESUMEN	5
II.	ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	7
III.	ANTECEDENTES	8
A.	Hongos comestibles	9
B.	<i>Pleurotus</i>	12
C.	Cultivo de <i>Pleurotus</i>	14
D.	Cultivo artesanal en comunidades campesinas de Guatemala	15
E.	Inmunidad	17
F.	Basidiomicetos e Inmunidad	18
G.	Antibiótico (Antimicrobiano)	21
H.	Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)	21
I.	Concentración Mínima Bactericida (CMB)	21
J.	<i>Pleurotus</i> spp como antimicrobiano e inmunomodulador	22
IV.	JUSTIFICACIÓN	26
V.	OBJETIVOS	27
VI.	HIPÓTESIS	28
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
VIII.	RESULTADOS	50
IX.	DISCUSIÓN	55
X.	CONCLUSIONES	59
XI.	RECOMENDACIONES	60
XII.	REFERENCIAS	61
XIII.	ANEXOS	68

I. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la investigación de la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de extracto etanólico preparado de *Pleurotus* spp por medio de bioensayos *in vitro* sobre bacterias, levaduras y linfocitos humanos. Los basidiomicetos del género *Pleurotus* spp. utilizados fueron cultivados en el municipio de Chimaltenango, departamento de Chimaltenango. Los cuerpos fructíferos fueron desecados y almacenados en congelación a -20°C, los que luego fueron sujetos al proceso de extracción por percolación con etanol al 95% como solvente y concentración con rotavapor, obteniéndose un porcentaje de rendimiento del 4.4%

Las actividades del extracto fueron evaluadas por métodos estandarizados. El ensayo de linfoproliferación fue realizado mediante la separación de linfocitos de sangre completa de donante humano sano, resuspendidos en medio para cultivo celular RPMI-FBS (Sigma Aldrich) los cuales fueron enfrentados posteriormente con diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Pleurotus* spp. La mezcla fue incubada en placas por cuatro días a 37°C con 5% de CO₂ y la viabilidad celular fue determinada mediante el recuento celular realizando en columnas control, columnas con lectina y recuento en columnas con extracto. El extracto etanólico de *Pleurotus* spp. presentó actividad inhibitoria con una concentración efectiva mínima (31.25 µg/mL). La relación dosis-efecto del extracto etanólico sobre el ensayo de linfoproliferación demostró una relación directamente proporcional, entre el porcentaje de inhibición y la concentración del extracto.

La actividad antibacteriana y antilevadura fue evaluada utilizando la metodología descrita por Mitcher y colaboradores. Mientras que la actividad antifúngica micelial fue determinada con la metodología descrita por Brancato & Holding modificada por McRae. El extracto etanólico no presentó actividad antimicrobiana a la concentración de 1 mg/mL contra las cepas bacterianas gram positivo, gram negativo y levaduras. Se considera como punto de referencia la concentración de 1 mg/mL como mínima, ya que al presentar alguna actividad a una concentración menor, ésta pierde significancia e interés para un eventual desarrollo como fármaco debido a su bajo rendimiento.

El extracto de *Pleurotus* mostró actividad contra hongos dermatofitos observando inhibición contra *Microsporum canis* y *M. nanum* una concentración de 1mg/ml.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La medicina natural está basada en la utilización de plantas y hongos, los cuales son considerados como una fuente alternativa, como se ha hecho durante muchos años en países orientales. Esto permite considerar a los hongos que además de fuente ser una nutricional, también pueden ser agentes terapéuticos y/o profilácticos de muchas enfermedades infecciosas, degenerativas, entre otras.

En Guatemala existe el interés por los hongos, aunque muchos de los estudios realizados están dirigidos a la caracterización taxonómica y no a sus actividades biológicas, tales como el efecto inmunomodulador y antimicrobiano que estos pueden presentar. Sin embargo, existen estudios previos como el de Lorenzana, Mazariegos, Paz y Sommerkamp (2009) en donde se demostró que los extractos de *Grifola frondosa* aumentan la proliferación de linfocitos *in vitro*, entre 1.2 y 1.6 veces. De igual forma González, et al, (2010) realizaron un análisis para la determinación de la actividad inmunomoduladora de cinco basidiomicetos comestibles los cuales presentaron alguna actividad inhibitoria.

Tomando en cuenta lo mencionado por Llauradó, Morris, Albear, Casta y Bermúdez (2011) y los estudios previos mencionados, donde se ha evidenciado que la modulación del sistema inmune puede contribuir al mantenimiento de un buen estado de salud, en este estudio se pretendió establecer la actividad biológica del extracto etanólico de *Pleurotus* spp, sobre la actividad linfoproliferativa *in vitro* así como la actividad antimicrobiana en cultivos bacterianos, hongos dermatofitos y hongos levaduriformes.

La línea de investigación en que se enmarca este seminario es la búsqueda de actividad inmunomoduladora y biocida de productos naturales, área que estudia la Unidad de Investigación “Laboratorio de Bioensayos” del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

III. ANTECEDENTES

Dentro de los recursos que integran los sistemas naturales, los hongos presentan una gran relevancia, aunque muchos de sus potenciales utilidades son desconocidas, ya que pueden poseer distintas características que no son explotadas por el hombre. Los hongos son uno de los grupos de organismos que incluye un mayor número de especies, con relación a los demás organismos. Los estimados sobre el número de especies fúngicas es bastante difícil, ya que varía notablemente de unos autores a otros, tanto en el número de especies descritas como en las que se respecta a las especies estimadas (García, 2005).

El estudio sistemático de los hongos tiene tan sólo 250 años, pero el conocimiento empírico del Reino Fungi se conocen desde hace cientos de años. Basándose en la diversidad de este Reino, se reporta que existen entre 1.5 a 5.1 millones de especies (Cano y Romero, 2016).

Los micólogos debatieron durante más de 200 años sobre qué organismos se deben considerar como hongos. En menos de 5 años, la secuenciación del ADN proporcionó una multitud de nuevos ejemplares para el análisis y se identificó alrededor de 10 *phyla* como miembros del monofilético reino Fungi (Blackwell, 2011).

La mayoría de los hongos carecen de flagelos y tienen cuerpos filamentosos con carbohidratos distintivos de la pared celular y tallos haploides como resultado de la meiosis cigótica. Interactúan con todos los grupos principales de organismos. Por su descendencia de un ancestro compartido con animales, hace aproximadamente mil millones de años más o menos 500 millones de años, los hongos constituyen un importante linaje eucarionte igual en número a los animales y excediendo las plantas. El grupo incluye mohos, levaduras, setas, royas y parásitos de plantas (Blackwell, 2011).

Los hongos son esenciales para la supervivencia de muchos grupos de organismos con los que forman asociaciones. Ellos también llamaron la atención como depredadores de animales, patógenos de plantas y humanos, además algunas especies son consideradas productores de metabolitos secundarios y son sujetos de investigación. Las herramientas

moleculares en uso y en desarrollo se puede utilizar para descubrir los hongos desconocidos en el mundo en menos de 1000 años (Blackwell, 2011).

Los hongos desempeñan papeles clave en los ecosistemas como descomponedores, mutualistas y patógenos, pero en la mayoría de los casos, se desconoce el papel de los hongos individuales en la naturaleza. Aparte de estos roles, los hongos tienen una importancia económica adicional como agentes de control biológico y como productos químicos productores para la industria farmacéutica y otras industrias (Schmit & Mueller, 2007).

Asimismo, una gran cantidad de especies de hongos se consideran como ingredientes gourmet alrededor del mundo, lo cual ha hecho que aumente su cultivo, además de que también son considerados como alimento nutracéutico. Se han comprobado que unas especies tienen propiedades medicinales y farmacológicas y entre ellos: *Lentinus edodes*, *Pleurotus* spp. y *Flammulina velutipes* (Valverde, Hernández & Paredes, 2015).

La determinación de la magnitud y los patrones de la diversidad de especies de hongos ha sido un desafío continuo para los micólogos. Los hongos son poco conocidos y a menudo efímeros y crípticos, lo que los hace difíciles de inventariar. A pesar de estas dificultades, se sabe que los hongos son extremadamente diversos (Schmit & Mueller, 2007).

A. Hongos comestibles

Los hongos comestibles pueden dividirse en dos grandes grupos: Los saprobios, que utilizan la materia orgánica en descomposición y los micorrícicos, que forman simbiosis mutualistas con las raíces de las plantas, la cual posee un principal interés forestal (Bran, Morales, Cáceres y Flores, 2003)

El cultivo de hongos se ha vuelto popular en todo el mundo, en 1999 la producción de hongos comestibles se estimó en más de 7 millones de toneladas. El valor del mercado

entre hongos comestibles y hongos medicinales fue estimado en más de U.S. 30 mil millones (Chang & Miles, 2004).

Además, varios presentan capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos que abarca agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales y citostáticos; también, enzimas reguladoras de crecimiento y productoras de aromas; componentes activos antioxidantes como policetonas, fenoles, purinas, pirimidinas, quinonas y terpenoides (Türkoğlu, Emin & Merca, 2007).

Desde tiempos antiguos el hombre ha usado los hongos recolectados en la naturaleza como alimento y se estima que el primer cultivo intencional de hongos tuvo lugar alrededor del año 600 antes de Cristo. La primera especie cultivada fue *Auricularia auricula*, la segunda especie *Flammulina velutipes* y tercera *Lentinula edodes*. Estas especies de hongos comestibles se cultivaron en China por primera vez (Chang & Miles, 2004).

Aunque las especies comestibles son muy numerosas, en el mundo se cultivan a escala industrial seis especies estas son: *Agaricus bisporus* (Champiñon de Paris), *Auricularia* spp. (Hongo oreja de los árboles), *Flammulina velutipes* (Hongo de invierno), *Lentinula edodes* (Shiitake), *Pleurotus* spp. (Hongo ostra) y *Volvariella volvaceae* (Hongo de la paja) (Zaluaga, 2001).

El gran aumento en el número de especies cultivadas en los años 80 y 90 corresponde a la dramática aceleración de la producción mundial total de hongos cultivados de las diez especies más populares: *Agaricus bisporus/bitorquis*, *L. edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricularia* spp., *Volvariella volvacea*, *F. velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Hypsizygus marmoreus*, *Pholiota nameko*, y *Grifola frondosa* (Chang & Miles, 2004).

La popularidad de los hongos comestibles se debe no solamente a su valor culinario, sino también a su valor como fuente de proteínas; ya que su contenido protéico es similar al del maíz, la leche y las legumbres juntas y por lo que se puede decir que los hongos tienen

un contenido de proteína casi dos veces más alto que la mayoría de los vegetales. Los hongos son una fuente excelente de vitaminas del complejo B, tales como vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), ácido nicotínico y ácido pantoténico. Todos los vegetales son pobres en vitamina B12 y la deficiencia de esta vitamina puede ocasionar anemia. Una investigación realizada en 1981 mostró que con tan solo tres gramos de hongos frescos se puede suministrar la dosis diaria necesaria de vitamina B12 (Zaluaga, 2001).

Por otro lado, los hongos también contienen vitamina C, vitamina K y las vitaminas A y E las cuales están presentes en pequeñas cantidades. Los contenidos de vitamina D y niacina son casi equivalentes a los niveles encontrados en carne de cerdo y res. Además también son considerados una fuente de minerales los cuales incluyen potasio, fósforo, calcio, magnesio, hierro y cobre, además de ácido fólico, una sustancia que disminuye la obstrucción arterial, previniendo enfermedades coronarias e infartos (Zaluaga, 2001).

Guatemala, a pesar de su relativamente pequeña área (108.889 kilómetros cuadrados), representa uno de los países con la biodiversidad más ricas del mundo, esta biodiversidad se debe a la variedad de su territorio y de los ecosistemas que se dan desde el nivel del mar hasta más de 4.000 metros de altura, desde las selvas subtropicales hasta las tropicales, en donde se incluyen bosques nublados como también bosques mixtos y bosques de pino-abeto. A pesar de esta riqueza, existe un gran desconocimiento sobre la microbiota del país (Flores, Comandini & Rinaldi, 2012; Tolisano & López, 2010).

En nuestro país, los hongos se consideran como fuente de alimento, mientras en países como China y Japón, los hongos además de ser comestibles, son considerados medicinales, ya que se utilizan como agentes terapéuticos y profilácticos frente a una variedad de enfermedades infecciosas, metabólicas hasta cáncer (González, Oliva, Ramírez, Rodríguez, Sánchez y Paz, 2010)

El potencial que presentan los hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica es muy difícil de cuantificar, sin embargo, se considera de gran importancia por la diversidad

de hongos involucrada en esta región. La economía global exige una innovación en las actividades productivas y que plantea la búsqueda de alimentos más sanos y la existencia de consumidores más informados, presenta a la vez una oportunidad y un peligro para los hongos silvestres comestibles (Andrade, 2012).

B. *Pleurotus*

Como se ha mencionado, en Guatemala existe una numerosa cantidad y variedad de especies de hongos comestibles, los cuales se encuentran de forma silvestre en los bosques, de las cuales cabe resaltar el género *Pleurotus*, el cual es reconocido por la población como comestible. Dentro de las especies reportadas en Guatemala cultivadas de forma artesanal se encuentra, *P. djamor* var *djamor*, *P. djamor* var *roseus*, *P. levis* y *P. ostreatus*, por otro lado en lo que se refiere a producción comercial, además de *P. ostreatus* también se cultiva *P. eryngii* (Bran, Morales, Flores, Cáceres y Gurriarán, 2010).

Pleurotus es un género, que se caracteriza por presentar de gran variedad de tamaños, por lo general se desarrollan sobre madera y, usualmente crecen en grupos con estípites generalmente excéntricos. Además, no presenta velo ni anillo, de igual forma es himenóforo con láminas (Philips, 1991).

Asimismo, los hongos del género *Pleurotus* tienen de trama himenoforal irregular, la cual está conformada por hifas de pared delgada o gruesa. La esporada es de color blanco puro o con una coloración crema, con frecuencia pálida. Las esporas son hialinas, lisas a veces cilíndricas, las cuales poseen un tamaño desde pequeñas a largas, inamiloides; basidios normales, queilocistidios usualmente presentes, posee un subhimenio bien desarrollado y bien diferenciado. La trama del píleo es inamiloide, con numerosas fíbulas. Es de distribución cosmopolita, además de que todas las especies son consideradas comestibles (Singer, 1975).

El género *Pleurotus* presenta basidiomas generalmente grandes, carnosos, solitarios, blanco, crema, gris, rosa, marrón, más raramente azul, amarillo o lila. El estípites es corto,

sólido, excéntrico a lateral, raramente subcentral. Lamelas decurrentes, a veces anastomosado al tallo, de color claro. Velo presente o ausente en el margen de píleo formando una zona anular en el estípite. Esporas de color blanco, crema, rosa o lila. Esporas cilíndricas a subcilíndricas, de pared delgada, no amiloide o dextrinoide, sin poro germinal (Lechner, Wright & Albertó, 2004).

La clasificación taxonómica es la siguiente: Reino Fungi, Phylum Basidiomycota, Subclase Basidiomycetes, Clase Agaricomycetidae, Orden Agaricales, Familia *Pleurotaceae*, Género *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm, 1871. Por otro lado, durante la década pasada, *P. ostreatus* fue catalogado como alimento funcional, al igual que otros hongos, dados sus efectos benéficos para la salud. La propiedad principal que se atribuye a la especie es la capacidad de reducir el colesterol debido a la presencia de lovastatina (Márquez, Juárez y Trigos, 2014).

El sistema de hifas puede ser monomítico o dimítico, sin hifas de unión, este personaje podría confundirse y fusionar los límites con otros géneros relacionados, tales como *Lentinus*. Existe una clara delimitación en *Pleurotus* entre especies con un sistema de hifas omíticas, generativo de paredes delgadas o gruesas hifas, como *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. albidus*, *P. cystidiosus* y *dimiticos*, como *P. djamor* y *P. rickii*. Todas las especies de *Pleurotus* tienen paredes delgadas, lisas, esporas de cilíndricas a subcilíndricas. Pueden ser pequeños (8 μm de largo) como *P. auriovillosus*, medianos (8-12 μm) como *P. albidus* y grande (13 μm de largo) como *P. cystidiosus*. Uno de los caracteres distintivos del género es una trama himenoforal irregular combinada con un pozo desarrollado subhymenium que, siempre tiene más de 7 μm de espesor *Pleurotus* no exhibe reacciones químicas. (Lechner et al., 2004).

El género *Pleurotus*, debido a su gran producción de lacasas de baja especificidad y otras enzimas y a su eficiencia en la degradación de compuestos xenobióticos, ha sido estudiado ampliamente para la biorremediación de diferentes efluentes. En lo referentes a la producción de compuestos bioactivos se han realizado diversos trabajos donde se ha

estudiado la producción de exopolisacáridos y xilooligosacáridos en *P. citrinopileatus* y *P. tuber-regium* entre otros respectivamente. Asimismo, se ha reportado el efecto de la soya en la producción de pleuromutilina en *P. mutilis*, la formación y desarrollo de los pellets durante la fermentación, así como el estudio de la temperatura en este proceso y su influencia en la apoptosis de las células, y la propiedad antiproliferativa y antiadhesivas de los polisacáridos extraídos del micelio y cuerpos fructíferos de *P. pulmonarius* y su aplicación en el tratamiento de la caries (Suárez y Nieto, 2013).

P. 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. Contexto blanco, algo correosa; no cambia de color al exponerse al aire. Hábitat: crece en grandes conjuntos o a veces solitario, sobre troncos, tocones y árboles muertos en los bosques caducifolios, acahuales, cafetales y jardines de julio a septiembre (González, Oliva, Ramírez, Rodríguez, Sánchez y Paz, 2010).

C. Cultivo de *Pleurotus*

El cultivo empírico de los hongos comestibles del género *Pleurotus* tuvo sus inicios en Alemania, alrededor de 1917, empleando micelio silvestre para la inoculación de troncos. Sin embargo, el primer cultivo a gran escala con troncos como sustrato solo fue posible hasta 1969 en Hungría. A partir de entonces el cultivo de varias especies de *Pleurotus* a pequeña y gran escala se ha desarrollado rápidamente en diversas partes del mundo, utilizando subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales disponibles regionalmente. Actualmente, aunque el champiñón (*A. bisporus*) ocupe el primer lugar, tanto las setas *Pleurotus* spp como el shiitake u hongo japonés *L. edodes* compiten por el segundo y tercer lugar en la producción mundial del comercio de hongos comestibles (Mora y Martínez, 2007).

El cultivo de diversas especies de hongos del género *Pleurotus* ha adquirido una gran importancia en Francia, Italia y España. El más conocido es el *Pleurotus ostreatus* del

cual se trata de un hongo que, en ambiente natural crece sobre árboles, tocones, arbustos y otras plantas leñosas, degradando la madera. Por otro lado existen otras especies con interés comercial como: *P. eryngii*, *P. comucopioides*, *L. edodes* (“Shiitake”, en Japón) y otros hongos pertenecientes a los géneros *Pholiota*, *Coprinus*, *Lepiota*, *Volvariella*, entre otros (Barbado, 2003).

Con base en el volumen de producción, el segundo hongo comestible cultivado de importancia en Iberoamérica son las setas (nombre popular con el que se designa a las especies del género *Pleurotus* en México y algunos países de América Latina, a diferencia de España en donde se llama “seta” a cualquier hongo comestible). Su producción alcanza 7.5% de la producción regional de hongos comestibles; sin embargo, hay países que comparativamente producen más, como Guatemala (37.5% de su producción), Bolivia (20%) y México (11.5%). El país con la producción más alta de *Pleurotus* spp. en la región es España, que en el año 2002 produjo 10 mil toneladas. Dentro de la comunidad Europea, España es el segundo productor, después de Italia; mientras que en Latinoamérica, los más grandes productores son México y Brasil. (Andrade, 2012).

Mora y Martínez (2007) desarrollaron una investigación bibliográfica sobre el cultivo del género *Pleurotus* en México, desde 1984, donde fueron consideradas las publicaciones más relevantes en revistas científicas nacionales e internacionales, libros, capítulos de libro y artículos en memorias de eventos científicos y hacen mención de las diversas especies del género *Pleurotus* que son cultivadas en forma experimental en pequeña y mayor escala, estas son: *P. citrinopileatus*, *P. columbinus*, *P. djamor*, *P. djamor* var. *roseus*, *P. djamor* var. *salmonostramineus*, *P. eryngii*, *P. floridanus*, *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus*, *P. ostreatus* var. *florida*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *Pleurotus* sp.

D. Cultivo artesanal en comunidades campesinas de Guatemala

El cultivo de *Pleurotus* a nivel comunitario dio origen cerca del año 1990, cuando por medio de un proyecto financiado por Christian Children Foundation, se proporcionó

capacitación a personas de Santa María de Jesús, Sacatepéquez. Posteriormente, en el año 1991 se capacitó a un grupo de campesinos de Totonicapán, a través de un proyecto financiado por la Fundación Helvetas. En 1995, el padre César Mass enseñó a cultivar *Pleurotus* spp. a un grupo de campesinos de San José Ojetenam, San Marcos, y en 2002, se fundaron pequeños proyectos en Huehuetenango (San Sebastián Coatán, San Rafael La Independencia y Cooperativa Joya Hermosa, ubicada en Aguacatán), así como en San Marcos La Laguna, Sololá. Para el año 2007 se calculaba que existían más de 300 familias o personas involucradas en este cultivo, quienes venden el producto de la cosecha en mercados de la localidad o entre sus vecinos (De León, 2007).

Durante el período de 2000-2008, se registró un incremento del 26% en la producción comercial de hongos comestibles en el país, aunque esto estuvo acompañado por un descenso de los niveles de producción de *Pleurotus* (52.7%) y *L. edodes* (Berk.) Pegler (98.4%), así como en el número de empleados asociados al sector, lo cual fue producto del cierre de la empresa “Myconos” a finales del 2002, la cual dejó de cultivar *P. eryngii* (DC.) Gillet y *L. edodes*. Esta empresa terminó sus operaciones porque no pudo competir con los bajos costos de producción de China, ya que su objetivo principal era exportar hongos comestibles de Guatemala a Estados Unidos (De León, 2010)

En 2005, por medio del financiamiento otorgado por la Dirección General de Investigación –DIGI-, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se entrenaron 245 personas en 16 actividades de capacitación, se establecieron 205 módulos artesanales en el occidente del país y se efectuaron 52 visitas de supervisión para brindar asistencia técnica especializada de manera regular a los cultivadores. Se cultivan varias especies de *Pleurotus* (*P. djamor*, *P. ostreatus*. y *P. levis* a nivel artesanal). Como consecuencia de ello, bajo condiciones de laboratorio, se elaboraron 6,005 libras de inóculo para la capacitación y continuidad del cultivo artesanal de hongos comestibles. El sustrato más utilizado para el cultivo de hongos comestibles en las comunidades fue el olote de maíz, aunque se utilizaron otros como el rastrojo de maíz y paja de trigo. Se produjeron aproximadamente en los cultivos artesanales 1,454.54 Kg de *Pleurotus* en alrededor de 10 meses (Bran, Morales, Cáceres, Flores, Álvarez, Mazariegos, y Quan, 2005).

La forma común de comercialización de *Pleurotus* spp, las cuales son cepas silvestres recolectadas en los distintos bosques, es en base a la “Medida”, la cual consiste en una cantidad de hongos dentro de un trasto plástico o bien en un canasto, esta “Medida” posee un precio que oscila entre los USD\$ 0.67 – USD \$0.93 para la especie de *P. albidus* en los municipios de Comalapa y Tecpán Guatemala, del departamento de Chimaltenango (Morales, Brany Caceres, 2010).

La tecnología aplicada al cultivo de hongos comestibles permite obtener grandes producciones en relativamente poco espacio, tiene una amplia aceptación a nivel urbano y rural por sus propiedades alimenticias, ya que el hongo seta representa un alimento con 350 calorías comparado con la carne roja que solo contiene 150 calorías o el pescado que contiene 101 calorías (Romero, Huerta, Damián, Macías, Tapia, Parraguirre y Juárez, 2010).

E. Inmunidad

El significado del término *immune* se asocia históricamente a un mecanismo de protección. Deriva de la palabra latina: *immunis* que significa: libre, exento de ciertos oficios, obligaciones, impuestos y castigos. El término se extendió para aplicarlo a personas que, después de haber padecido una enfermedad infecciosa, como la peste o la viruela, quedan exentos de ataques ulteriores (Vega, 2008).

La evidencia de que productos derivados de las células son partícipes en la inmunidad pueden mediar respuestas neuroendocrinas, originó la propuesta de que el sistema inmune actúa como un órgano receptor periférico que transmite información al cerebro relacionada con respuestas a estímulos antigénicos externos e internos. Actualmente se sabe que el sistema inmune no existe en un órgano definido. Es un conjunto de tejidos, células y moléculas que interaccionan y forman un frente común para integrar una respuesta: La respuesta inmune (Vega, 2008).

El sistema inmune o la inmunidad que posee toda persona, tiene un papel

fundamental en la defensa contra las infecciones, y es, al mismo tiempo, un sistema que tiende a mantener la homeostasis macromolecular del individuo. Puede ser subdividido en dos grandes subsistemas. El sistema inmune innato (inmunidad innata), que existe en todos los seres multicelulares, y que sirve en la defensa anti-infecciosa contra microorganismos del medio ambiente. El sistema inmune adaptativo o adquirida aparece más tardíamente. Es un sistema más complejo que puede reconocer no solo a los microorganismos, sino que a cualquier otra partícula que le resulte extraña, y aprende de esta experiencia, guardando memoria de lo que ha reconocido (Abumohor, 2005)

F. Basidiomicetos e Inmunidad

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 (Parslow, Sities e Imboden, 2002).

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 (Parslow et al., 2002).

Los compuestos como proteínas, péptidos, lipopolisacáridos, glucoproteínas y derivados de lípidos han sido clasificados como moléculas con potentes efectos sobre el sistema inmunitario. Recientemente, ciertos polisacáridos poliméricos naturales han sido identificados como potentes agentes inmunomoduladores. La inmunidad innata está regulada por citoquinas y por la activación de respuestas inflamatorias. Los polisacáridos bioactivos derivados de los basidiomicetos desempeñan un papel importante en la inmunomodulación. La capacidad de estas sustancias de unirse a proteínas para modular la

respuesta de las células del sistema inmunitario se debe a la diversidad estructural y variabilidad de estas macromoléculas (Ganeshpurkar, Rai & Jain, 2010).

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 (González et al., 2010).

En los macromicetos por ejemplo, *L. edodes* produce lentinano el cual posee importantes efectos farmacológicos. El lentinano activa la respuesta inmune del hospedero dado que estimula la maduración, diferenciación y proliferación de las células involucradas en los mecanismos de defensa. De esta manera, incrementa la resistencia a varios tipos de cáncer y puede restaurar la función inmunitaria. Además, puede activar las células *natural killer* involucradas en la supresión de tumores (Ganeshpurkar et al., 2010).

G. lucidum se conoce como "las setas de la inmortalidad" en China y otros países asiáticos. De estas setas se han aislado sustancias con una importante acción inmunomoduladora, tanto a nivel de los macrófagos como de las células B y del sistema fagocítico mononuclear también induce la liberación del Factor de necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 6 (IL-6). Así mismo, en 2004 Chen et al., demostraron que diferentes fracciones de este hongo activan la expresión de IL-1, IL-12, Interferón gamma (IFN- γ), Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). 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 doxorubicina (Ganeshpurkar et al., 2010).

Por su parte, la actividad antitumoral de *Schizophillum commune* deriva del aumento en la producción de células T, macrófagos y de la estimulación de las proteínas de fase aguda y de los factores estimulantes de colonias, lo cual genera la proliferación de macrófagos y linfocitos y la activación del sistema del complemento (Ganeshpurkar et al., 2010).

Otro de los efectos que produce este polisacárido es la activación de co-estimuladores como la proteína B7-1 y el Cumulo de diferenciación 40 (CD40) sin embargo es incapaz de inducir la expresión del Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II. Fue demostrado que SHE es un activador de macrófagos y además aumenta la actividad fagocítica opsonizando los eritrocitos (Rodríguez, Ramírez, González, Oliva, y Sánchez, 2009).

De los géneros investigados en estudios de Valencia, Garín, Téllez & Durán, (2008), destacan las actividades antitumorales y efectos inmunomodulatorios del género *Ganoderma*. Con respecto al género *Pleurotus*, se ha informado del efecto hipoglucémico de extractos acuosos de *P. pulmonarius*, mientras que *P. ostreatus* reduce la incidencia del tamaño de placas arterioscleróticas en conejos.

En Guatemala se espera que las propiedades nutracéuticas y medicinales en los hongos nativos puedan ser demostradas, de manera que puedan llegar a ser una opción real de consumo en las distintas poblaciones. Actualmente, distintas investigaciones han estandarizado varios procedimientos que, a través de ensayos *in vitro*, ponen a prueba los distintos efectos ya sean estimulantes o inhibidores sobre la proliferación de linfocitos como también sobre el sistema del complemento, para lo cual evalúan los extractos de los hongos comestibles (*C. lateritius*, *A. polymyces*, *L. amethystina*, *L. deliciosus* y *P. ostreatus*) basándose en su contenidos químico (Sommerkamp, Paz & Guzmán, 2016).

G. Antibiótico (Antimicrobiano)

Un antibiótico se define como aquella sustancia producida natural o sintéticamente, para inhibir la supervivencia de microorganismos. Dentro de los grandes grupos de antibióticos se destaca el grupo de los betalactámicos, quienes actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de pared celular bacteriana, además esta constituye la familia más numerosa de antimicrobianos y es la más utilizada (Marin y Gudiol, 2003)

H. Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Se define CIM como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano o algún otro microorganismo previamente estandarizado (concentración conocida) (Taroco, Seija y Vignoli, 2006)

Paredes y Roca (2004) define CIM como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

I. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se define como CBM la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada (Taroco et al., 2006). Paredes y Roca (2004) define CMB como la menor concentración capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación. Los valores obtenidos son *in vitro* y son variables que dependen del antibiótico y del microorganismo a tratar (Torres, 2002).

J. *Pleurotus* spp como antimicrobiano e inmunomodulador

Los hongos comestibles tienen una gran tradición de ser utilizados como agentes terapéuticos en el sureste asiático, mientras tanto en el hemisferio occidental se le ha dado utilización farmacológica y se ha incrementado significativamente a partir de las últimas décadas. En Estados Unidos, el valor comercial de los macromicetos medicinales y sus derivados fue de 1.2 billones de dólares en 1991 y se estimó un aumento a 6 billones para el año 1999. El 80 y 85% de todos los productos medicinales derivados de los hongos provienen de los cuerpos fructíferos, los cuales son producidos comercialmente o colectados de manera silvestre. Aun así, el número de especies de macromicetos investigados es relativamente bajo para la producción de fármacos, lo anterior permite asumir que los hongos comestibles representan un gran potencial para la producción de biofármacos (Valencia, Garín, Téllez y Durán, 2008).

La actividad antimicrobiana de *Pleurotus* se debe a los compuestos de tipo acetileno que actúan sobre bacterias Gram positivo y Gram negativo, además se le atribuyen de igual forma esta actividad a extractos orgánicos como terpenoides y compuestos fenólicos (Valencia et al., 2008).

Dada la importancia que ha tenido en Latinoamérica el cultivo de *Pleurotus* y específicamente el complejo *P. djamor*, se realizó un estudio en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, donde se observó la actividad antimicrobiana de extractos hexánicos de cepas de *P. djamor* variedad blanca (IE200 e IE2001) y variedad rosa (ECS127R y RP). Las cepas bacterianas Gram positivo usadas en el bioensayo fueron: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 12398) y *S. aureus* de un aislamiento clínico, mientras que las cepas Gram negativo correspondieron a *Enterobacter agglomerans* (ATCC 27155), *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella rhinoscleromatis* y *K. pneumoniae* (ATCC 13884). La variedad blanca desarrollo halos de inhibición con diámetros de 12 ± 0.5 a 25.6 ± 1.2 mm y la variedad rosa de 8.3 ± 0.3 a 22.6 ± 1.4 mm., tanto en bacterias Gram positivo como Gram negativo. La cepa blanca IE200 presentó los mayores halos de inhibición contra todas las cepas bacterianas trabajadas, incluso con la

especie *K. pneumoniae* duplicó la inhibición obtenida por la cepa IE2001, por lo que independientemente de que ambas cepas sean de la misma especie, el efecto antibacteriano fue diferente en cada una de ellas. Para ello sería necesario determinar la concentración mínima inhibitoria para tener la certeza de que existe un mayor efecto tóxico de los componentes que se encuentran presentes en los extractos de ambas cepas, así como, la elucidación de los compuestos químicos presentes en ambos extractos (Valencia et al., 2008).

También se obtuvieron diferencias significativas en los halos de inhibición provocados por los extractos hexánicos de los cuerpos fructíferos de las cepas rosas ECS127R y RP, no obstante, únicamente presentaron halos de inhibición contra las bacterias *E. agglomerans*, *S. aureus* y *S. dysenteriae*. Los diámetros de los halos de inhibición de las cepas rosas fueron menores a los obtenidos con las cepas blancas. De nuevo, se presentó una mayor inhibición de crecimiento bacteriano en *E. agglomerans* (Valencia et al., 2008).

En estudio previo realizado con extractos etéreos y acetónicos de *P. ostreatus* se reportaron halos de inhibición de 7.1–7.8 mm y 7.0–7.5 mm para las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus*, respectivamente y entre 7.0–7.1 mm para *K. pneumoniae*, mientras que para los extractos hexánicos utilizados en el estudio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, se obtuvieron valores de 10.3–14.0 mm y 7.0–14.0 mm, para *B. subtilis* y *S. aureus*, respectivamente, destacándose una mayor inhibición con las cepas blancas; mientras que para *K.pneumoniae* los halos de inhibición variaron de 12.0 a 25.6 mm. Estos resultados colocan a las cepas IE200, IE201 como fuentes potenciales de compuestos bioactivos. En este estudio realizado en México, se utilizó cloranfenicol como control y como era de esperarse los halos de inhibición fueron mayores a los halos de inhibición que los extractos hexánicos de los hongos, considerando que los compuestos activos puros tienen mayor actividad antibacteriana. Es probable que la presencia de sesquiterpenlactonas en los extractos hexánicos de los cuerpos fructíferos de las cepas de *Pleurotus* contribuya en la actividad antibacteriana (Valencia et al., 2008).

Se ha comprobado actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos de los extractos de los micelios y de los cuerpos de diversas setas. Para sobrevivir en su entorno natural, las setas necesitan contar con componentes antibacterianos y antifúngicos. Diferentes agentes antimicrobianos pueden aislarse a partir de varias especies de setas y pueden resultar beneficiosos para la salud del ser humano (Ganeshpurkar et al., 2010).

El ácido aplanoxídico aislado de *G. annulare* muestra actividad antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*. Los componentes esteroides de *G. applanatum* tienen actividad contra algunos microorganismos Gram positivo y Gram negativo. La especie *L. edodes* contiene ácido oxálico, responsable del efecto antimicrobiano contra *S. aureus* y otras bacterias (Ganeshpurkar et al., 2010).

Por otra parte, *A. bisporus* ha demostrado actividad contra bacterias Gram positivo y contra un número inferior de bacterias Gram negativo. Ciertas proteínas antifúngicas, lectinas, ribonucleasas y lacasas que se originan en las setas tienen la capacidad de inhibir a la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH1) (Ganeshpurkar et al., 2010).

En Guatemala Lorenzana et al., (2009) determinaron la actividad linfoproliferativa del extracto acuoso y etanólico de *Grifola frondosa* en donde a una concentración de 1000µg/ml ambos extractos presentaban dicha actividad *in vitro* además el extracto etanólico presentó una actividad a una concentración de 500µg/ml, con respecto a la actividad sobre el sistema de complemento, el porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en la vía clásica del complemento no alcanzo el 50% para ninguno de los dos extractos y, con referente a la vía alterna los resultados fueron parecidos, aunque en el porcentaje de hemólisis de suero activo en presencia del hongo supero el 50%.

Por otro lado González et al., (2010) determinaron la actividad inmunomoduladora de cinco basidiomicetos comestibles, en donde se presentó actividad inhibitoria por parte de estos y solamente se tomaron como resultados positivos los que mostraron porcentajes de

inhibición mayores del 50%. 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 mostro actividad inhibitoria.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los basidiomicetos son un grupo de importancia dentro del Reino Fungi, pues tienen participación en la naturaleza por la versatilidad de las especies que lo constituyen; unas forman ectomicorrizas, otras son causantes de enfermedades como las royas, además existen otros que son capaces de degradar eficientemente compuestos aromáticos y heterogéneo que les permite aplicaciones como biorremediadores de suelos y aguas contaminadas en las industrias textil y papelera, por otro lado poseen importancia a nivel agrícola, pues presentan actividad antifúngica, fitotóxica y nematocida útiles para el manejo de plagas.

Se encuentran también las especies comestibles que se cultivan con fines nutritivos en donde algunas poseen importancia en la medicina pues presentan metabolitos con actividad biológica contra una amplia gama de patologías clínicas.

Considerando el problema que representan las enfermedades de carácter autoinmune e infeccioso, es necesario considerar a los hongos comestibles como posible fuente de tratamiento y/o prevención de enfermedades de ese tipo. Por ello se justifica la realización de un estudio en la búsqueda de efectos inmunomoduladores que puedan estar contenidos en los metabolitos fúngicos.

En Guatemala se han estudiado ampliamente los hongos macromicetos con un enfoque taxonómico, aunque son muy escasos los estudios orientados a la búsqueda de principios activos medicinales. Los hongos del género *Pleurotus* spp son cultivados y de fácil obtención en el territorio nacional por sus características alimenticias, por lo que se considera importante buscar en ellos posibles actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras.

Por su importancia y el alto consumo que presenta el género *Pleurotus* spp., se evaluó el extracto obtenido de este hongo, si poseen alguna actividad inmunomoduladora y/o antimicrobiana mediante distintos bioensayos

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Determinar los efectos inmunomoduladores y antimicrobianos de basidiomicetos comestibles cultivados del género *Pleurotus* spp.

B. ESPECÍFICOS

1. Determinar la actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Pleurotus* spp en cultivos bacterianos, mediante ensayos *in vitro*.
2. Determinar la actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Pleurotus* spp en cultivos de hongos dermatofitos, mediante ensayos *in vitro*.
3. Determinar la actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Pleurotus* spp. en cultivos de hongos levaduriformes, mediante ensayos *in vitro*.
4. Determinar la actividad y concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico *Pleurotus* spp en los linfocitos humanos mediante ensayos *in vitro*.

VI. HIPÓTESIS

El extracto obtenido de *Pleurotus* spp posee alguna actividad inmunomoduladora y/o antimicrobiana.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO Y MUESTRA

El universo lo constituye los hongos basidiomicetes perteneciente al género *Pleurotus* que se cultivan en Guatemala. La muestra estuvo conformada por el extracto etanólico de *Pleurotus* spp.

B. RECURSOS

1. Humanos

- Estudiantes
Br. Ángel Estuardo Escobar García
Br. Adolfo Noé Simón Dionicio
- Asesor:
Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez
Madre Ivonne Sommerkamp

2. Institucionales

Unidad de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

3. Materiales

a. Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica.
- Balanza semi-analítica
- Cabina bacteriológica con flujo laminar
- Centrífuga
- Congelador a -20°C

- Desecadora.
- Espectrofotómetro de placas o lector de ELISA
- Incubadora 27°C
- Incubadora 37°C
- Refrigeradora
- Rotavapor (balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta)
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua.

b. De laboratorio y cristalería

- Agitador
- Asa de nicromo en argolla
- Balón de 1000 mL
- Bisturí.
- Cajas de Petri cuadriplaca
- Cajas de Petri simples
- Cámara de Neubauer
- Campanillas de Durham
- Erlenmeyers 50ml y 100ml
- Lector de humedad.
- Mechero
- Percolador de vidrio o acero inoxidable
- Pipetas Automáticas de 50 µL, 100 µL, 200 µL
- Pipetas Pasteur
- Placas estériles de 96 pozos, de fondo plano, con tapadera
- Puntas amarillas de 200µL
- Puntas azules de 1000 µL
- Puntas azules de 1000 µL
- Tubos con tapón de rosca de 15ml
- Tubos con tapón de rosca.

- Tubos de 50mL
- Tubos de Ensayo
- Tubos Vacutainer con EDTA DE 5 mL
- Viales

c. Medios de cultivo

- Agar Mueller-Hinton
- Agar Sabouraud
- Agar Tripticasa soya
- Agar granulado para microbiología
- Caldo Tripticasa Soya

d. Reactivos

- Ácido acético glacial
- Agua desmineralizada
- Alcohol al 50%
- Buffer salino de fosfatos (PBS)
- Cristal Violeta
- Dextrosa
- Dimetil formamida
- Disolvente (etanol)
- EDTA (sal disódica o tripotásica del ácido etilendiaminotetraacético)
- Etanol al 50%
- Etanol al 70%
- Fosfato diácido de potasio.
- Gentamicina
- Histopaque
- Lectinas de Concanavalin A
- Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
- Metosulfato de fenacina (PMS)

- Peptona
- RPMI-FBS (medio de cultivo más 10% de suero fetal bovino)
- Sangre o suspensión de linfocitos
- Solución de Türk
- Solución salina isotónica
- Sulfato de Sodio

e. Otros

- Algodón
- Bata
- Bolsas de polipapel.
- Lata de almacenamiento.
- Papel encerado.
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Regla graduada

f. Microorganismos:

- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 14053
- *Candida glabrata**
- *Candida parapsilosis* ATCC 22019
- *Candida tropicalis* ATCC 1369
- *Cryptococcus neoformans**
- *Cryptococcus neoformans var. gatti**
- *Epidermophyton floccosum**
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli**

- *Issatchekia orientalis* ATCC 6258
- *Klebsiella pneumoniae**
- *Microsporum gypseum**
- *Microsporum nanum**
- *Microsporum canis**
- *Pseudomonas aeruginosa**
- *Salmonella typhimurium**
- *Staphylococcus aureus* *
- *Trichophyton mentagrophytes**
- *Trichophyton rubrum**
- *Trichophyton tonsurans**
- *Aislada e identificada de muestra clínica

C. PROCEDIMIENTOS

1. Desecación de hongos.

Se realizó de acuerdo con los procedimientos de operación estándar (POE) que han sido establecidos en la unidad de bioensayos del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

a. Desecación de hongos comestibles

- Se pesaron los hongos frescos en una balanza analítica.
- Se cortaron los hongos transversalmente con un bisturí.
- Se colocaron los hongos ya cortados dentro de una desecadora, cuidando que no estén unos sobre otros.
- Se dejó secando por 72 horas a 65°C, revisando que no se quemaran.
- Se retiraron los hongos de la desecadora.
- Se determinó el porcentaje de humedad de los hongos secos con un lector de humedad.

- Se pesó los hongos secos en una balanza analítica.
- Se determinó el porcentaje de rendimiento:

$$\% \text{ de rendimiento} = (\text{peso hongo seco} / \text{peso de hongo fresco}) \times 100$$
- Se guardaron los hongos secos en una bolsa de polipapel.

b. Preservación de los hongos secos.

- Se colocaron las bolsas conteniendo el hongo seco en un congelador a -20°C .
- Se congelaron por dos semanas.
- Se retiraron de la bolsa del congelador.
- Se secaron nuevamente los hongos en una desecadora por 72 horas a 65°C .
- Se determinó el porcentaje de humedad de los hongos secos con un lector de humedad.
- Se guardaron los hongos secos en una bolsa de polipapel.

c. Conservación de los hongos secos.

- Se guardaron en bolsa de polipapel conteniendo los hongos en una lata. La lata cerrada esta estuvo en un lugar fresco, sin luz del sol directa.

2. Extracción continúa por percolación

Se realizó de acuerdo con los procedimientos de operación estándar (POE) que han sido establecidos en la unidad de bioensayos del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

- En un percolador previamente limpio y seco, se colocó una pequeña porción de algodón en la parte inferior, además de papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.

- Se pesó la cantidad de muestra a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador.
- Se humedeció la muestra con el disolvente adecuado para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó disolvente hasta cubrir la muestra (aproximadamente una pulgada sobre el nivel de la muestra).
- Se dejó reposar el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, esto dependía de la cantidad de muestra (24-48 horas).
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Se recogió el líquido en un Erlenmeyer y se fue agregando suficiente disolvente extra, esto según se requería, hasta que se logró obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- El material sólido que quedó, se presionó fuertemente y el líquido obtenido se añadió al percolado obtenido anteriormente.
- Para preparar el extracto, el líquido obtenido (menstruo) se concentró en un rotavapor, se repitió la operación hasta que se agotó el disolvente recuperado.

3. Concentración por rotavapor

Se realizó de acuerdo con los procedimientos de operación estándar (POE) que han sido establecidos en la unidad de bioensayos del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Se verifico que estuvieran conectadas todas las conexiones eléctricas
- Se colocó el colector y se fijó con la llave respectiva
- Se agregó agua al baño de calentamiento
- Se encendió el baño y este se mantuvo a temperatura entre 50-60°C. entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en

todo caso el balón de evaporación no debería tener una temperatura mayor de 40 °C.

- Se revisó que la llave de alimentación del refrigerante estuviera cerrada.
- Se llenó el balón con el percolado hasta la mitad.
- Se colocó en el balón la muestra, y se sujetó al vástago con la llave correspondiente.
- Se encendió el botón que permite girar el balón que contenía la muestra (50 a 80 revoluciones).
- Se conectó a un sistema de enfriamiento (bomba de agua) y se agregó hielo a la hielera. Dejar que enfríe unos cinco minutos.
- Se mantuvo siempre el refrigerante frío cambiando regularmente los hielos.
- Se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- Cuando se inició la destilación, se apagaba la bomba de vacío.
- Se encendió la bomba de vacío cuantas veces fue necesario hasta agotar el disolvente del balón de evaporación o ya no se observó presencia de líquido.

4. Ensayo de linfoproliferación

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mosmann (1983)

a. Procedimiento: Fase I Preparación de soluciones y suspensiones

- Preparación de PBS
 - Se agregó un sobre de PBS en 1000 mL de agua destilada, usando un balón aforado. Homogeneizar.
 - Se verificó que el PBS tuviera un pH de 7.4 antes de esterilizar la solución.
 - Se esterilizó por autoclave la solución tampón de PBS.

- Preparación de RPMI-FBS: Cada placa de 96 pozos requiere 7 mL de RPMI-FBS, el cual se suplementó así:
 - Se descongeló y atemperó suero fetal bovino
 - 300 mg de L-glutamina + 1000 mL de RPMI-1640.
 - Por cada 90 mL de RPMI suplemento se agregó 10 mL de suero fetal bovino (FBS)
 - Se filtró en un filtro de 0.20 μ m

- Dilución de extractos: Para cada placa de 96 pozos se empleó alrededor de 1.5 mL de RPMI-FBS de la siguiente forma:
 - 300 mg de L- glutamina + 1000 mL de RPMI – 1640.
 - Por cada 90 mL de RPMI se agregó 10 mL de suero fetal bovino (FBS)
 - Se filtró el RPMI-FBS en un filtro de 0.20 μ m antes de diluir los extractos
 - Se pesó 1 mg extracto por cada 1 ml RPMI-FBS que se empleó (es decir, relación 1:1).
 - Se Mezclaron el extracto con el RPMI-FBS guardando siempre la relación 1 mg extracto/1 mL RPMI-FBS.
 - Se sellaron con parafilm totalmente, previniendo filtraciones, y luego se utilizó el sonicador por 45 minutos.
 - Se filtró el extracto diluido en un filtro de 0.20 μ m por duplicado.
 - Se selló con parafilm. Se Almacenó el restante en refrigeración y verificando periódicamente ausencia de contaminación.

- Preparación de solución de trabajo de Lectina (Mitógeno): Para cada placa de 96 pozos se requirió 5 mL de solución de trabajo de lectina.
 - Preparación de solución Stock de Lectina: 9 mg de lectina (Concanavalina A.) + 1 mL de RPMI sin FBS
 - Preparación de solución de trabajo de Lectina: se mezcló 100 μ L de Solución Stock de Lectina + 9 mL de RPMI-FBS

- Se filtró la solución de trabajo de Lectina en un filtro de 0.20 μm (esta solución tuvo una concentración final de 5 $\mu\text{g/mL}$).
- Preparación de suspensión de linfocitos. Separación de linfocitos:
 - Se extrajo 10 mL de sangre con EDTA a un individuo sano. 10 mL de sangre con EDTA fueron suficientes para llenar hasta 3 cajas de 96 pozos.
 - En un tubo cónico estéril de 50 mL se agregó Histopaque y enseguida se agregó suavemente sangre con EDTA en relación 1:1. Pueden ser 5 mL de Histopaque + 5 mL de sangre
 - Se evitó que la muestra de sangre y el Histopaque se mezclaran dentro del tubo cónico.
 - Se centrifugó 30' a 1800 rpm (4' en frío y 26'a temperatura ambiente)
 - Usando pipeta Pasteur estéril con bulbo, se extrajo la capa de mononucleares que quedó entre el plasma y el Histopaque
 - Se colocaron los mononucleares en un tubo nuevo estéril de 15 mL, con cuidado de no aspirar mucha cantidad de plasma.
 - Se obtuvieron 2 a 3 mL de mononucleares.
- Lavado de Linfocitos
 - Se agregaron a los mononucleares obtenidos, 3 mL de RPMI y se homogenizaron suavemente con pipeta estéril.
 - Con mucho cuidado, se mezclaron los linfocitos con el RPMI
 - Se centrifugó a 1400 rpm por 10' (2' en frío y 8' a temperatura ambiente)
 - Se decantó el sobrenadante
 - Asépticamente, se agregó 2 mL de RPMI, se mezclaron suavemente con una pipeta Pasteur estéril
 - Se agregó RPMI hasta 15 mL.
 - Se mezclaron con cuidado y se repitió lavado por 2 veces más. A la

última centrifugación, se decantó el sobrenadante, y se agregó 2 ml de RPMI-FBS estéril, y se mezcló suavemente

- Se realizó recuento de blancos haciendo dilución de 1:10
- Se calculó el número de linfocitos por mL así: $\text{LINFOCITOS /mL} = \frac{\text{\#células en 4 cuadros} \times \text{FD} \times 1 \times 10^4}{\text{mL}}$
- Se ajustó la concentración de linfocitos a 5×10^6 cel/mL. En cada cuadrante, lo ideal era contar 125 ± 5 para alcanzar la concentración de 5×10^6 cel/mL, o bien trabajar a doble o triple de esta concentración.

b. Procedimiento: Fase II Reto Linfoproliferativo

Llenado de Placa: se usaron placas de 96 pozos, estériles y de fondo plano, las cuales se llenaron así:

- A toda la placa se le agregó 50 μL de RPMI-FBS filtrado (estéril).
- POZO A2: se agregó 100 μL de Lectina.
- Se transfirió 50 μL de Lectina de las columnas A2 \rightarrow G2, se homogenizó en cada pozo antes de transferir
- Se descartó 50 μL del pozo G2
- Se repitió el mismo procedimiento de la Lectina en las columnas A5 \rightarrow G5, A8 \rightarrow G8, A11 \rightarrow G11.
- POZO A3: se agregó 100 μL del extracto etanólico del hongo utilizado.
- Se transfirieron 50 μL del extracto etanólico de las columnas A3 \rightarrow G3, se homogenizó en cada pozo antes de transferir
- Se descartaron 50 μL del pozo G3
- Se repitieron el mismo procedimiento de la Lectina en las columnas A6 \rightarrow G6, A9 \rightarrow G9, A12 \rightarrow G12
- Se agregaron 50 μL de suspensión de Linfocitos a toda la placa.
- Columnas A1 \rightarrow G1, A4 \rightarrow G4, A7 \rightarrow G7, A10 \rightarrow G10 50 μL de RPMI-FBS (estéril), las cuales fueron las columnas control.
- Se sellaron las placas con parafilm

- Se homogenizó la placa con golpes suaves
- Se incubaron las placas a 37° C en microaerofilia, por 4 días

c. Procedimiento: Recuento de Linfocitos

- Se limpió la campana y área de trabajo.
- Se verifico la placa, descartando contaminación, utilizando microscopio de luz invertida.
- Se realizaron los recuentos en columnas control, el cual no debe de existir proliferación de linfocitos. Se anotaron resultados.
- Se realizaron recuentos de columnas con Lectina, en la cual debía de existir proliferación de linfocitos. se anotaron resultados.
- Se realizaron recuentos de columnas con extracto utilizado. Se determinó si existió proliferación o inhibición. Se anotaron resultados.

5. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mitscher, Leu, Bathala, Wu & Beal, (1972).

a. Disolución del extracto

- En la balanza analítica se pesaron 30 mg de extracto a ensayar y se disolvieron en 3 mL de etanol al 50% (se hicieron cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo)
- Se agito en un vortex hasta que estuviese bien disuelto.
- Se filtró el extracto.

b. Filtración de extracto

- Se trabajó la filtración en la campana de flujo laminar (previamente limpia, ver verifico POE de limpieza de campana)
- Se aspiró el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL.

- Se desenroscó la aguja y se enroscó en la jeringa el filtro de 0.45 μm de diámetro.
- En un frasco estéril recibió el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

c. Preparación de Agar-Hongo basidiomiceto (*Pleurotus spp.*)

- Se prepararon tubos con 9.0 mL de agar Mueller-Hinton (dos tubos por cada extracto). Se esterilizó a 121°C durante 15 min, se dejaron enfriar a 50°C.
- En una caja de Petri simple se agregó 1.0 mL de solución del extracto filtrado (este debía tener una concentración de 10 mg/mL) y los 9 mL de agar Mueller-Hinton. Se tapó la caja y se homogenizó con movimientos circulares. La concentración final que se obtuvo es de 1 mg/mL.
- Se dejó solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento de usar.

d. Preparación del inóculo

- Se purifico el microorganismo a ensayar inoculándolo en una caja de Petri con agar Trypticosa soya, se incubo a 36°C por 24 horas.
- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Trypticosa soya, se incubó a 36°C durante 24 horas.
- Se diluyó 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

e. Demostración de la actividad antibacteriana

- Se inoculó en las cajas con agar-hongo una asada de cada de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Se realizaron cuatro repeticiones por microorganismo. Se dejó reposar durante 5-10 minutos y se incubaron a 36°C durante 24 horas.

- Se utilizaron como control negativo 9 mL de agar Müller-Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%

f. Interpretación de resultados

- Actividad negativa: existió crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: no hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminante: crecimiento de microorganismos fuera del inóculo.

6. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Brancato & Golding, (1953), modificado por MacRae, Hudson & Towers, (1988).

a. Preparación del medio de cultivo

- Se prepararon tubos con 13.5ml de agar Sabouraud.
- Se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C, se enfriaron a 50°C y se agregó 1.5mL de extracto a probar (Dilución 1:10), se agitó. La concentración final que se tiene es de 1mg/mL.
- Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para verificar esterilidad.
- Se guardaron en refrigeración hasta el momento de su uso.

b. Preparación del inóculo.

- Se preparó medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

- Dextrosa 0.6g
- NaSO₄ 0.3g
- KH₂PO₄ 0.3g
- Peptona 0.3g
- Agar-Agar 6.0g

- Estos ingredientes se agregaron a 300 mL de agua, y se disolvieron, luego se vertieron 6mL en tubos con tapón de rosca, se esterilizaron en autoclave y se dejaron solidificar con el mayor declive posible. Se incubaron por 48 horas a 25°C para descartar contaminación.
- Se sembraron en este medio los hongos a ensayar y se incubaron a 27°C durante 21 días, hasta que se obtuvo un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
- Se agregaron a cada tubo 2mL de agua destilada estéril y desprendió el hongo con la ayuda de una varilla.
- Se trasvasó el material obtenido en viales con tapa de rosca. Se agitó 1 minuto en vortex y se realizó un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- Se llevó la suspensión a 100 esporas/ μL = 1×10^5 esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y se almacenaron en viales estériles en refrigeración.

c. Inoculación de hongos filamentosos en placa

- Se abrieron cuatro agujeros en las cajas de agar-extracto, con campanillas de Durham de 5mm de diámetro. En forma equidistantes.
- Se tomaron 30 μL de la suspensión de esporas y se depositaron en los agujeros. Se incubó a 27°C por 14 días.
- Se hizo un total de 4 repeticiones en la misma forma, se usó una caja con agar Sabouraud como control negativo.
- Las cajas control contribuyen a agar Sabouraud (13.5mL) con 1.5 ml de Alcohol al 70%. Es decir que llevan el mismo procedimiento que se emplea para realizar cajas de agar-extracto, solamente que en lugar de llevar la suspensión con el extracto, llevan etanol al 70%.

d. Lectura e interpretación de resultados

- Se realizó la medición del diámetro de la colonia del hongo en milímetros.
- Se calcularon los porcentajes de inhibición, comparándolo con el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.
- Se tomaron como positivos los extractos que redujeron el diámetro de la colonia en un 75%

7. Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mitscher et al., (1972).

a. Preparación del medio de cultivo

- Se prepararon tubos con 9mL de agar Müller Hinton
- Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos, se enfriaron a 50°C y se agregó 1.0 mL de extracto (Dilución 1:10) agitar. La concentración final que se obtuvo fue de 1mg/mL.
- Se vertió en cajas de Petri estériles, se dejó solidificar e se incubo a 36°C por 24 horas para chequear esterilidad.
- Se guardaron en refrigeración hasta el momento de uso.

b. Preparación del inóculo.

- Se sembraron las cepas en una caja de agar Sabouraud y se incubó a 36°C por 48 horas.
- Se tomó un inóculo del cultivo fresco, se sembraron en 5mL de caldo Tripticasa Soya y se incubaron 24 a 48 hora. se tomó con una pipeta estéril 0.5 mL y se resuspendió en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10).

c. Inoculación de levaduras en placa

- Se inoculo con el asa la suspensión de levaduras en cada sección según plantilla realizada.

- Se incubaron a 36°C durante 48 horas.
- Para el control negativo, se sembraron por estrías las levaduras en una caja con agar Sabouraud.

d. Interpretación de los resultados

- Actividad negativa: Crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: No hay crecimiento homogéneo a lo largo de inóculo.
- Contaminación: Crecimiento de microorganismos fuera de la inoculación.

8. Concentración inhibitoria mínima (CIM) – antibacteriana y antilevaduras *in vitro*

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mitscher, et al., (1972).

a. Preparación de Agar-Hongo basidiomiceto (*Pleurotus* spp.)

- Se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 3.9, 4 mL de agar Mueller-Hinton
- Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos, se enfriaron a 50°C y se agregó la solución de extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadrilate de la siguiente manera:
 - 3.6mL de agar + 0.4mL de la solución de extracto=1.0mg/mL
 - 3.8mL de agar + 0.2mL de la solución de extracto=0.5mg/mL
 - 3.9mL de agar + 0.1mL de la solución de extracto=0.25mg/mL
- Un cuadrante con 4.0 de agar como control negativo.
- Se dejó solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Se guardaron en refrigeración hasta el momento de usar.

b. Preparación del inóculo

- Se purifico el microorganismo que presento una actividad positiva, inoculándolo en un tubo con 8 mL de agar Müller-Hinton inclinado, y se incubo a 36°C durante 48 horas.

- Se inoculo una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo Tripticasa soya, se incubo a 36°C durante 48 horas.
- Se diluyo 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1:100)

c. Demostración de la concentración inhibitoria mínima

- Se inoculo tres estrías en cada uno de se dejó reposar durante 5-10 minutos y se incubo a 36°C durante 24 horas.

d. Interpretación de resultados

- Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inculo.
- Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inculo.
- Contaminante: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

9. Concentración inhibitoria mínima (CIM) – antimicótico *in vitro*

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Brancato & Golding, (1953), modificado por MacRae et al., (1988).

a. Preparación de Agar-Hongo basidiomiceto (*Pleurotus spp.*)

- Se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 3.9, 4 mL de agar Mueller-Hinton
- Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a 50°C y se agregó la solución de extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadrilata de la siguiente manera:
 - 13.5 mL de agar + 1.5. mL de la solución de extracto = 1.0 mg/mL
 - 14.25 mL de agar + 0.75 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL
 - 14.625 mL de agar + 0.375 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL
- Se preparó una caja como control negativo.
- Se dejó solidificar e incubar a 27°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento de usar.

b. Inoculación de hongos filamentosos en placa.

- Se abrieron cuatro pozos en las cajas de agar-extracto, con campanillas de Durham de 5mm de diámetro. En forma equidistantes.
- Se tomaron 30µL de la suspensión de esporas y se depositaron en los agujeros. Incubar a 27°C por 14 días.
- Se hizo un total de 4 repeticiones en la misma forma, se usó una caja con agar Sabouraud como control negativo.
- Las cajas control contribuyen a agar Sabouraud (13.5mL) con 1.5 ml de Alcohol al 70%. Es decir que llevan el mismo procedimiento que se emplea para realizar cajas de agar-extracto, solamente que en lugar de llevar la suspensión con el extracto, llevan etanol al 70%.

c. Demostración de la concentración inhibitoria mínima

- Se midió el diámetro de la colonia del hongo en milímetros.
- Se calculó el porcentaje de inhibición, comparándolo con el diámetro contra el de las colonias en las en las distintas cajas.

10. Diseño Estadístico

a. Tipo de Estudio

Cuasi- experimental.

b. Variables

- Dependiente

Extracto etanólico del basidiomiceto comestible: *Pleurotus* spp.

- Independiente

Actividad inmunomoduladora y antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico del basidiomiceto estudiado.

c. Validación de los métodos

- Ensayo linfoproliferativo
 - Fase I: Determinación de controles

Controles positivos: Lectina Concaivalina A (ConA).

Control negativo: Blanco.

- 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 *Pleurotus* spp.

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.

d. Análisis de Datos

Los datos fueron analizados con estadística descriptiva, ANOVA para determinar la relación que pueda presentar el extracto etanólico con respecto a la Lectina utilizada como control, realizando tres repeticiones por cada una de las distintas concentraciones.

- 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 $H_0: p = q$ (no efecto p) = frecuencia de respuesta positiva y $H_a: p > q$ (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 ($H_0: p = q$ y $H_a: p > q$).

- Ensayo antimicrobiano

Los resultados se evaluaron de acuerdo al porcentaje de inhibición presentado por las colonias, con respecto al blanco, además de la evaluación del crecimiento uniforme de las misas, considerando como positivo a las colonias en las que se vea reducido un 75% del diámetro para las colonias de hongos miceliarios, mientras que para las colonias de levaduras y bacterias se evaluó únicamente el crecimiento uniforme.

VIII. RESULTADOS

A. Actividad antibacteriana y antilevadura de extracto etanólico de *Pleurotus* spp.

Se obtuvo un 4.4 % de rendimiento de 2.5 Kg de *Pleurotus* spp. a partir de ello se preparó el extracto etanólico el cual fue enfrentado a bacterias Gram positivo y Gram negativo, no se encontró actividad antibacteriana y antilevadura a concentraciones menores a 1 mg/mL. (Figura 1 y 2)

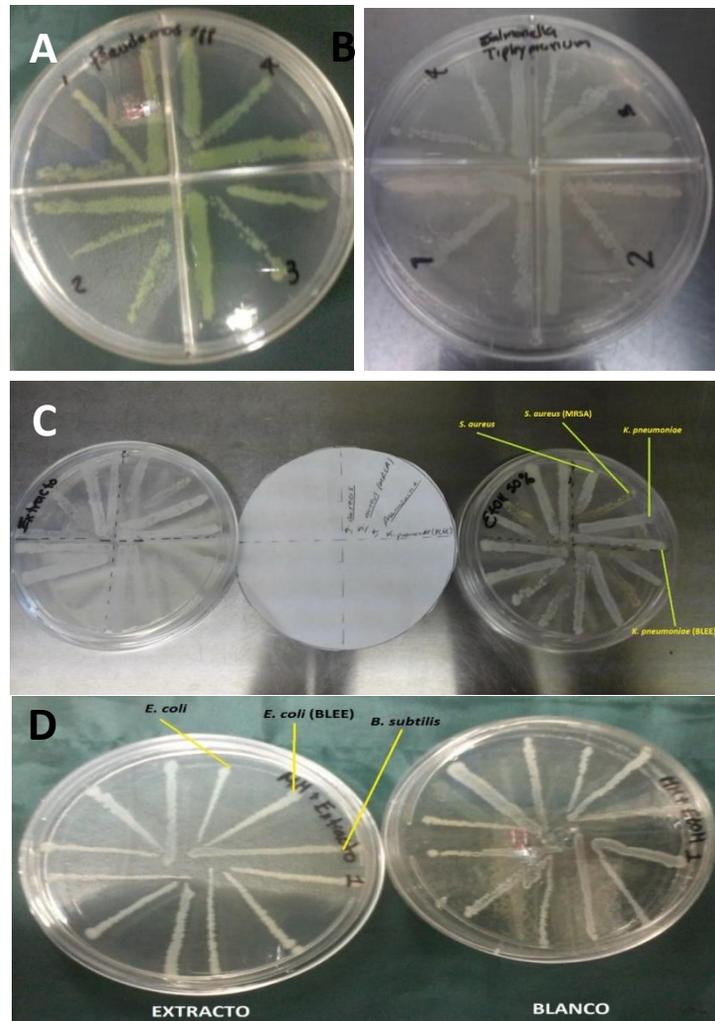


Figura 1. Inoculación de cepas para la evaluación de la actividad antibacteriana. A. *P. aeruginosa*. B. *S. typhimurium* C. *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* (BLEE).D. *E. coli*, *E. coli* (BLEE), *B. subtilis*.

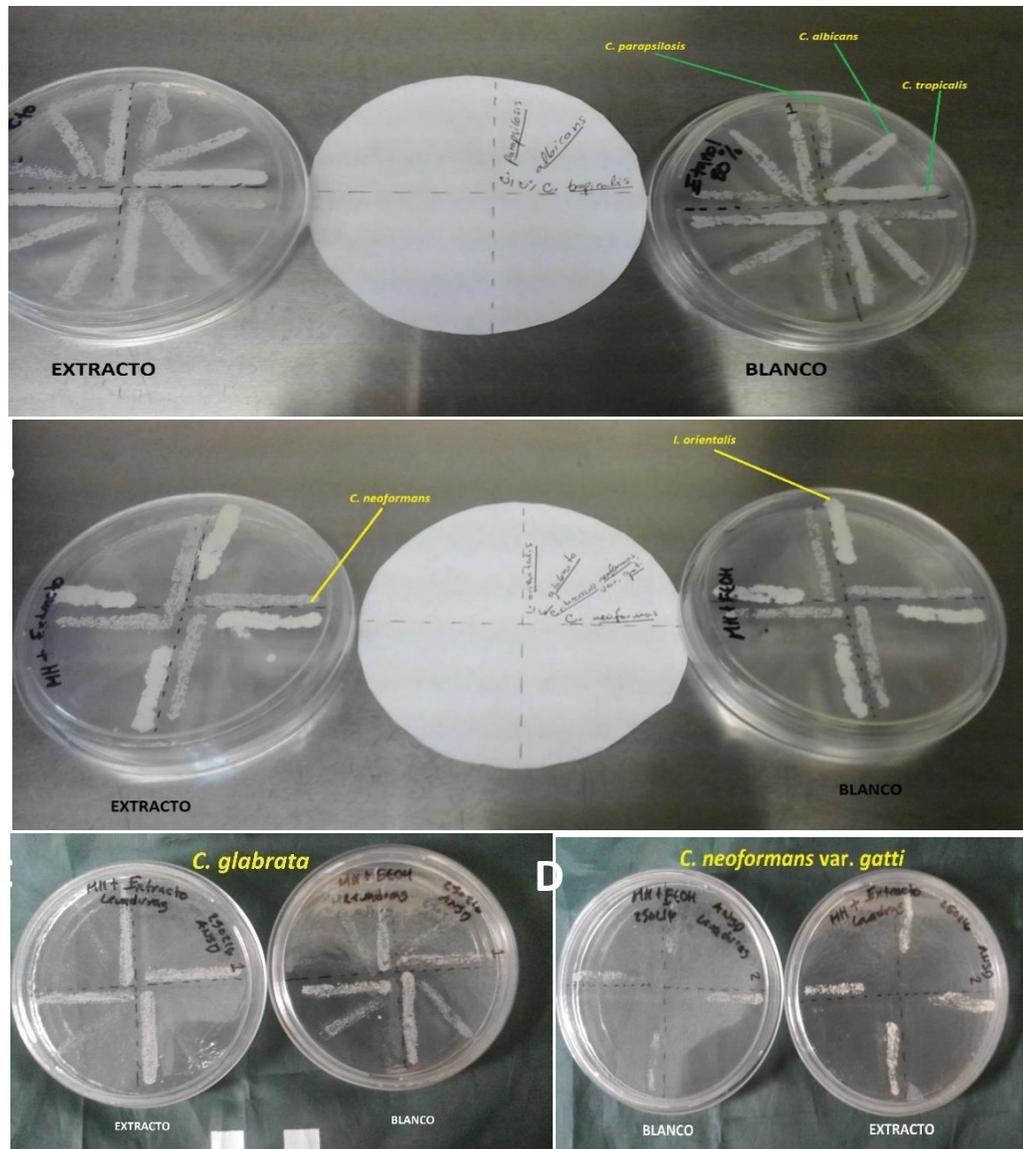


Figura 2. Inoculación de cepas para la evaluación de la actividad antilevadura. A. *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*. B. *C. neoformans* e *I. orientalis*. C. *C. glabrata*. D. Cepa de *C. neoformans* var. *gatti*.

B. Ensayo de la actividad anti-fúngica del extracto etanólico de *Pleurotus* spp.

Se obtuvo actividad del extracto a una concentración de 1 mg/mL para las cepas de *M. canis* y *M. nanum* (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de los ensayos de actividad anti-fúngica

Hongo patógeno	Actividad antifúngica de <i>Pleurotus</i> spp
<i>A. niger</i> ATCC 16404	-
<i>A. flavus</i>	-
<i>M. canis</i>	+
<i>M. gypseum</i>	-
<i>M. nanum</i>	+
<i>T. mentagrophytes</i>	-
<i>T. rubrum</i>	-
<i>T. tonsurans</i>	-
<i>E. floccosum</i>	-

(-) sin actividad 1 mg/mL

(+) Con actividad 1 mg/mL, (*Microsporium canis* con 84.42%, *Microsporium nanum* con 70.19%)

Fuente: Datos experimentales, obtenidos en el laboratorio de bioensayos No. 3, depto. De Citohistología, edificio T11, USAC

C. Ensayo del porcentaje de inhibición anti-fúngica del extracto etanólico de *Pleurotus* spp.

Se obtuvo un 84.42% de inhibición en el crecimiento de *M. canis* en comparación con el 70.19% de inhibición de *M. nanum* a una concentración de 1 mg/mL. (Tabla 2, figura 3).

Tabla 2. Porcentajes de inhibición antifúngica con distintas concentraciones del extracto

Concentración (mg/mL)	Media (%)	<i>M. nanum</i>		<i>M. canis</i>		
		DS (%)	Actividad*	Media (%)	DS (%)	Actividad*
1.0	70.19	3.51	I++	84.42	2.12	I++
0.5	26.09	1.24	I±	68.18	4.44	I++
0.25	11.80	2.48	Negativa	35.06	3.67	I±

M. nanum: F= 554.08 y p< 0.01

M. canis: F= 201.54 y p< 0.01

DS: Desviación estándar

Porcentaje de Inhibición de 0-20 % = Negativo

Porcentaje de Inhibición de 21-40 % = I±

Porcentaje de Inhibición de 41-60 % = I+

Porcentaje de Inhibición de 61 - 80 % = I++

Porcentaje de Inhibición mayor de 80%= I+++

Fuente: Datos experimentales, obtenidos en el laboratorio de bioensayos No. 3, depto. De Citohistología, edificio T11, USAC

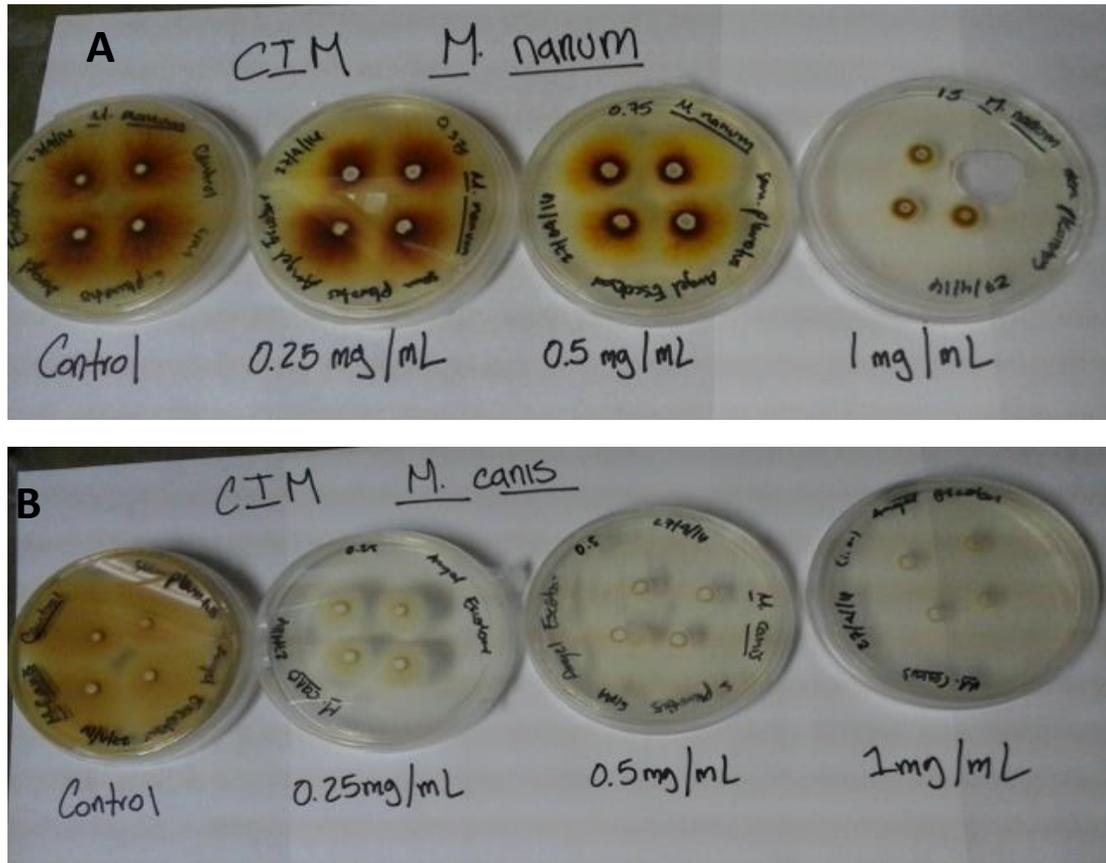


Figura 3. Determinación del CIM para los hongos filamentosos que presentaron inhibición en el diámetro del micelio. A. CIM para *M. nanum*. B. CIM para *M. canis*.

D. Ensayo de la determinación de actividad inmunomoduladora de extracto etanólico sobre células mononucleares (linfocitos) en comparación con Lectina (Concanavalina A)

Se obtuvo una actividad inhibitoria efectiva mínima de 31.25 µg/mL frente a linfocitos humanos, utilizando diferentes concentraciones del extracto.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de linfoproliferación

Concentración (µg/mL)	Lectina (Con A)			Extracto etanólico <i>Pleurotus spp</i>		
	Media (%)	DS (%)	Actividad*	Media (%)	DS (%)	Actividad*
1000	76.42	3.90	P+	92.59	3.15	I+
500	56.02	11.50	P+	76.12	4.63	I+
250	33.40	4.42	P+	70.90	7.11	I+
125	25.45	2.35	P±	68.35	8.49	I+
62.5	20.08	1.88	-	65.62	8.20	I+
31.25	12.71	2.53	-	63.31	6.54	I+

Lectina: F= 69.60 y p< 0.01

Extracto: F= 9.90 y p< 0.01

DS: Desviación estándar

Con A= *Concanavalin A*

Porcentaje de Proliferación de 25-30 % = P±

Porcentaje de Proliferación de 31-100 % = P+

Porcentaje de Proliferación de 101 - 200 % = P++

Porcentaje de Proliferación mayor de 201= P+++

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+++

Fuente: Datos experimentales, obtenidos en el laboratorio de bioensayos No. 3, depto. De Citohistología, edificio T11, USAC

IX. DISCUSIÓN

El proceso de extracto etanólico del basidiomiceto *Pleurotus* spp., procedente de cepas artesanales cultivadas en Chimaltenango, de las cuales se obtuvo una recuperación de 4.4%, lo cual es un rendimiento bajo ya que para su desarrollo futuro a mayor escala, sería necesario contar con materia prima muy abundante, además de que la disponibilidad se ve limitada en Guatemala, ya que la mayoría de la producción es destinada para el uso alimenticio, esto a que el precio oscila entre los Q.18.00 y Q.25.00 por libra, la suma de estos factores limita la explotación del mismo.

La actividad antibacteriana y antilevadura del extracto etanólico fue negativa a una concentración de 1 mg/mL, de igual manera, el extracto no presentó actividad biocida contra las levaduras y los hongos filamentosos, ya que no hubo una inhibición del crecimiento. Se consideró como punto de inicio la concentración de 1mg/mL, ya que al presentar alguna actividad a concentraciones menores, ésta no sería significativa para el futuro desarrollo del micofármaco, debido al bajo porcentaje de recuperación del extracto etanólico de *Pleurotus* spp. Por otro lado, en los ensayos contra hongos dermatofitos únicamente se obtuvo inhibición parcial de las cepas *M. canis* (84.42%) y *M. nanum* (70.19%).

En estudios realizados por Kathiravan et al., (2012) además de Pinna, Gévry, Coté & Strois (2010) se ha demostrado que tres esteroides: 5 α -ergosta-7-en-3 β -ol, 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol y 5,8-epidioxi-5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol y cinco terpenos: ácido aplanoxídico A, C, F, G y H aislado de *Ganoderma annulare*, presentaron actividad contra *M. canis*, lo cual comparado con los resultados obtenidos en este estudio, alguno de estos compuestos se encuentran presentes en *Pleurotus* sp., lo cual generó una inhibición a la cepa de *M. canis* evaluada (Alves et al., 2013).

En el género *Pleurotus* de igual forma se han encontrados proteínas antifúngicas, como lo es la Ribonucleasa, obtenida de *P. sajor-caju*, la cual mostró actividad contra *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella arachidicola* (Ngai & Ng, 2004). Asimismo, se

identificó a eryngina, el cual es un péptido antifúngico aislado de cuerpos fructíferos de *P. eringii*, demostrando una actividad contra *F. oxysporum* y *M. arachidicola* (Wang, & Ng, 2004), esto se debe a que su secuencia N-terminal mostró cierta similitud con la proteína antifúngica del hongo *Lyophyllum shimeiji* (Lam & Ng, 2001). Además de que existen varios péptidos con actividad antifúngica los cuales fueron descritos como Pleurostrina, aisladas de *P. ostreatus*, que mostró actividad contra *F. oxysporum*, *M. arachidicola* y *Physalospora piricola* (Chu, Xia, & Ng, 2005)

Según lo mencionado por Alves et al., (2013), los mecanismos de acción de algunos de los compuestos descritos anteriormente no están disponibles en literatura, menciona que en cuanto a las proteínas y péptidos, el mecanismo de acción implica la inactivación ribosómica. Sin embargo, el modo de acción de muchas otras proteínas permanece desconocido siendo investigado extensamente. Por ejemplo la ribonucleasa presenta una secuencia N-terminal similar a la presente en el péptido bacteriocínico de *Lactobacillus plantanum* y también enzimas implicadas en el metabolismo del ARN.

A pesar de que el extracto etanólico presentó actividad biológica significativa sería difícil considerarlo como potencial antifúngico de uso farmacéutico al tomar en cuenta su bajo porcentaje de rendimiento, esto comparado con las consideraciones dadas por Alves y colaboradores (2013), en donde consideran que la actividad antifúngica observada para los compuestos estudiados no es comparable con los antibióticos más utilizados para las enfermedades fúngicas; sin embargo esto, deja las puertas abiertas para futuros estudios que pueden modificar la efectividad de los compuestos mencionados con la finalidad de aumentar la actividad antifúngica.

En la determinación de la actividad inmunomoduladora fue utilizado el ensayo de linfoproliferación, debido a que la actividad de los linfocitos T representa uno de los principales mecanismos de defensa inmunitaria. Para el efecto fue utilizada la metodología con base en los recuentos celulares inicial y final, al enfrentar las células aisladas al extracto etanólico del hongo, empleando como control positivo de actividad estimulante de la linfoproliferación, la lectina Concanavalina A (Con A), cuyo efecto es ejercido sobre los

linfocitos T de forma independiente al receptor de linfocitos T o TCR (Ruiz y González, 2013).

El extracto etanólico de *Pleurotus* sp. presentó actividad inhibitoria con una concentración efectiva mínima (CEM) de 31.5 µg/mL. La relación dosis-efecto del extracto etanólico sobre el ensayo de linfoproliferación demostró una relación directamente proporcional, entre el porcentaje de inhibición y la concentración del extracto, demostrando que a medida que se aumentaba la concentración del extracto de igual forma aumentaba la actividad inhibitoria frente a los linfocitos.

En estudios realizados por Schepetkin & Quinn (2006) colaboradores lograron determinar que la especie *Pleurotus ostreatus* posee una actividad estimuladora tanto en macrófagos peritoneales como en células Natural Killer, conjuntamente con lo anterior y con lo encontrado la presente investigación en donde se logra evidenciar una acción de tipo inhibitorio hacia la población linfocítica, se ve reafirmada la influencia que posee este basidiomiceto en la inmunomodulación en los distintos tipos de células inmunitarias, aunque aún queda por ser determinado tipo o tipos de compuestos responsables de la actividad inhibitoria. Algo muy importante al tomar en cuenta la actividad inhibitorio, es que al realizarse a través de un recuento, se cae en un sesgo de incluir el debris celular, ya que se pueden realizar recuento de células muertas.

La actividad que presenta el extracto etanólico, puede deberse a la presencia de distintos polisacáridos y/o complejos de polisacárido-proteína, los cuales muestran una actividad inmunomoduladora definida, ya que están involucradas en la modulación de la producción de citoquinas en cultivos de hPBMC *in vitro* esto según Jeurink, Lull, Savelkoul, & Wichers, (2008), además de que algunas de estas citocinas están implicadas en la regulación de subconjuntos de células T, lo cual se ve reflejado en la modulación de los mismos.

Los resultados obtenidos, aunados al bajo porcentaje de recuperación resultan en efectos inmunomoduladores difícilmente aplicables, ya que se requieren elevadas cantidades del hongo estudiado para lograr un efecto considerable a partir de un extracto

crudo. Sin embargo, es probable que mediante el aislamiento de los compuestos responsables de las actividades observadas, puedan obtenerse mejores resultados.

X. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Pleurotus* spp no presentó actividad antibacteriana ni antilevadura en los ensayos realizados contra siete distintas bacterias y el mismo número de levaduras diferentes.
2. El extracto etanólico de *Pleurotus* spp presentó actividad antifúngica solamente contra dos especies de dermatofitos: *M. nanun* y *M. canis* a una concentración de 1 mg/mL.
3. La concentración mínima inhibitoria para *M. nanum* fue de 0.5mg/mL obteniendo un 26.09% de inhibición, mientras que para para *M. canis* fue de 0.25mg/mL obteniendo un 35.06% de inhibición.
4. La actividad del extracto etanólico de *Pleurotus* spp. fue inhibitoria sobre linfocitos humanos a una concentración de 31.25µg/mL.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar tamizaje fitoquímico para determinar cualitativamente los principales grupos fitoquímicos presentes en el extracto etanólico, a partir del empleo de solventes apropiados y reacciones de caracterización y coloración.
2. Continuar en la búsqueda de actividad antimicrobiana del extracto etanólico con otras especies bacterianas y fúngicas.
3. Realizar más estudios y evaluar el análisis químico para el aislamiento de la molécula responsable de la actividad inhibitoria sobre los linfocitos T.

XII. REFERENCIAS

- Abumohor, P. (2005). Fisiología de la respuesta inmune. *Revista Chilena de Reumatología*, 21(2), 51-57.
- Alves. M., Ferreira. I., Dias. J., Teixeira. V., Martins. A. & Pintado. M., (2013) A review on antifungal activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Current Topic in Medicinal Chemistry*, 13, 2648-2659.
- Andrade, R. (2012). La producción iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional. En J., Sánchez, y G., Mata (Eds.), *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica*. (pp. 9-16). Ciudad de México, México: El Colegio de Frontera Sur, Instituto de Ecología.
- Barbado, J. (2003). *Hongos comestibles, su empresa de fungicultura*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Albatros Saci.
- Blackwell, M. (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 millionspecies?. *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- Bran, M., Morales, O., Cáceres, R. y Flores, R. (2003). Contribución al conocimiento de los hongos comestibles en Guatemala. *Revista Científica*, 1, 5-10.
- Bran, M., Morales, O., Cáceres, R., Flores, R., Álvarez, G., Mazariegos, A. y Quan, L. (2005). *Producción de inóculo de cepas nativas para estimular el cultivo de hongos comestibles en comunidades campesinas, como alternativa de autoconsumo y comercialización*. (Informe Técnico FINAL). Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Bran, M., Morales, O., Flores, R., Cáceres, R. y Gurriarán C. (2010). *Transferencia de tecnología para el cultivo artesanal del "hongo de pino" (Neolentinus ponderosus) en comunidades campesinas del altiplano de*

Guatemala. Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Brancato, F. & Golding, N. (1953). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45, 848-864

Cano, A. y Romero, L. (2016). Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. *Revista Chilena de Nutrición*, 44(1), 75-80.

Chang, S. & Miles, P. (2004) *Mushroom, cultivation, Nutritional value, Medicinal effect, and Environmental Impact*. (2nd ed.) Washington D.C., Estados Unidos de América: CRC press LLC.

Chen, H., Tsai, Y., Lin, S., Lin, C., Khoo, K., Lin, C. & Wong, C. (2004). Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 5595–5601.

Chu, K., Xia, L. & Ng, T. (2005) Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides*, 26, 2098-2103.

De León, R. (2007). Cultivo de *Pleurotus* spp y buenas prácticas de manejo para la producción de cuerpos fructíferos inocuos. En J. Sánchez, D. Marínez-Carrera, G. Mata, y H. Leal (Eds.), *El Cultivo de setas Pleurotus spp en México*.(pp. 177-183). Ciudad de México, México: El Colegio de Frontera Sur, Instituto de Ecología.

De León, R. (2010). Producción comercial de *Pleurotus* spp y *Lentinula edodes* en Guatemala. En D., Marínez-Carrera, N., Curvetto, M., Sobal, P., Morales, y Mora, V (Eds.). *Hacia un Desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XX*, (pp. 465-487). Puebla, México: El Colegio de Frontera Sur, Instituto de Ecología.

Flores, R., Comandini, O.,& Rinaldi, A. (2012). A preliminary checklist of

macrofungi of Guatemala, with notes on edibility and traditional knowledge. *Mycosphere*,3(1), 1-21.

Ganeshpurkar, A., Rai, G.,& Jain, A. (2010). Medicinal mushrooms: Towards a new horizon. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 127-135.

García, I. (2005). Los hongos: otros recursos del bosque y su interés de conservación. *Recursos Rurais: Novas Tendencias na Caracterización e Xestión da Biodiversidade*, 2, 45-50

González, N., Oliva, S., Ramírez, K., Rodríguez, C., Sánchez, S. y Paz, M. (2010). Determinación de la actividad inmuomoduladora 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. *Revista Científica*,18 (1), 63-71.

Jeurink, P., Lull, C., Savelkoul, H. & Wichers, H. (2008) Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*. 8, 1124-1133

Kathiravan, M, Salake, A., Chothe, A., Dudhe, P, Watode. R, Mukta. M. &Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents a review. *Medicinal Chemistry*. 20, 5678-5698

Lam, S. & Ng, T. (2001) First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects, *Archives of Biochemistry and Biophysics*.393, 271-280.

Lechner, B., Wright, J. &Albertó, E. (2004). Thegenus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, 96(4), 845-858.

Llauradó, G., Morris, H., Albear, J., Casta, L. y Bermúdez R. (2011). Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista*

- Lorenzana, R., Mazariegos, A., Paz, M. y Sommerkamp, I. (2009). Determinación de la actividad inmunomoduladora de dos extractos del hongo *Grifola frondosa* (Dicks.:FR.) S.F. Gray, mediante ensayos *in vitro*. *Revista Científica*,5(1), 8-16.
- MacRae, W., Hudson, J. & Towers, G. (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian *Euphorbiaceae* *Journal Ethnopharmacol*22(2), 143-172
- Marin, M y Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1), 42-55.
- Márquez, O. Juárez, L. y Trigós, A. (2014). Aislamiento e identificación de esteroides de una cepa comercial de *Pleurotus* sp. *Revista Chapingo Serie Cienicas Forestales y del Ambiente*, 20(2), 227-235
- Mitscher, L., Leu, R., Bathala, M., Wu, W. & Beal, J. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35(2), 157-166
- Mora, V., y Martínez, D. (2007). Carrera investigaciones básicas, aplicadas y socioeconómicas sobre el cultivo de setas *Pleurotus* spp. En J. Sánchez, D. Marínez-Carrera, G. Mata, y H. Leal (Eds.). *El Cultivo de setas Plerotus spp en México*.(pp. 7-26). México D.F., México: El Colegio de Frontera Sur, Instituto de ecología.
- Morales, O., Bran, M. y Caceres, R. (2010). Los hongos comestibles de uso tradicional en Guatemala. En D., Marínez-Carrera, N., Curvetto, M., Sobal, P., Morales, y V., Mora (Eds.). *Hacia un Desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamerica: Avances y perspectivas en el siglo XXI*.(pp. 465-487).Puebla, México: El Colegio de Frontera Sur, Instituto de ecología.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Ngai, P. & Ng, T. (2004) Ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides*, 25(1), 11-17.
- Paredes, F. y Roca, J. (2004). Accion de los antibioticos. *Oficina de Farmacia*, 23(3),616-624
- Parslow, G., Sities, P. e Imboden, B. (2002). *Inmunología básica y clínica*. México D.F., México: Editorial Manual Moderno.
- Philips, R. (1991). *Mushrooms of North America*. Boston, MA: Little Brown and Company.
- Pinna, S., Gévry, M., Coté, M. &Strois, L. (2010) Factors influencing fructification phenology of edible mushrooms in a boreal mixed forest of eastern Canada. *Forest Ecology and Management*. 260, 294-301.
- Rodríguez, C., Ramírez, K., González, N., Oliva, S. y Sánchez, S. (2009). *Determinación de la actividad imuomoduladora 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. (Seminario de graduación). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Romero, O., Huerta, M., Damián, M., Macías, A., Tapia, A., Parraguirre, J. y Juárez, J. (2010). Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L., CV. ROATAN) deshidratada, en relación con otros sustratos agrícolas. *Agronomía Costarricense*,34(1), 53-63.

- Ruiz, J. y González, L. (2013). Pruebas de laboratorio en el diagnóstico de las inmunodeficiencias primarias. *Anales de Pediatría Continuada*, 11(5), 282-290.
- Schepetkin, I. & Quinn, M. (2006) Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potencial. *International Immunopharmacology*, 6(3), 317-333.
- Schmit, J. & Mueller, G. (2007). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 99-111
- Singer, R. (1975). *The Agaricales in modern taxonomy*. (3rd ed). Chicago, IL: J. Cramer.
- Sommerkamp, Y., Paz, A., & Guzmán, G. (2016). Medical mushrooms in Guatemala. *International Journal of Medical Mushrooms*, 18(1), 9-12.
- Suárez, C. y Nieto, I. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1-18.
- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Metodos de estudio de la sensibilidad antibiotica. En Arbiza, J. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. (2ª ed., pp. 663-671). Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro Fundación de Ediciones de la Facultad de Medicina Universidad de la República.
- Tolisano, J., & López, M. (2010). *Guatemala biodiversity and tropical forest assessment*. Washington, DC.: United States Agency for International Development
- Torres., L. (2002). *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. Madrid, España: Aran Ediciones.
- Türkoğlu, A., Emin, M. & Mercan, N. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of *Russula delica* Fr: an edible wild mushroom. *Eurasian Journal of*

Analytical Chemistry, 2(1), 54-67.

- Valencia, G., Garín, M., Téllez, M., y Durán, E. (2008). Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*. *Revista Mexicana de Micología*, 28, 119-123
- Valverde, M., Hernández, T. & Paredes, O. (2015). Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 1-14
- Vega, G. (2008). Inmunología para el médico general: La respuesta inmune. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México*, 51(3), 128-129.
- Wang, H. & Ng, T. (2004) Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*, *Peptides*, 25, 1-5.
- Zaluaga, G. (2001). *Manual para la producción casera de hongos comestibles del género Pleurotus spp.* (pp. 6-26). Bogotá, Colombia: Editorial de Risaralda.
- .
- .

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Obtención del extracto

Compuesto	Peso
Hongo fresco	2.5 Kg
Hongo desecado	900g
Extracto etanólico	110g
Porcentaje de rendimiento	4.4%

Fuente: Datos experimentales, obtenidos en el laboratorio de bioensayos No. 3, depto. De Citohistología, edificio T11, USAC.

Anexo 2. Resultados de los ensayos de actividad antibacteriana

Bacteria	Actividad bactericida de <i>Pleurotus spp</i>
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-
<i>E. coli</i> *	-
<i>K. pneumoniae</i> *	-
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>S. aureus</i> †	-
<i>S. tiphymurium</i>	-

(-) Sin actividad 1mg/mL

(*) Obtenida de muestra clínica, bacteria productora de Betalactamasas de espectro extendido.

(†) *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente (MRSA)

Fuente: Datos experimentales, obtenidos en el laboratorio de bioensayos No. 3, depto. De Citohistología, edificio T11, USAC.

Anexo. 3 Resultados del ensayo de actividad antilevadura

Levadura	Actividad antilevadura de <i>Pleurotus spp</i>
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 1369	-
<i>C. glabrata</i> *	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-
<i>C. neoformans</i> *	-
<i>C. neoformans var. gatti</i>	-
<i>I. orientalis</i> ATCC 6258	-

(-) Sin actividad 1 mg/mL

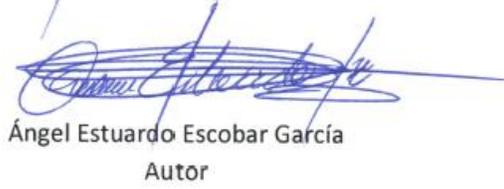
(+) Con actividad 1 mg/mL

(*) Cepa obtenida de muestra clínica e identificada por el software ApiWeb

Fuente: Datos experimentales, obtenidos en el laboratorio de bioensayos No. 3, depto. De Citohistología, edificio T11, USAC.



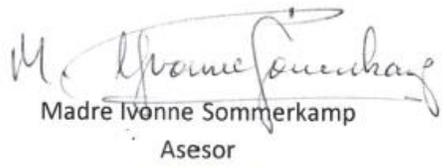
Adolfo Noé Simón Dionicio
Autor



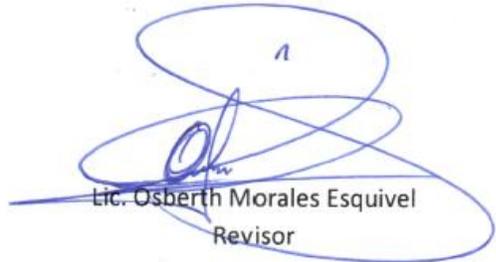
Ángel Estuardo Escobar García
Autor



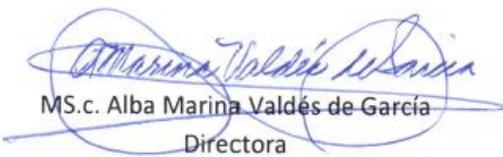
Licda. Ana Margarita Paz De Ramírez
Asesor



Madre Ivonne Sommerkamp
Asesor



Lic. Osberth Morales Esquivel
Revisor



MS.c. Alba Marina Valdés de García
Directora



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano