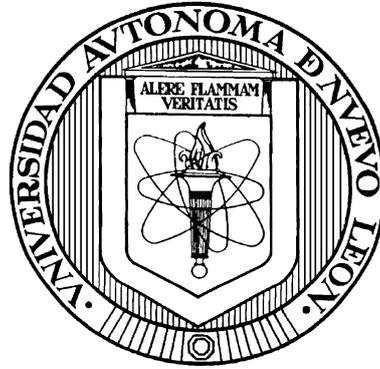


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE MACROMICETOS DEL NORESTE DE  
MÉXICO Y EVALUACIÓN DE SU  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Por

Q.F.B. PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO.

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación terminal en Farmacología y  
Toxicología.

Agosto del 2007.

DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS DE MACROMICETOS DEL NORESTE DE MÉXICO Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Aprobación de la Tesis:



---

Dra. LOURDES GARZA OCAÑAS  
Director de Tesis



Dr. FORTUNATO GARZA OCAÑAS  
Director Externo



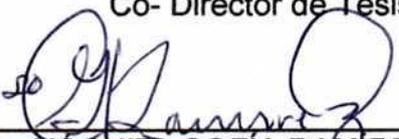
---

Dr. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA  
Co- Director de Tesis



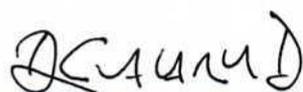
---

Dr. LUCIO VERA CABRERA  
Co- Director de Tesis



---

Dra. XÓCHITL SOFÍA RAMÍREZ GÓMEZ  
Co-Director de Tesis



---

Dr. DIONICIO ÁNGEL GALARZA DELGADO  
Subdirector de Estudios de Postgrado.

Patricia González Barranco

Fecha de graduación: Agosto de 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina.

Título del Estudio:

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS DE  
MACROMICETOS DEL NORESTE DE MÉXICO Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Número de páginas: 106.

Candidato para la obtención del Grado de Doctor en  
Ciencias con orientación terminal en farmacología y  
Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología.

**Propósito y Método del Estudio:** Los macromicetos han sido ampliamente utilizados dentro de la medicina tradicional en países orientales para la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades y recientemente se han postulado como fuente potencial para la obtención de compuestos con actividad antitumoral, inmunomoduladora y antibiótica. México posee una gran diversidad de macromicetos y la capacidad de los mismos para producir metabolitos secundarios con potencial farmacológico no ha sido evaluada en la mayoría de ellos. En esta investigación se llevó a cabo la evaluación de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas e inmunomoduladoras así como de citotoxicidad de diez cepas de macromicetos que crecen en el noreste de México. Las especies se aislaron y cultivaron *in Vitro* en fase acuosa a partir de muestras obtenidas en fase sólida, y se evaluaron muestras de medio de cultivo obtenidas a cuatro tiempos distintos de crecimiento: basal, una semana, uno y dos meses. La citotoxicidad se evaluó mediante la técnica del MTT en células de hígado de Chang; la actividad antioxidante se evaluó mediante la prueba de diclorofluoresceína, la actividad antimicrobiana mediante la técnica de microdilución en caldo y el efecto inmunomodulador, mediante la técnica de Jerne, modificada por Cunningham en ratones BALB/c. Ninguna de las muestras de las especies evaluadas resultó ser citotóxica. *Calvatia cyathiformis*, *Armillaria mellea*, *Suillus luteus*, *Lentinus lepideus* y *Suillus lakei* mostraron tener actividad antioxidante siendo *Lentinus lepideus* y *Suillus lakei* los más activos. *Ganoderma applanatum*, *Armillaria mellea* y *Suillus lakei* mostraron tener actividad antimicrobiana. *Suillus lakei* fue la cepa con mayor actividad antioxidante y además mostró tener actividad inmunoestimulante. Se realizó el fraccionamiento inicial biodirigido de las muestras de dos meses de crecimiento de *Suillus lakei*, debido a que ésta fue la especie más activa y se obtuvieron 4 fracciones: FI (etanólica), FII (hexánica) FIII (obtenida con acetato de etilo) y FIV (butanólica) y se evaluó su actividad biológica. La fracción FIV fue la que tuvo mayor actividad antioxidante e inmunomoduladora y la fracción FI fue la que mostró mayor actividad antimicrobiana.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los resultados de la actividad antioxidante, inmunoestimulante y antimicrobiana obtenidos para seis de las especies de basidiomicetos evaluados en este estudio constituyen el primer reporte de actividad farmacológica de metabolitos secundarios secretados al medio de cultivo por basidiomicetos originarios de nuestro país. Se propone que estas especies son fuente de compuestos con potencial farmacológico.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS.



Dr med. Lourdes Garza Ocañas.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Gracias:*

A Dios, por permitirme haber cumplido una meta más en mi vida y por haberme colocado en el preciso espacio y momento para encontrarme con las personas que han cruzado por mi camino y han contribuido a forjarme como la persona que soy ahora.

A mi familia, que siempre ha confiado en mí y me ha brindado su amor y apoyo incondicionalmente; lograr esto, sin ustedes, hubiera sido mil veces más difícil.

A ti, Manuel, por haber tenido la paciencia de soportar mis ausencias y llenarme de amor y ánimo en los momentos en que más lo necesité.

Con toda mi admiración y respeto a la Dra. Lourdes Garza y al Dr. Oscar Torres, por todo el tiempo que dedicaron a la realización de este trabajo, por sus consejos y enseñanzas a lo largo de estos cuatro años.

Al Dr. Fortunato Garza, al Dr. Lucio Vera y al Dr. Mario César Salinas, por sus invaluable sugerencias para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Xóchitl Ramírez, miembro del comité de tesis y amiga, por su guía a lo largo del camino.

A quienes estuvieron a mi lado recordándome que todos los obstáculos pueden vencerse; mil gracias por el tesoro de su amistad.

A PAYCIT UANL por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
2.1 MATERIAL. ....	19
2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
2.1.1.1 MATERIAL FÚNGICO.....	19
2.1.1.2 LÍNEAS CELULARES. ....	20
2.1.1.3 MATERIAL MICROBIOLÓGICO. ....	20
2.1.1.4 ANIMALES. ....	20
2.1.1.5. GLÓBULOS ROJOS DE CARNERO. ....	21
2.1.1.6. SUERO DE COBAYO. ....	21
2.1.2. MATERIAL Y EQUIPO.....	21
2.1.3 REACTIVOS.....	23
2.1.3.1 Reactivos para el cultivo <i>in vitro</i> de los macromicetos. ....	23
2.1.3.2 Reactivos para el fraccionamiento del medio de cultivo.....	24
2.1.3.3 Reactivos para el cultivo celular, prueba de MTT, prueba de DCFDA y técnica de Cunningham. ....	24
2.1.3.4 Reactivos para el cultivo microbiológico y prueba de actividad antimicrobiana.....	25

2.1.3.5 Reactivos para realizar el rastreo fitoquímico preliminar. ....	25
2.2 MÉTODOS. ....	27
2.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de macromicetos. ....	27
2.2.1.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido. ....	27
2.2.1.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido. ....	27
2.2.2 Obtención de muestras de medio de cultivo a evaluar. ....	28
2.2.3 Evaluación de la actividad biológica de las muestras. ....	28
2.2.3.1 Evaluación de citotoxicidad. ....	28
2.2.3.1.1 Cultivo en placas de 96 celdillas y mantenimiento de células de Chang. ....	28
2.2.3.1.2 Preparación de las muestras de medio de cultivo de las diferentes especies de macromicetos para la realización de la prueba del MTT y de DCFDA. ....	29
2.2.3.1.3 Exposición de las células a las muestras de medio de cultivo. ....	30
2.2.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante. ....	31
2.2.3.2.1 Exposición de células de hígado de Chang a las muestras de medio de cultivo de los basidiomicetos. ....	31
2.2.3.2.2 Medición de la actividad antioxidante. Método del DCFDA. ....	32
2.2.3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana. ....	33
2.2.3.3.1 Cultivo de los microorganismos. ....	33
2.2.3.3.2 Preparación del inóculo. ....	34
2.2.3.3.3 Preparación de la muestra. ....	34
2.2.3.3.4 Método de difusión en disco. ....	35

2.2.3.3.5 Método de microdilución en caldo. ....	36
2.2.3.4 Evaluación de la actividad inmunomoduladora. ....	36
2.2.3.4.1 Medición de la actividad inmunomoduladora <i>in vivo</i> .	
Técnica de Cunningham.....	36
2.2.3.4.1.1 Administración de muestras a evaluar e inmunización.	
.....	37
2.2.3.4.1.2 Obtención de células de bazo. ....	37
2.2.3.4.1.3 Llenado de cámaras y conteo de CFA- IgM. ....	39
2.2.4 Obtención de las fracciones del medio de cultivo que mostró	
mayor actividad.....	39
2.2.5 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y	
FIV.....	41
2.2.6 Rastreo fitoquímico preliminar. ....	42
2.2.6.1 Determinación de proteínas. ....	42
2.2.6.1.1 Preparación de la muestra a analizar. ....	43
2.2.6.1.2 Medición de proteínas totales. ....	43
2.2.6.2 Determinación de carbohidratos.....	43
2.2.6.2.1 Preparación de las muestras a evaluar. ....	44
2.2.6.3 Determinación de fenoles totales. ....	44
2.2.6.3.1 Preparación de las muestras a evaluar. ....	45
2.2.6.3.2 Medición de fenoles totales. ....	45
2.2.6.4 Rastreo fitoquímico cualitativo.....	45
RESULTADOS.....	47
3.1 Material fúngico. ....	47
3.1.1 Obtención de cepas para el estudio. ....	47

3.2 Crecimiento <i>in vitro</i> de los basidiomicetos.....	50
3.2.1 Crecimiento de cepas en medio sólido. ....	50
3.2.2. Crecimiento de cepas en medio líquido. ....	52
3.3 Actividad biológica de las muestras de medio de cultivo.....	62
3.3.1 Citotoxicidad. ....	62
3.3.2 Actividad antioxidante. ....	63
3.3.3 Actividad antimicrobiana. ....	73
3.3.4 Actividad inmunomoduladora.....	75
3.5 Actividad biológica de las fracciones. ....	77
3.5.1 Citotoxicidad. ....	77
3.5.2 Actividad antioxidante. ....	77
3.5.3 Actividad antimicrobiana. ....	80
3.5.4 Actividad inmunomoduladora.....	81
3.5.5 Rastreo fitoquímico preliminar. ....	82
DISCUSIÓN .....	84
CONCLUSIONES .....	91
PERSPECTIVAS .....	92
APÉNDICE A. ....	100
APÉNDICE B. ....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aspecto de varias especies de basidiomicetos: A) <i>Coriolus versicolor</i> , B) <i>Pleurotus ostreatus</i> , C) <i>Armillaria mellea</i> , D) <i>Lentinus edodes</i> , E) <i>Grifola frondosa</i> , F) <i>Ganoderma lucidum</i> .....	2
2. Fases del metabolismo de los basidiomicetos.....	4
3. Reacción efectuada durante la técnica de MTT.....	30
4. Reacción efectuada durante la medición de actividad antioxidante.....	32
5. Resultado positivo obtenido mediante la técnica de difusión en disco.....	35
6. Marcha para el fraccionamiento del medio de cultivo.....	41
7. Aspecto de carpóforos de basidiomicetos: A. <i>Ganoderma sp.</i> , B. <i>G. applanatum</i> , C. <i>G. lobatum</i> , D. <i>Coriolus versicolor</i> E. <i>Lentinus lepideus</i> , F. <i>Calvatia cyathiformis</i> , G. <i>Suillus luteus</i> , H. <i>Suillus lakei</i> , I. <i>Armillaria tabescens</i> , J. <i>Armillaria mellea</i> . ....	49
8. Aspecto del crecimiento de las cepas de basidiomicetos en medio sólido.....	51
9. Aspecto del crecimiento de <i>Ganoderma sp.</i> Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	52
10. Aspecto del crecimiento de <i>Ganoderma applanatum</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	53
11. Aspecto del crecimiento de <i>Ganoderma lobatum</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	54

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
12. Aspecto del crecimiento de <i>Coriolus versicolor</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	55
13. Aspecto del crecimiento de <i>Calvatia cyathiformis</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses .....	56
14. <i>Lentinus lepideus</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	57
15. <i>Suillus luteus</i> : Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	58
16. <i>Suillus lakei</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	59
17. <i>Armillaria mellea</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	60
18. <i>Armillaria tabescens</i> . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.....	61
19. Reducción de MTT producida por la muestra de medio de cultivo de 2 meses de <i>S lakei</i> , a distintas concentraciones.....	63
20. Actividad antioxidante de las muestras de medio de cultivo de una semana de crecimiento de las 10 cepas de basidiomicetos, a una concentración de 10mg/ml.....	64
21. Actividad antioxidante de <i>L lepideus</i> con relación al tiempo y con las distintas concentraciones evaluadas.....	65
22. Actividad antioxidante de muestras de medio de cultivo de un mes de crecimiento de las 10 cepas de basidiomicetos a una concentración de 10mg/ml.....	66
23. Actividad antioxidante de muestras de <i>S lakei</i> de un mes de cultivo, comparada con la vitamina C, a las dos horas de incubación.....	67

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
24. Actividad antioxidante de muestras de <i>L. lepideus</i> de un mes de cultivo, comparada con la vitamina C, a las dos horas de incubación. ....	68
25. Actividad antioxidante de muestras de <i>S. luteus</i> de un mes de cultivo, comparada con la vitamina C, a las dos horas de incubación. ....	69
25. Actividad antioxidante de muestras de <i>S. lakei</i> de un mes de cultivo, a lo largo del tiempo.....	69
26. Actividad antioxidante de muestras de <i>L. lepideus</i> de un mes de cultivo, a lo largo del tiempo. ....	70
27. Actividad antioxidante de muestras de <i>S. luteus</i> de un mes de cultivo, a lo largo del tiempo. ....	71
28. Actividad antioxidante de muestras de medio de cultivo de dos meses de crecimiento de las 10 cepas de basidiomicetos, a una concentración de 10mg/ml.....	72
29. Actividad antioxidante de muestras de <i>Suillus lakei</i> de dos meses de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación.....	72
30. Actividad antioxidante de muestras de <i>Lentinus lepideus</i> de dos meses de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación.....	73
31. Actividad antioxidante de muestras de <i>Armillaria mellea</i> de dos meses de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación.....	78
32. Actividad antioxidante de las cuatro fracciones obtenidas a partir de <i>S lakei</i> de dos meses de cultivo.....	79
33. Actividad antioxidante de la fracción FIII de <i>S lakei</i> , comparada con la vitamina C.....	79

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
34.Actividad antioxidante de la fracción FIV de <i>S lakei</i> , comparada con la vitamina C.....	79
35.Espectro IR obtenido de la fracción butanólica obtenida de <i>Suillus lakei</i> de dos meses de cultivo.....	83

## LISTA DE TABLAS.

Tabla	Página
I. Algunos de los macromicetos medicinales más importantes en Asia Oriental.....	7
II. Principales efectos terapéuticos encontrados en basidiomicetos de oriente.....	8
III. Actividad antimicrobiana de muestras de dos meses de cultivo de: 1. <i>C versicolor</i> ; 2. <i>L lepideus</i> ; 3. <i>Ganoderma sp</i> ; 4. <i>G applanatum</i> ; 5. <i>G lobatum</i> ; 6. <i>C cyathiformis</i> ; 7. <i>S luteus</i> ; 8. <i>S lakei</i> ; 9. <i>A mellea</i> 10. <i>A tabescens</i> .....	74
IV. Actividad antimicrobiana de muestras de dos meses de cultivo de: 1. <i>C versicolor</i> ; 2. <i>L lepideus</i> ; 3. <i>Ganoderma sp</i> ; 4. <i>G applanatum</i> ; 5. <i>G lobatum</i> ; 6. <i>C cyathiformis</i> ; 7. <i>S luteus</i> ; 8. <i>S lakei</i> ; 9. <i>A mellea</i> 10. <i>A tabescens</i> .....	75
V. Número de células formadoras de anticuerpos producidas por la administración de las muestras de <i>S lakei</i> y <i>L lepideus</i> .....	76
VI. Actividad antimicrobiana mostrada por las fracciones obtenidas de <i>Suillus lakei</i> de dos meses de cultivo.....	80
VII. Actividad inmunomoduladora mostrada por las fracciones obtenidas de <i>Suillus lakei</i> de dos meses de cultivo.....	81
VIII. Resultados del rastreo fitoquímico realizado a la fracción butanólica.....	82

## ABREVIATURAS.

$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
ATCC	American Type Culture Collection
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
CFA	Células formadoras de anticuerpos
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
cols	Colaboradores
DE	Desviación estándar
hr	Horas
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramos
LIID	Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
ml	Mililitros
n	Número de muestra
p.o.	Vía oral
pH	Potencial de iones hidrógeno
PQM	Productos Químicos Monterrey
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
U	Unidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

El término “seta” se emplea para nombrar a un hongo macroscópico con cuerpo fructífero distintivo y lo suficientemente grande como para ser visto a simple vista y recolectado con la mano. Desde este punto de vista, son los basidiomicetos, y algunas especies de ascomicetos, los que pertenecen a esta denominación. Se estima que existen alrededor de 140 000 especies de hongos en la Tierra, de las cuales sólo un 10% son conocidas; y muy pocas han sido estudiadas. <sup>1</sup>

Los basidiomicetos también se conocen con el nombre de macromicetos, y se consideran los más evolucionados del reino Fungi. Presentan una gran variedad de tamaños y formas, así como de colores. (Figura 1)<sup>2</sup> Crecen en materia orgánica muerta, ayudando a su descomposición, lo cual les da un gran valor ecológico, además de tener un gran valor nutricional: su contenido de proteínas puede variar del 10 al 40%; el de carbohidratos del 3 al 21%, del 3 al 35% de los cuales es fibra (peso seco) y del 2-8%, grasa.



A)



B)



C)



D)



E)



F)

**Figura 1.** Aspecto de varias especies de basidiomicetos: A) *Coriolus versicolor*, B) *Pleurotus ostreatus*, C) *Armillaria mellea*, D) *Lentinus edodes*, E) *Grifola frondosa*, F) *Ganoderma lucidum*.

## **Metabolismo de los hongos.**

El metabolismo primario de un organismo incluye una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas - degradativas y sintéticas – que proveen al organismo de su energía, intermediarios sintéticos y sus macromoléculas claves para el desarrollo, como el ADN y las proteínas.

Por otro lado, el llamado metabolismo secundario envuelve a todos aquellos procesos sintéticos en los que los productos finales - los denominados metabolitos secundarios - no juegan un papel fundamental en la economía del organismo.

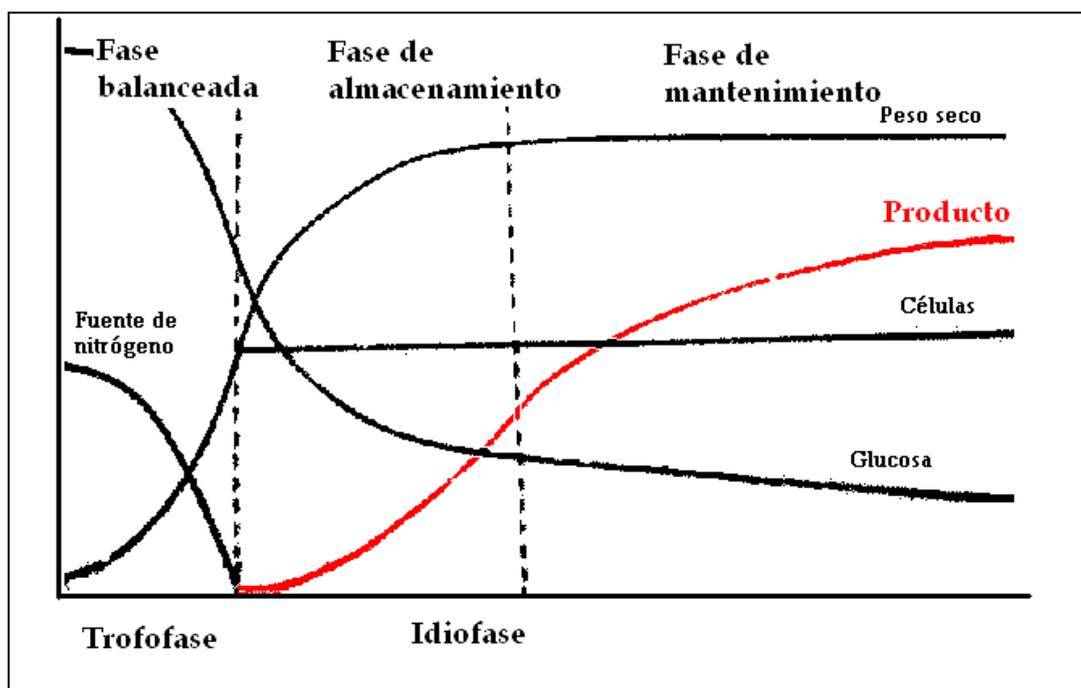
Mientras que el metabolismo primario es esencialmente el mismo para todos los sistemas vivos, el metabolismo secundario está restringido a formas de vida inferiores y es especie - e incluso, individuo - específico.

Al respecto, el crecimiento y metabolismo de un hongo en condiciones de cultivo acuoso pasa por una serie de fases. Inicialmente hay una etapa balanceada - denominada también trofofase -, en la que el organismo crece a una velocidad exponencial con el consumo correspondiente de nutrientes esenciales a una velocidad constante; la producción de metabolitos secundarios raramente se observa durante esta etapa.

Al término de esta primera fase, la fuente de nitrógeno está prácticamente agotada, y es aquí donde inicia la llamada idiofase, en la cual, debido al

agotamiento de nitrógeno, la replicación celular cesa y se llevan a cabo una serie de cambios metabólicos en las especies, lo que origina la producción de metabolitos secundarios. Ésta continúa hasta que la fuente de carbono se agota y comienza la autólisis.

Algunos de los cambios metabólicos sugeridos incluyen la acumulación de intermediarios que ocasionan la inducción de la síntesis de enzimas necesarias para formar compuestos nuevos, o bien, la activación de algunas enzimas producidas durante la trofofase. (Figura 3).



**Figura 2.** Fases del metabolismo de los basidiomicetos

Los metabolitos secundarios pueden ser obtenidos mediante extracción a partir del basidiomiceto recolectado en el campo (cuerpo fructífero), o bien, a partir de basidiomicetos cultivados *in vitro* como cuerpos fructíferos o

micelios; el cultivo *in vitro* de basidiomicetos permite controlar condiciones de crecimiento (como pH, humedad, temperatura y ciclos de luz-oscuridad) y eliminar posibles contaminantes que pudieran interferir con el desarrollo de estudios para evaluar su posible actividad biológica. Otra ventaja del cultivo *in vitro* de basidiomicetos es la capacidad de estos hongos para producir metabolitos secundarios y secretarlos al medio de cultivo líquido, de donde pueden ser extraídos para realizar estudios químicos, bioquímicos y biológicos.

En cultivos líquidos, los metabolitos secundarios se acumulan tanto en el medio de cultivo como en el micelio del hongo. Para un mismo compuesto, la distribución entre el medio de cultivo y el micelio se encuentra correlacionado con la solubilidad en agua y con la facilidad de cada compuesto de atravesar las membranas celulares.<sup>3,4</sup>

### **Basidiomicetos y sus usos a lo largo de la historia.**

Gran cantidad de hongos han sido, desde hace mucho tiempo, apreciados como alimentos muy nutritivos por diversas culturas en el mundo.<sup>1-13</sup>

Para los antiguos romanos y griegos, los hongos eran “el alimento de los Dioses”, y Aristóteles, Platón y Sófocles fueron algunos de los personajes que formaron parte de rituales en los que se les consumía.

Por otro lado, los egipcios los consideraban como un “regalo del dios Osiris”, y su uso era tan venerado que incluso acompañaban a los faraones en su viaje hacia la otra vida.

De la misma manera, para las culturas mesoamericanas, los hongos eran sagrados; éstos se empleaban en ceremonias sacramentales por sus propiedades psicoactivas y alucinógenas desde tiempos anteriores al 3000 a.C.

Para la cultura oriental, los hongos eran vistos como “el elixir de la vida”; éstos han formado la piedra angular dentro de su medicina tradicional desde hace miles de años, ya que se les reconoció como organismos con grandes beneficios para la salud. El consumo de los basidiomicetos dentro de la cultura oriental es muy variado; se consumen como: extractos acuosos calientes, concentrados, licores o polvos empleados para formular tónicos, tinturas, tés, sopas y formulaciones herbales.

Hongos medicinales importantes en Asia Oriental
<i>Auricularia aurícula</i>
<i>Lentinus edodes</i>
<i>Ganoderma lucidum</i>
<i>Coriolus versicolor</i>
<i>Grifola frondosa</i>
<i>Schizophyllum commune</i>
<i>Hericium erinaceus</i>
<i>Tremella fuciformis</i>
<i>Poria cocos</i>

**Tabla I.** Algunos de los macromicetos medicinales más importantes en Asia Oriental.

Actualmente, el uso de los macromicetos se ha extendido alrededor del mundo; países como Corea, China y Japón en Oriente, así como Rusia, Estados Unidos y Canadá han incorporado el uso de estos hongos para el tratamiento de diversas enfermedades.<sup>14-16</sup>

<b><i>Efectos terapéuticos encontrados en basidiomicetos de Oriente</i></b>
<b>Actividad inmunomoduladora</b>
<b>Actividad antimicrobiana y antiviral</b>
<b>Actividad antitumoral</b>
<b>Actividad antiinflamatoria</b>
<b>Hipocolesterolemia</b>
<b>Hipoglucemiante</b>
<b>Hepatoprotector</b>
<b>Actividad Antioxidante</b>

**Tabla II.** Principales efectos terapéuticos encontrados en basidiomicetos de oriente.<sup>15-19</sup>

**Estudios de actividad biológica de compuestos activos presentes en cuerpo fructífero, micelio y medio de cultivo de basidiomicetos medicinales.**

Muchos de los basidiomicetos que se emplean alrededor del mundo pueden agruparse dentro de los hongos funcionales, es decir, que contienen un componente (sea nutriente o no) que afecta de manera positiva una o más funciones del cuerpo. *Lentinus edodes*, por ejemplo, es considerado un modelo de hongo funcional. En la actualidad, los basidiomicetos, entre la gran diversidad de organismos vivos, se consideran la mayor fuente de

productos naturales biológicamente activos, ya sean compuestos constitutivos del macromiceto, o bien, alguno de la gran cantidad de metabolitos secundarios que tienen capacidad de producir.<sup>20, 21</sup>

A la fecha se han aislado diversas sustancias a partir de especies de basidiomicetos que crecen en oriente para las cuales se ha demostrado actividad antitumoral, inmunomoduladora, hipoglucemiante, hipocolesterolemiante y antioxidante, entre otras.

En este sentido algunos de los basidiomicetos más estudiados son:

***Lentinus edodes.***

Este basidiomiceto, también llamado Shiitake, es el segundo hongo comestible más comúnmente producido en el mundo. Además de ser una delicia culinaria, tiene una aplicación en medicina tradicional en Asia que data de hace más de 2000 años. Tiene actividad antitumoral comprobada desde 1969, cuando Ikekawa observó que los extractos acuosos en caliente de este macromiceto inhibían el crecimiento del sarcoma 180 inducido en ratones; en este mismo año, Chihara y cols. aislaron un polisacárido antitumoral de este hongo y le denominaron lentina.<sup>22, 23</sup>

Se ha demostrado que uno de los principales mecanismos para la actividad antitumoral de este hongo consiste en su actividad potenciadora del sistema inmune.<sup>24</sup> En 1984, Chihara y Hamuro comprobaron el aumento

en la producción de interleucina 1 y Factor Estimulante de Colonias (CSF), además de activación del sistema del complemento ocasionado por la lentina. Así mismo, en 1987 describieron un aumento en la secreción de interleucina 12, lo que favorece la diferenciación de los linfocitos hacia células TH1, como uno de los principales mecanismos para el efecto antitumoral producido por este Basidiomiceto.<sup>25, 26</sup>

Por otro lado, también se ha comprobado que la lentina estimula a las células NK y, en general, aumenta la actividad de los macrófagos.

Otra de las actividades farmacológicas reportada para este hongo es la actividad antimicrobiana y antiviral. En 1999, Hirasawa y cols. fraccionaron extractos obtenidos a partir de cuerpo fructífero seco y obtuvieron tres tipos de sustancias con actividad contra *Streptococcus spp*, *Actinomyces spp*, *Lactobacillus spp*, *Prevotella spp* y otros microorganismos de origen bucal.<sup>27</sup> Estudios realizados por Hatvani, en 2001, con muestras de medio donde se cultivó este hongo, demostraron que tenía actividad bacteriostática contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus megaterium*.<sup>28</sup> En 2005, Hiroko y cols. demostraron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de filtrados de medio de cultivo de *L edodes* dependientes de la composición de nutrientes del mismo.<sup>29</sup>

Adicionalmente a estos efectos, se ha reportado que compuestos presentes en *L. lepideus* producen efecto hepatoprotector, hipocolesterolemia e hipoglucemia.<sup>19, 29, 30</sup>

### ***Ganoderma lucidum***

*Ganoderma lucidum* es un basidiomiceto que ha sido empleado con propósitos medicinales desde hace cientos de años, especialmente en China, Corea y Japón, donde ha recibido distintos nombres como: Lingzhzi, Youngzhi y Reishi, respectivamente, siendo este último el más conocido.<sup>31</sup>

Este hongo ha sido ampliamente investigado; Kim y cols., en 1993, observaron una importante actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas producida por extractos de biomasa de este hongo<sup>32</sup>; sin embargo, pocos estudios se han efectuado a partir de extractos del medio de cultivo.

Del mismo modo, se ha visto que posee un importante efecto hepatoprotector; Shieh y cols. reportaron en 2001 que el principal mecanismo para esta actividad es su gran capacidad de atrapar radicales libres<sup>33</sup>; por otro lado, Kabir y cols., en 1988, encontraron que al administrar extractos de este hongo a ratas producía un importante efecto hipocolesterolemizante<sup>34</sup>. Noguchi y cols., por otro lado, reportaron su actividad inhibitoria de la enzima 5 $\alpha$  reductasa<sup>36</sup>. Además, Song y cols., en 2004, reportaron un importante efecto anti-angiogénico producido por extractos etanólicos de *G. lucidum*. mediado por inhibición de la producción de óxido nítrico.

A partir de este macromiceto se han aislado distintos componentes que incluyen polisacáridos (como el PS-G), proteoglucanos (como GLIS), proteínas (como la LZ-8) y terpenoides, entre otros.

Para la mayoría de los proteoglucanos y polisacáridos se ha comprobado su potente actividad antitumoral mediada principalmente por estimulación del sistema inmune<sup>36</sup>. En 1993, Wang y cols. describieron el efecto antitumoral de PS-G como una estimulación de macrófagos y linfocitos T, lo que llevaba a un aumento en la síntesis y liberación de citocinas, entre las que se encontraban IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ <sup>37</sup>. Zhang y cols., en 2002, reportaron una activación directa de los linfocitos B (activación, proliferación, diferenciación y producción de inmunoglobulinas) por GLIS, uno de los proteoglicanos activos provenientes del micelio o cuerpo fructífero de *G. lucidum*.<sup>38</sup>

### ***Armillaria mellea.***

Este basidiomiceto, también conocido como Mi Huan Jun, ha sido usado como parte de la medicina tradicional en forma de tabletas para el tratamiento del mareo, cefalea, insomnio, y convulsiones en niños. Watanabe y cols. demostraron, en 1990, que metabolitos químicamente derivados de adenosina sintetizados por *A mellea* son los responsables de su efecto sobre la actividad cerebral<sup>39</sup>. En ese mismo año, Obuchi y cols. aislaron y caracterizaron químicamente el ácido armilárico, un compuesto

obtenido a partir de micelio de este macromiceto, el cual demostró tener importante actividad contra *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*, así como actividad contra *Candida albicans*.<sup>40</sup>

Por otro lado, Shamtsyan y cols., en 2004, demostraron que extractos acuosos obtenidos a partir de micelio y de cuerpo fructífero de este basidiomiceto tienen actividad inmunomoduladora y antitumoral. En este estudio se observó que para lograr su efecto inmunoestimulante los extractos afectan a todas las células inmunocompetentes; producen un gran efecto mitogénico en las células linfoides, además de favorecer la síntesis de citocinas proinflamatorias en sangre periférica y promover a las células que participan en la respuesta inflamatoria.<sup>41</sup>

### ***Coriolus versicolor***

También llamado Cola de pavo o Yun Zhi, de este basidiomiceto se han aislado ya varias fracciones como el coriolan, el PSP y el PSK (o Krestin), todas estas fracciones están compuestas por heteroglucanos unidos a proteínas.

Se ha reportado que estas fracciones tienen la capacidad de disminuir la glicemia y los niveles plasmáticos de colesterol, especialmente el coriolan. Además, Mau y cols., en 2002, comprobaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *C. versicolor*, que si bien resultó inferior que la de

*G. lucidum*, demostró poseer una buena capacidad para atrapar radicales libres.<sup>41</sup>

Así mismo, se ha demostrado que la fracción D, aislada de este macromiceto, induce un incremento significativo en la producción de IL-1 $\beta$ , GM-CSF, y TNF- $\alpha$ , a partir de macrófagos de bazo de ratones, en un experimento realizado por Kodama y cols, en el 2001<sup>42</sup>; éste ha sido sólo uno de los estudios efectuados para comprobar la actividad inmunoestimulante y antitumoral de *C. versicolor*.<sup>43,44</sup>

### ***Grifola frondosa***

Del cuerpo fructífero de este basidiomiceto, también conocido como Maitake, se han obtenido diversas fracciones, entre ellas la fracción D, que aumenta la secreción de IL-1 $\beta$  efectuada por los macrófagos, además de incrementar la secreción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , elevando así la actividad de las células NK, así mismo, establece un predominio de las células TH<sub>1</sub> sobre las TH<sub>2</sub>, lo cual aumenta la inmunidad celular. Otra de las fracciones es el grifolan, la cual se ha observado que incrementa la producción de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ . Una tercera fracción es el MD, fracción obtenida a partir de la purificación de la fracción D, que ha demostrado aumentar el crecimiento de las células de médula ósea y promover su diferenciación a CFU-GM, además de aumentar la producción de óxido nítrico sintasa.<sup>45,46</sup>

Por otro lado, Shamtsyan y cols., comprobaron en 2004 que extractos acuosos provenientes del micelio de este macromiceto poseen una acción inmunoestimulante, que incluye la respuesta de todas las células inmunocompetentes.

Uno de los últimos polisacáridos unidos a péptido que ha sido aislado de micelio de este basidiomiceto es el GFPPS1b; en 2007, Cui y cols. demostraron que tiene la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales SGC-7901.

Adicionalmente a estas propiedades farmacológicas, se ha descrito que los extractos de micelio o cuerpo fructífero poseen actividad antihipertensiva e hipoglucemiante

México es un país destacado por su alta diversidad biológica, determinada en gran parte por su ubicación geográfica y su compleja orografía, lo que da lugar a las más variadas condiciones de temperatura, humedad y presión atmosférica, aptas para una gran cantidad de organismos con necesidades diferentes.

Dadas las condiciones enunciadas anteriormente, existen en el país alrededor de 200 000 especies de macromicetos, de las cuales sólo cerca de 7000 se han estudiado y clasificado adecuadamente y de éstas muy pocas han sido evaluadas en relación a su actividad biológica.

Por este motivo, y considerando los antecedentes de actividad biológica encontrados en algunas especies de basidiomicetos que crecen en oriente, se decidió realizar un estudio sistemático de 10 especies de macromicetos originarias del noreste del país con el objetivo de evaluar su actividad biológica y determinar su utilidad como posibles fuentes de compuestos con potencial farmacológico.

En esta investigación se evaluó la actividad antioxidante, el efecto inmunomodulador, la actividad antimicrobiana y el efecto citotóxico de 10 especies de macromicetos del noreste de México, seleccionadas con base en criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos.

### **OBJETIVO GENERAL.**

Investigar la producción de metabolitos secundarios farmacológicamente activos de macromicetos del noreste de México, cultivados *in Vitro*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1.- Cultivar los macromicetos en fase acuosa a partir de muestras obtenidas de cultivos en fase sólida *in vitro*.

2.- Obtener muestras de medio donde se cultivó cada uno de los macromicetos a distintos tiempos de crecimiento.

3.-Evaluar la actividad biológica (citotoxicidad, actividad antioxidante, antimicrobiana e inmunomoduladora) de las muestras obtenidas.

4.-Realizar el fraccionamiento biodirigido de las muestras que presenten mayor actividad o que resulten de particular interés.

5.- Evaluar la actividad biológica de las fracciones obtenidas

6.- Realizar la caracterización química preliminar de la fracción que tenga la mayor actividad biológica.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 MATERIAL.**

##### **2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.**

###### **2.1.1.1 MATERIAL FÚNGICO.**

Los basidiomicetos evaluados en este estudio provinieron de cultivos de carpóforos frescos de *Ganoderma sp.*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lobatum*, *Coriolus versicolor*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis*, *Suillus luteus* , *Suillus lakei*, *Armillaria tabescens* y *Armillaria mellea*; éstos fueron recolectados en bosques templados de coníferas y encinos de Galeana, N.L. en el año 2001. Los hongos fueron clasificados taxonómicamente, registrados y aislados en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L., campus Linares.

### **2.1.1.2 LÍNEAS CELULARES.**

Se emplearon células de hígado de Chang para evaluar la citotoxicidad de las muestras, así como la actividad antioxidante. La línea provino de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, E.U.A.

### **2.1.1.3 MATERIAL MICROBIOLÓGICO.**

Se emplearon las siguientes cepas de microorganismos, obtenidos de la ATCC y del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González”.

- a) *Escherichia coli* ATCC 25922.
- b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- c) *Candida albicans* ATCC 90028 y LIID Z-83.
- d) *Mycobacterium smegmatis* LR-222
- e) *Sporothrix schenckii* LIID713 y LIID1458.

### **2.1.1.4 ANIMALES.**

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c entre las 8 y 12 semanas de edad, con un peso promedio de 35g, los cuales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico, con tapa de rejilla metálica, bajo las siguientes condiciones: ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de 25°C y con administración de agua y alimento *ad libitum*.

### **2.1.1.5. GLÓBULOS ROJOS DE CARNERO.**

Los glóbulos rojos de carnero fueron obtenidos del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL.

### **2.1.1.6. SUERO DE COBAYO.**

El suero de cobayo se obtuvo de cobayos del bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL.

### **2.1.2. MATERIAL Y EQUIPO.**

Aditamento metálico para aplicación de muestra.

Asa bacteriológica de platino (Baxter).

Autoclave Market Forge Sterilmatic.

Balanza analítica Meltter-Toledo AB204.

Balanza granataria Meltter-Toledo PB3002.

Balanza granataria.

Cajas de Petri 100 x 15mm desechables.

Cámara de Neubauer.

Campana de flujo laminar, Labconco.

Campana de flujo laminar modelo NU-425-400, NUAIR.

Centrífuga Spinchron KR, Beckman.

Cubreobjetos.

Embudo de separación de 250ml, Pyrex.

Embudos de filtración talle largo, Pyrex.

Espectrofotómetro Bio Assay Reader HTS7000, Perkin Elmer.

Espectrofotómetro UV-VIS DU-7500, Beckman.

Espectrómetro de Luminiscencia LS50B, Perkin Elmer.

Frascos de cultivo T25, Costar.

Frascos de vidrio de 100, 250 y 500ml con tapón de rosca, Pyrex.

Hisopos.

Incubadora modelo 5410, NAPCO.

Invertoscopio Axiovert 100, Carl Zeiss.

Matraces Erlen-Meyer de fondo plano de 500ml y 2 litros, Pyrex.

Membranas de filtración de 0.22  $\mu\text{m}$ , Millipore.

Liofilizador Freezemobile 12L modelo 6211-0120, VirTis; y viales para liofilización de 300ml, Labconco.

Papel filtro Whatman # 1.

Placa de calentamiento con agitador magnético, Sigma.

Placas de cultivo de 6 celdillas, Costar.

Placas de cultivo de 96 celdillas, Costar.

Pipetas automáticas y puntillas de: 10-100, 20-200, 100-1000 y 1000-5000 $\mu\text{l}$ , Eppendorf.

Pipetas múltiples 50-300  $\mu\text{l}$ , LabSystems.

Pipetas lineales de 1, 5, 10 y 25 ml, Pyrex.

Pipetas Pasteur de vidrio y desechables, Kimble.

Pipeteador automático Pipet-aid, Drummond Scientific Co.

Portaobjetos, Corning.

Potenciómetro  $\Phi$ 320 pH meter, Beckman.

Probetas de vidrio de distintas capacidades, Pyrex

Raspador de células, Scientific Co.

Rotavapor 011 Büchi.

Tubos para centrífuga de 15ml 430055, Corning.

Tubos de ensayo de diversas capacidades, Pyrex.

Varillas en L desechables

Vasos de precipitado de distintas capacidades, Pyrex.

Vórtex, American Scientific Products.

### 2.1.3 REACTIVOS.

#### 2.1.3.1 Reactivos para el cultivo *in vitro* de los macromicetos.

Agar	DIFCO
Agua bidestilada	
Cloruro de calcio	Merck
Cloruro férrico	Sigma
Cloruro de sodio	Sigma
D-(+)-glucosa	Sigma
Extracto de malta	Bioxon
Extracto de levadura	Bioxon
Fosfato de amonio	Merck
Fosfato de potasio monobásico	Sigma
Hidrocloreuro de tiamina	Sigma
Sulfato de magnesio heptahidratado	PQM
Ácido cítrico monohidratado	PQM
Fosfato de sodio dibásico	Baker

### 2.1.3.2 Reactivos para el fraccionamiento del medio de cultivo.

Sulfato de sodio anhidro	Fermont
Etanol	Fermont
Hexano	Fermont
Acetato de etilo	Fermont
Butanol	Fermont

### 2.1.3.3 Reactivos para el cultivo celular, prueba de MTT, prueba de DCFDA y técnica de Cunningham.

Acetona	Fermont
Ácido acético glacial	J.T. Baker
Ácido ascórbico	Sigma
Ácido clorhídrico	Fermont
Bromuro de 3- [ 4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	
MTT	Sigma
Diacetato de 2',7' - diclorofluoresceína (DCFDA)	MP
Cloruro de sodio	Sigma
Cloruro de potasio	Sigma
Éter etílico	PQM
Fosfato de sodio monobásico	Sigma
Fosfato de potasio dibásico	Sigma
Fosfato de potasio monobásico	Sigma
Hidróxido de sodio	PQM
Isopropanol	PQM

Medio esencial mínimo (MEM)	Sigma
Metanol	Fermont
Parafina	
Suero fetal bovino	Sigma
Tripsina	Sigma
Xantina Oxidasa grado IV	Sigma

#### **2.1.3.4 Reactivos para el cultivo microbiológico y prueba de actividad antimicrobiana.**

Agar bacteriológico # 1	Oxoid
Agar Saburaud	DIFCO
Caldo Müller-Hinton	DIFCO
Cloruro de calcio	Merck
Cloruro de magnesio	Sigma
Cloruro de sodio	Sigma
Medio de conservación Skim Milk	Oxoid
Sangre	

#### **2.1.3.5 Reactivos para realizar el rastreo fitoquímico preliminar.**

Ácido bórico	Sigma
Ácido gálico	Sigma
Ácido pícrico	Fermont
Ácido sulfúrico	Sigma
Ácido tartárico	PQM

Albúmina sérica bovina	Sigma
Anhídrido acético	Merck
Carbonato de sodio	Merck
Cloruro de mercurio II	J.T. Baker
Fenol	PQM
Gelatina	Merck
Nitrato de bismuto	Fermont
Reactivo de Folin Ciocalteau	Sigma
Sulfato de cobre	Sigma
Tartrato de sodio y potasio	Sigma
Yodo	Sigma
Yoduro de potasio	Fermont

## **2.2 MÉTODOS.**

### **2.2.1 Cultivo *in vitro* de macromicetos.**

#### **2.2.1.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido.**

El cultivo de los macromicetos se realizó en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar. A partir de cepas puras de *Ganoderma sp.*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lobatum*, *Coriolus versicolor*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis*, *Suillus luteus*, *Suillus lakei*, *Armillaria tabescens* y *Armillaria mellea*, se tomaron muestras de micelio con un bisturí estéril y se colocaron en cajas Petri que contenían medio modificado de Melin- Norkrans, a pH 6.5; este medio de cultivo fue solidificado utilizando agar bacteriológico. Las cajas Petri sembradas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 2 semanas a una temperatura de 25°C y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h.

#### **2.2.1.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido.**

Se utilizaron como inóculos discos provenientes de los cultivos en medio sólido de las 10 cepas de macromicetos; estos inóculos se sembraron en

matraces Erlen-Meyer que contenían 150ml de medio modificado de Melin-Norkrans, a pH 6.5. Los matraces se dejaron incubar a 25°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12h, durante el tiempo establecido para la toma de cada una de las muestras a evaluar.

### **2.2.2 Obtención de muestras de medio de cultivo a evaluar.**

Las muestras a evaluar fueron aquellos medios de cultivo que cumplieron: 6 horas (muestra de tiempo basal), 1 semana (muestra de tiempo corto), 1 mes (muestra de tiempo intermedio) y 2 meses (muestra de tiempo largo) de incubación.

Para obtener la muestra, se separó la biomasa del medio de cultivo mediante filtración; el medio de cultivo fue llevado a sequedad mediante liofilización y almacenado a -4°C hasta su posterior evaluación.

### **2.2.3 Evaluación de la actividad biológica de las muestras.**

#### **2.2.3.1 Evaluación de citotoxicidad.**

##### **2.2.3.1.1 Cultivo en placas de 96 celdillas y mantenimiento de células de Chang.**

Para la evaluación de la citotoxicidad de las muestras de medio de cultivo se emplearon células de hígado de Chang. Estas células se mantuvieron en crecimiento en frascos de cultivo utilizando como nutriente medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), a una

temperatura de 37°C y una atmósfera de 95% aire/ 5% CO<sub>2</sub>, hasta la formación de monocapa.

Las células que ya formaron monocapa fueron expuestas a 1 ml de tripsina al 0.25% durante 10 minutos con el objetivo de desprender la monocapa adherida al frasco de cultivo, posteriormente se añadió un volumen igual de MEM + 10% de SFB, para desactivar la tripsina; las células despegadas fueron homogeneizadas, y ajustadas a una densidad celular de  $1 \times 10^4$ / 0.1ml. Luego de ajustar la cuenta celular, se colocaron 0.1ml de la suspensión celular a cada celdilla de la placa de 96 pozos, se selló la placa y se incubó a 37°C en atmósfera 95% aire / 5% CO<sub>2</sub>, durante 24-48hr hasta la formación de monocapa celular.

#### **2.2.3.1.2 Preparación de las muestras de medio de cultivo de las diferentes especies de macromicetos para la realización de la prueba del MTT y de DCFDA.**

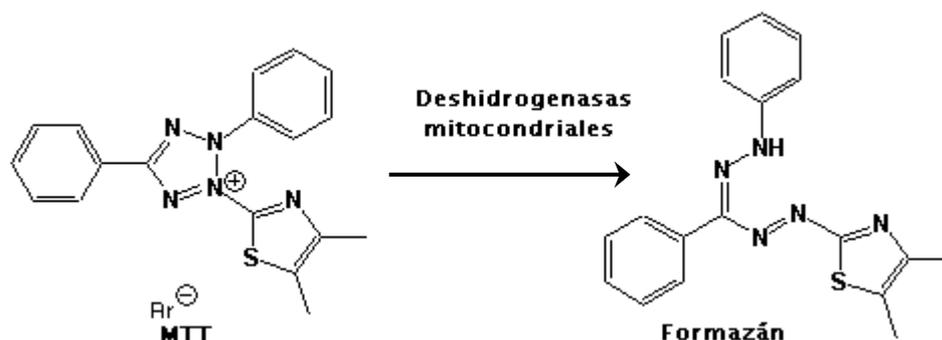
Se preparó una solución de 10mg/ml de cada una de las muestras de medio de cultivo liofilizado obtenidos a diferentes tiempos, disueltos en MEM; las muestras fueron esterilizadas por filtración a través de filtros millipore de 0.22 µm de tamaño de poro.

### 2.2.3.1.3 Exposición de las células a las muestras de medio de cultivo.

Se retiró el medio de cultivo a la placa donde se encontraban las células, y se colocaron en cada pozo 0.2 ml de cada una de las 6 diluciones previamente hechas para cada muestra de medio a evaluar. La placa se incubó a 37°C a una atmósfera de 95% aire / 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Se emplearon 3 celdillas para cada una de las diluciones y en todas las placas se colocaron celdillas solo con MEM que fungieron como control. Cada experimento se repitió un mínimo de tres ocasiones por separado.

### 2.2.3.1.4 Medición de la citotoxicidad.

La citotoxicidad se evaluó mediante la técnica de MTT; esta técnica se basa en la capacidad de las deshidrogenasas succínicas mitocondriales de las células viables para lograr la reducción del metiltiazoltetrazolio a formazán de acuerdo al método de Mossman <sup>47</sup>(Figura 3). Ésta se realizó 48 horas después de la exposición inicial de las muestras a evaluar.



**Figura 3.** Reacción efectuada durante la técnica de MTT.

Primero se efectuó una revisión morfológica de la citotoxicidad, mediante la observación a distintos lentes de aumento (20X, 40X y 100X) en un invertoscopio.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo de cada celdilla y se agregaron 0.1ml de una solución de MTT (0.5 mg/ml) en cada celdilla y se dejó incubar por 3 horas a 37°C, en una atmósfera de 95% aire / 5% CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se retiró la solución de las celdillas y se agregaron 0.2ml de alcohol isopropílico acidificado, luego de esto, se dejó incubar la placa en oscuridad a 25°C por 30 minutos. Se midió espectrofotométricamente a una  $\lambda$  de 570nm.

Se consideró como CT<sub>0</sub> a aquella concentración cuya absorbancia de la celdilla correspondiente fuera igual a la del control y CT<sub>100</sub> a aquella concentración en la que la celdilla diera una absorbancia igual a cero.

### **2.2.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante.**

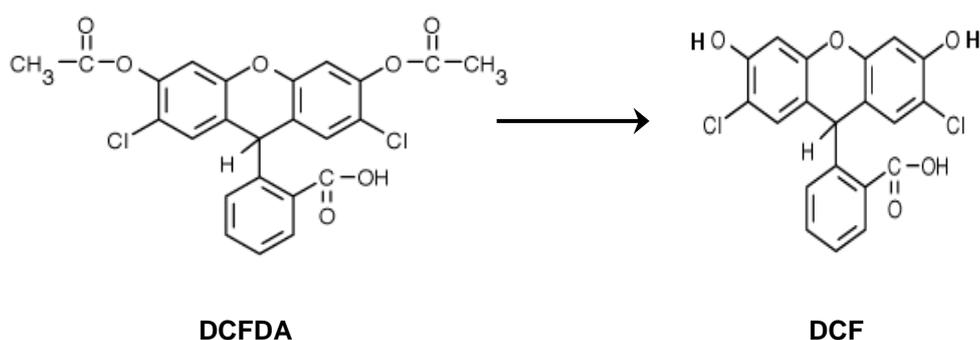
#### **2.2.3.2.1 Exposición de células de hígado de Chang a las muestras de medio de cultivo de los basidiomicetos.**

Esta técnica se llevó a cabo de la siguiente manera: se sembraron placas de 96 celdillas con células de hígado de Chang, a una densidad celular de  $1 \times 10^4$  células/ml en las condiciones antes descritas. Ya que se

formó la monocapa celular, se procedió a realizar la medición correspondiente

### 2.2.3.2.2 Medición de la actividad antioxidante. Método del DCFDA.

La evaluación de la actividad antioxidante de las muestras de medio de cultivo se efectuó mediante el método de Bass y cols.<sup>48</sup> En esta técnica se emplea el diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador intracelular de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS).



**Figura 4.** Reacción efectuada durante la medición de actividad antioxidante.

El DCFDA es desacetilado intracelularmente a diclorofluoresceína (DCF), compuesto que fluoresce, mediante una reacción de oxidación que se lleva a cabo en presencia de especies reactivas de oxígeno; por lo tanto, la cantidad de DCF producida es directamente proporcional a la cantidad de ROS presente en el medio. (Figura 4).

La medición se realizó de la siguiente manera: una vez formada la monocapa, fue retirado el medio de cultivo y se le agregó a cada celdilla 0.1ml de una solución de DCFDA 0.05 mg/ml y xantina oxidasa a 0.06 U/ml,

posteriormente, la placa se expuso a las muestras a evaluar en el mismo rango de concentraciones descrito para la prueba de citotoxicidad, añadiendo 0.1ml de cada dilución a cada celdilla. La placa expuesta se incubó a 37°C, y se llevaron a cabo mediciones espectrofotométricas a una  $\lambda = 485$  nm de excitación y  $\lambda = 530$  nm de emisión, cada hora durante las primeras 6 horas y al cumplir las 24 horas de exposición. Se emplearon como controles:

- a) DCFDA + MEM: como control negativo.
- b) DCFDA + Xantina oxidasa: como medida de la máxima capacidad oxidativa.
- c) DCFDA + Xantina oxidasa + Vitamina C: como punto de comparación en caso de encontrar efecto antioxidante, ya que éste es un compuesto del cual se ha estudiado ampliamente su capacidad para capturar especies reactivas de oxígeno.

La evaluación se realizó en tres ocasiones diferentes en experimentos separados.

### **2.2.3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana.**

#### **2.2.3.3.1 Cultivo de los microorganismos.**

Para la realización de esta prueba se emplearon microorganismos contra los cuales probar la actividad antimicrobiana de las muestras de medio de cultivo. Los microorganismos que se probaron fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC

90028 y LIID Z-83, *Mycobacterium smegmatis* LR-222 y *Sporothrix schenkii* LIID-713 y LIID-1458. Se empleó como medio de cultivo agar Sabraud.

Partiendo de una suspensión de conservación en congelación de cada uno de los microorganismos, se procedió a tomar una asada de la suspensión e inocularla en el agar correspondiente; se incubaron a 37°C durante una semana. Posteriormente a esto, se procedió a resembrar a partir de estos cultivos en agar nuevo; una vez realizado esto, se incubó cada cultivo a 37°C durante 3 días antes de la preparación del inóculo para la prueba, en caso de efectuar el método de difusión en disco y durante una semana, en caso de realizar el método de microdilución en caldo.

#### **2.2.3.3.2 Preparación del inóculo.**

El inóculo empleado en ambos métodos se ajustó de acuerdo con el número 1 del nefelómetro de MacFarland. Para preparar las suspensiones celulares se emplearon las colonias sembradas de los microorganismos y una solución estéril de NaCl al 0.9%.

#### **2.2.3.3.3 Preparación de la muestra.**

El medio de cultivo previamente liofilizado, se pesó y se preparó una solución a una concentración de 8mg/ml en agua bidestilada, en caso de ser para el método de difusión en disco y en caldo Müller – Hinton enriquecido con cationes, si es para el ensayo de microdilución en caldo; posteriormente,

se esterilizó por filtración al hacerlo pasar por una membrana de filtración con poros de 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### 2.2.3.3.4 Método de difusión en disco.

Esta técnica se basa en la medición de un halo de inhibición del crecimiento microbiano alrededor del lugar donde se colocó la muestra a evaluar; el poder antimicrobiano es directamente proporcional al tamaño de diámetro del halo de inhibición.<sup>49</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Resultado positivo obtenido mediante la técnica de difusión en disco.

La técnica se desarrolló de la siguiente manera: una vez preparado el inóculo, se procedió a colocar 0.4 ml del mismo sobre una caja Petri con agar Müller-Hinton, se distribuyó uniformemente con una varilla en L, luego se colocó el aditamento para aplicar las muestras y en cada uno de los orificios se colocaron 0.1 ml de muestra. Las cajas Petri se incubaron durante 48 horas a 37°C, pasado este tiempo, se observó si existía o no un halo de inhibición del crecimiento alrededor del lugar donde se colocó la muestra y se procedió a medir el diámetro de este halo.

#### **2.2.3.3.5 Método de microdilución en caldo.**

El método de microdilución en caldo es un ensayo en el que se mide la mínima concentración que se requiere del compuesto que se está evaluando para producir la inhibición del crecimiento microbiano.<sup>50</sup> A diferencia del anterior, este método es cuantitativo.

Este método se llevó a cabo de la siguiente manera: luego de tener el inóculo preparado y la muestra en solución a una concentración de 8 mg/ml, se procedió a realizar diluciones seriadas con la muestra hasta tener un total de 9 diluciones más la muestra a la concentración original. Posteriormente se procedió a colocar en placas de 96 pozos 0.1 ml del inóculo y 0.1 ml de cada una de las diluciones en una disposición que permitiera probar todas las diluciones con cada uno de los inóculos. Como control positivo se emplearon celdillas que contuvieran 0.1 ml de medio de cultivo y 0.1 ml del inóculo correspondiente y como control negativo se colocaron celdillas con 0.2 ml de medio de cultivo.

#### **2.2.3.4 Evaluación de la actividad inmunomoduladora.**

##### **2.2.3.4.1 Medición de la actividad inmunomoduladora *in vivo*.**

##### **Técnica de Cunningham.**

Para la evaluación del efecto de los extractos sobre la respuesta del sistema inmune se utilizaron ratones BALB/c. Esta técnica de Cunningham se basa en la medición del aumento de células formadoras de anticuerpos-IgM, luego de la inmunización de los ratones con un antígeno

timodependiente (glóbulos rojos de carnero) y de la administración de una sustancia capaz de aumentar la producción de este tipo celular. Esto se evaluó de acuerdo con la técnica de Jerne modificada por Cunningham.<sup>51</sup>

#### **2.2.3.4.1.1 Administración de muestras a evaluar e inmunización.**

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c machos, separados en grupos, con un  $n = 4$  para cada grupo. Una dosis única de 40 mg/kg de peso corporal de cada una de las muestra a evaluar, se administró mediante una sonda orogástrica a cada uno de los ratones, luego de un ayuno de 6 horas. Posteriormente, se procedió a inmunizarlos, administrando vía i.p. 0.2 ml de una solución al 10% de glóbulos rojos de carnero (ver apéndice B).

Se establecieron 2 grupos extras, que fungieron como control positivo y negativo. Cada uno de ellos, fue tratado con:

- a) Control negativo: agua bidestilada p.o. y solución salina i.p.
- b) Control positivo: agua bidestilada p.o. y solución al 10% de eritrocitos de carnero i.p.

#### **2.2.3.4.1.2 Obtención de células de bazo.**

Luego de 72 hrs. de la inmunización, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se realizó un corte en U en la porción superior izquierda del abdomen y se extrajo el bazo, sin tejido adiposo adyacente. Cada bazo fue colocado en una caja Petri que contenía 5 ml de solución de Hanks, con pH de 7.4, y fue disgregado con pinzas de cirugía.

La suspensión celular obtenida fue disgregada por completo haciendo uso de una pipeta Pasteur, y el contenido de la celdilla fue transferido a un tubo cónico que estaba colocado en un baño de hielo. Posteriormente, el tubo con la suspensión celular se dejó sedimentar durante 5 min a 4°C, con el objetivo de eliminar detritus celulares, y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Luego, este tubo fue llevado a centrifugar por 5 min a una temperatura de 4°C a 2400 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 10ml de solución de Hanks. Se repitió el lavado por 3 veces. Luego del segundo lavado, las células se resuspendieron en 10ml de la solución de Hanks y se tomaron 2 alícuotas de 0.1ml del tubo. La primera alícuota se colocó en 0.9 ml de azul de tripano al 0.4% en solución salina para medir viabilidad celular; la segunda se empleó para mezclarse con 0.9 ml de una solución de ácido acético al 2%, se agitó en vórtex y se tomaron 10  $\mu$ l para colocarlos en una cámara de Neubauer, con el objetivo de hacer un conteo celular. La cámara con la muestra se dejó sedimentar por un minuto y se determinó la concentración celular. La suspensión celular se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores; después del tercer lavado, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 10ml de la solución de Hanks. La densidad celular se ajustó a  $5 \times 10^6$  cel/ml con medio RPMI suplementado al 5% con SFB.

#### **2.2.3.4.1.3 Llenado de cámaras y conteo de CFA- IgM.**

En un tubo de ensayo se colocaron 200µl de la solución de células de bazo previamente ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  cel/ml, provenientes de los ratones inmunizados y que recibieron las muestras a evaluar, junto con los controles positivos y negativos; posteriormente se agregó a cada tubo 200µl del sistema indicador (apéndice A) para la determinación de CFA-IgM. Cada tubo se agitó en vórtex y se tomaron 150 µl de cada muestra para llenar cada cámara previamente etiquetada.

Cada cámara se selló por sus extremos con parafina derretida y se incubaron a 37°C durante una hora; después de la incubación se contaron las placas hemolíticas haciendo uso de un microscopio de bajo poder de iluminación adaptado con una placa de vidrio cuadrículada para facilitar la cuenta.

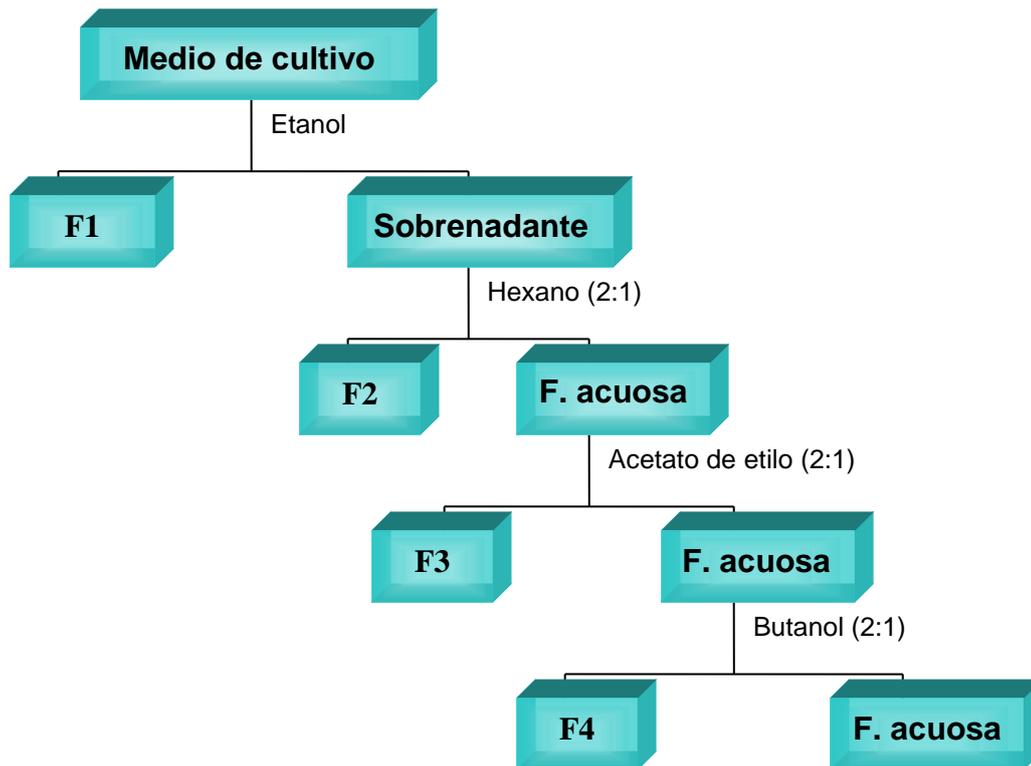
La construcción de las cámaras de Cunningham y los cálculos para la determinación del número de CFA-IgM se describe en el Apéndice A.

#### **2.2.4 Obtención de las fracciones del medio de cultivo que mostró mayor actividad.**

Ya que las muestras de medio de cultivo de las 10 especies a los 4 tiempos de incubación fueron evaluadas, se seleccionó la cepa que mostró mayor actividad para su fraccionamiento biodirigido.

Luego de separar el medio de cultivo de la biomasa por filtración, se llevó a cabo el fraccionamiento mediante la utilización de solventes de distinta polaridad; se inició con una precipitación con etanol durante 24 h, al cabo de este tiempo, se separó el precipitado del sobrenadante; el precipitado se dejó secar y ésta fue denominada fracción 1 (F1).<sup>52</sup>

Al sobrenadante se le realizaron extracciones sucesivas con distintos solventes: se inició con hexano, se continuó con acetato de etilo y finalmente se utilizó butanol. Las extracciones con cada solvente se realizaron tres veces y cada fase orgánica se hizo pasar a través de sulfato de sodio anhidro. Cada una de las 3 fracciones así obtenidas (F1, F2, F3) se llevó a sequedad en rotavapor, se recuperó con un solvente, se colocó en un tubo Eppendorf y se llevó a sequedad con nitrógeno. Las fracciones obtenidas se almacenaron a -4°C mientras fueron evaluadas. (Figura 6).



**Figura 6.** Marcha para el fraccionamiento del medio de cultivo.

### 2.2.5 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV.

Para cada una de las fracciones se evaluaron los siguientes parámetros de actividad biológica:

**Actividad antioxidante:** Mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA).

**Actividad antimicrobiana:** Mediante el método de microdilución en caldo.

**Actividad inmunomoduladora:** Técnica de Jerne, modificada por Cunningham.

**Citotoxicidad:** Mediante la técnica del MTT.

La metodología utilizada para evaluar la actividad biológica de estas fracciones fue la misma que se describió anteriormente para la evaluación de las muestras de medio de cultivo de las 10 cepas de basidiomicetos.

## **2.2.6 Rastreo fitoquímico preliminar.**

### **2.2.6.1 Determinación de proteínas.**

La medición de proteínas se efectuó mediante el método de Lowry.<sup>53</sup> Este método se basa en la formación de un complejo coloreado con las proteínas, que puede ser medido espectrofotométricamente a una  $\lambda$  de 750 nm.

La reacción se lleva a cabo en dos etapas:

- a) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas, formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Esto provoca un desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, dando lugar a la exposición de los residuos fenólicos de tirosina que participarán en la segunda fase de la reacción.
- b) La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, también en medio alcalino, por acción de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina. El principal constituyente de este reactivo es el ácido fosfomolibdotúngstico, que al ser reducido, forma una serie de óxidos azules de tungsteno y molibdeno.

#### **2.2.6.1.1 Preparación de la muestra a analizar.**

La muestra de medio de cultivo liofilizado se disolvió en agua a una concentración de 0.125 mg/ml.

#### **2.2.6.1.2 Medición de proteínas totales.**

Se preparó una solución stock de albúmina a una concentración de 100 µg/ml. Se prepararon la solución C y el reactivo de Folin-Ciocalteu (ver apéndice B). Se elaboró una curva de calibración con distintas concentraciones de albúmina, se preparó la muestra en otro tubo y se le añadió agua hasta completar 1ml; posteriormente, se agregó la solución C, se agitó en vórtex y se dejó reposar por 15 min. Se añadió el reactivo de Folin a cada tubo, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 20 min; pasado este tiempo se leyó espectrofotométricamente a una  $\lambda$  de 750 nm.

#### **2.2.6.2 Determinación de carbohidratos.**

Para lograr la determinación del contenido de carbohidratos en la muestra, se llevó a cabo la técnica de fenol-sulfúrico.<sup>54</sup> Esta técnica se basa en la formación de furfural, como consecuencia de la deshidratación de los carbohidratos en presencia de ácido sulfúrico y la posterior condensación con fenoles, dando como productos compuestos de color intenso que son medidos espectrofotométricamente a una  $\lambda$  de 490 nm.

### **2.2.6.2.1 Preparación de las muestras a evaluar.**

Se preparó una solución en agua a una concentración de 0.25 mg/ml de la muestra de medio de cultivo liofilizado.

### **2.2.6.2.2 Medición de contenido de carbohidratos.**

Se preparó un estándar de glucosa a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y una solución de fenol al 5%. Se preparó una curva de calibración con distintas cantidades del estándar de glucosa; se preparó un tubo con la muestra. A cada tubo se le añadió agua –hasta completar 100  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$  de fenol y 2.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Posteriormente, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar durante 30 min. a temperatura ambiente y se procedió a efectuar la lectura en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 490 nm.

### **2.2.6.3 Determinación de fenoles totales.**

Esta medición se realizó según el método de Folin- Denis descrito por Singleton.<sup>55</sup> Se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{HW}_{12}\text{O}_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), por acción de fenoles, y formando una mezcla de óxidos azules de tungsteno ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y de molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). La coloración azul produce una absorbancia máxima a 750 nm.

#### **2.2.6.3.1 Preparación de las muestras a evaluar.**

La muestra se preparó en solución a una concentración de 5 mg/ml, antes de proceder a la medición.

#### **2.2.6.3.2 Medición de fenoles totales.**

Se procedió a elaborar una curva de calibración con ácido gálico, con concentraciones que fueran de 0 a 500 µg/ml de ácido gálico. De cada estándar o de la muestra se tomaron 40 µl, se les agregó 3.16 ml de agua destilada y 200 µl del reactivo de Folin- Ciocalteu; se dejaron reposar por 2 minutos, al cabo de los cuales, se agregaron 600 µl de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para alcalinizar; se agitaron en vórtex y se dejaron incubando a 25°C durante 2 horas. Cumplido este tiempo, se procedió a efectuar la lectura espectrofotométrica a una  $\lambda$  de 765 nm. El resultado se expresa como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

#### **2.2.6.4 Rastreo fitoquímico cualitativo.**

Dentro de este rastreo se efectuaron reacciones cualitativas que, mediante un cambio de coloración o la formación de un precipitado colorido, dieron un resultado positivo para indicar la presencia de un determinado grupo de compuestos.<sup>56</sup>

Las reacciones que se llevaron a cabo para cada grupo de sustancias fueron las siguientes:

➤ Alcaloides:

Se llevó a cabo la prueba de Dragendorff, Mayer y Wagner.

➤ Flavonoides:

Se llevó a cabo la reacción de Shinoda (Mg y HCl).

➤ Taninos:

Se efectuó la prueba con  $\text{FeCl}_3$  al 10% y la prueba de confirmación de la gelatina y sal.

➤ Saponinas:

Se efectuó la prueba de formación de espuma.

➤ Triterpenos y/o esteroides.

Se llevó a cabo la reacción de Liebermann-Burchard.

### **2.2.7 Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA y se estableció un valor de  $p < 0.05$  para establecer una diferencia significativa.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Material fúngico.**

##### **3.1.1 Obtención de cepas para el estudio.**

La figura 7 muestra el aspecto de los carpóforos de las cepas evaluadas, a partir de los cuales se aislaron y purificaron cada una de las cepas que se estudiaron; estas cepas fueron clasificadas taxonómicamente y registradas en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L., campus Linares.



A



B



C



D



E



F



G



H



I



J

**Figura 7.** Aspecto de carpóforos de basidiomicetos: A. *Ganoderma* sp, B. *G. applanatum*, C. *G lobatum*, D. *Coriolus versicolor* E. *Lentinus lepideus*, F. *Calvatia cyathiformis*, G. *Suillus luteus*, H. *Suillus lakei*, I. *Armillaria tabescens*, J. *Armillaria mellea*.

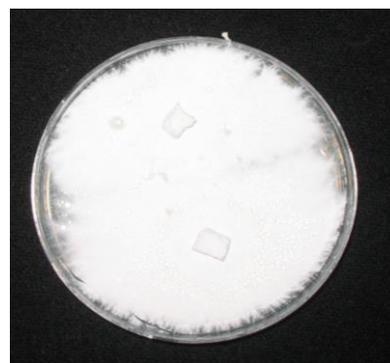
### 3.2 Crecimiento *in vitro* de los basidiomicetos.

#### 3.2.1 Crecimiento de cepas en medio sólido.

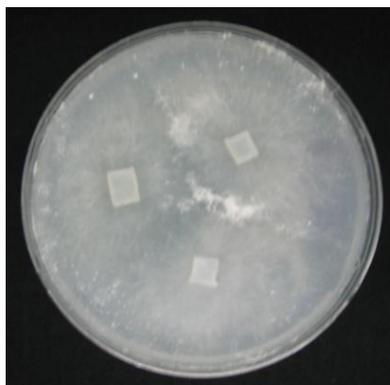
A partir del cultivo puro, se procedió a la obtención de biomasa para inocular el medio líquido. Cada una de las 10 cepas de estudio se dejó crecer aproximadamente 2 semanas en medio sólido modificado de Melin Norkrans. El crecimiento bajo las condiciones de incubación fue óptimo para todas ellas; aunque cada una conservó sus características de desarrollo. (Figura 8).



a) *Ganoderma sp*



b) *Ganoderma applanatum*



c) *Ganoderma lobatum*



d) *Coriolus versicolor*



e) *Lentinus lepideus*



f) *Calvatia cyathiformis*



g) *Suillus luteus*



h) *Suillus lakei*



i) *Armillaria tabescens*.

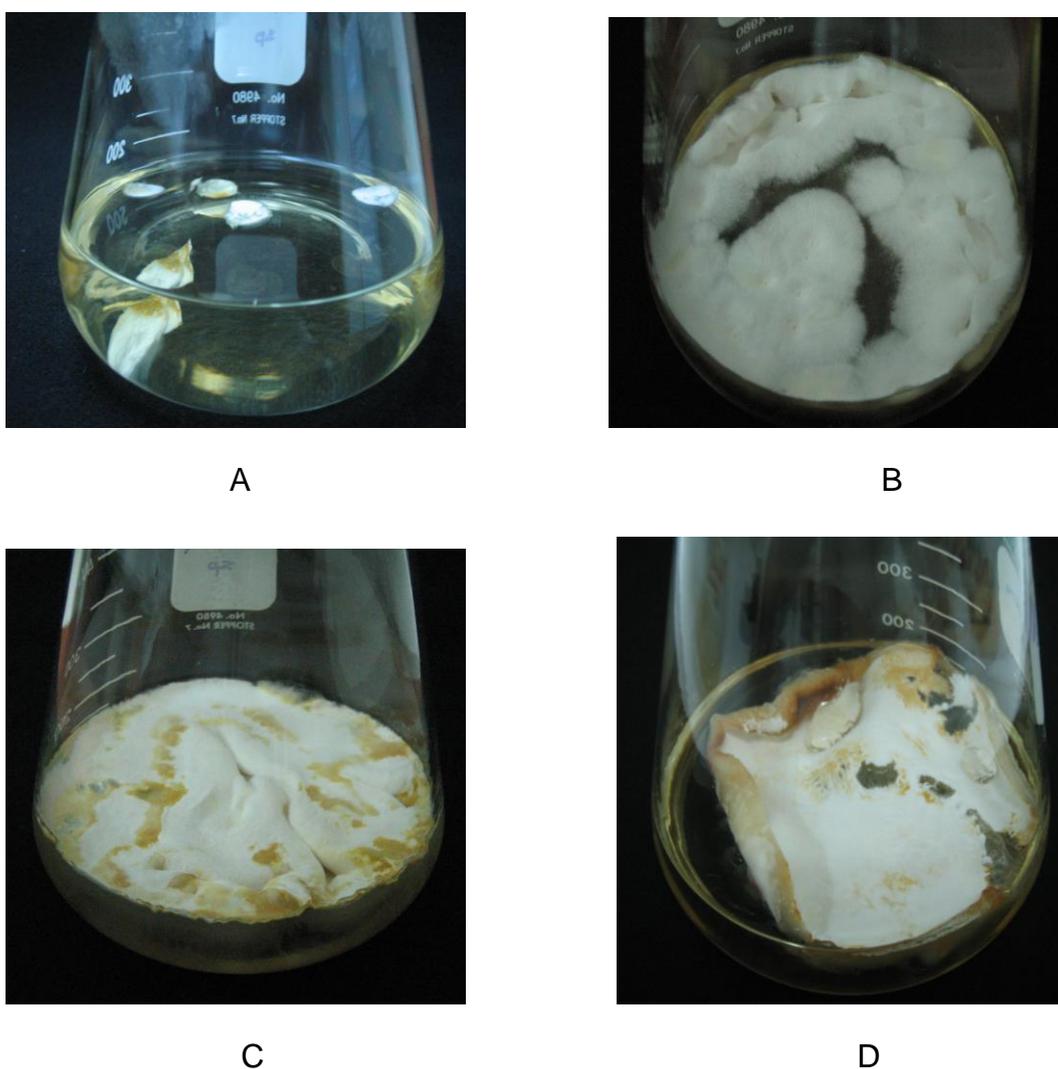


j) *Armillaria mellea*.

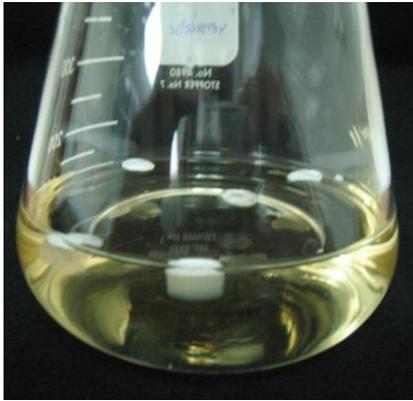
**Figura 8.** Aspecto del crecimiento de las cepas de basidiomicetos en medio sólido.

### 3.2.2. Crecimiento de cepas en medio líquido.

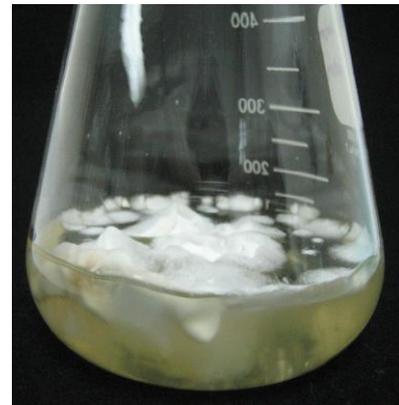
Las cepas se sembraron en medio líquido modificado de Melin Norkrans ajustado a pH de 6.5. Bajo estas condiciones, se obtuvo un buen crecimiento de las diez especies de macromicetos. Las figuras 9-18 muestran el aspecto, tanto de la biomasa como del medio de cultivo a los 4 tiempos (basal, una semana, un mes y dos meses) en los que se tomaron las muestras para la evaluación de la actividad biológica.



**Figura 9.** Aspecto del crecimiento de *Ganoderma sp.* Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



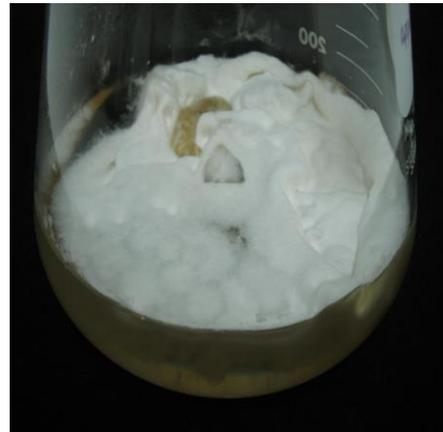
A



B

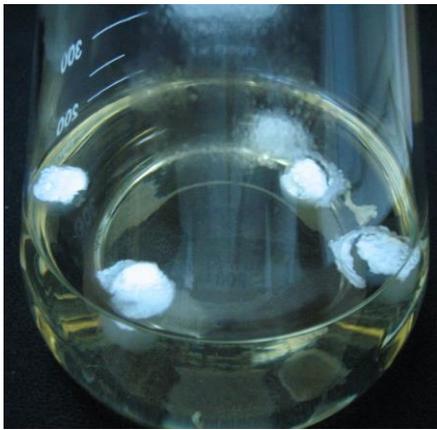


C

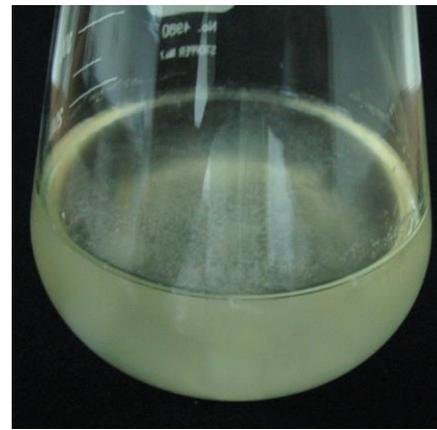


D

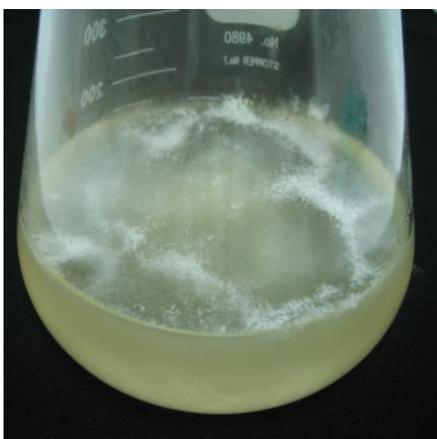
**Figura 10.** Aspecto del crecimiento de *Ganoderma applanatum*.  
Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



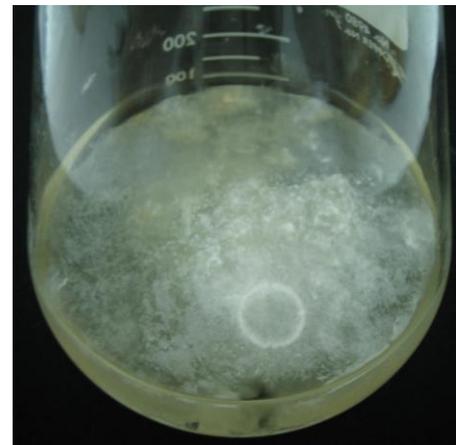
A



B

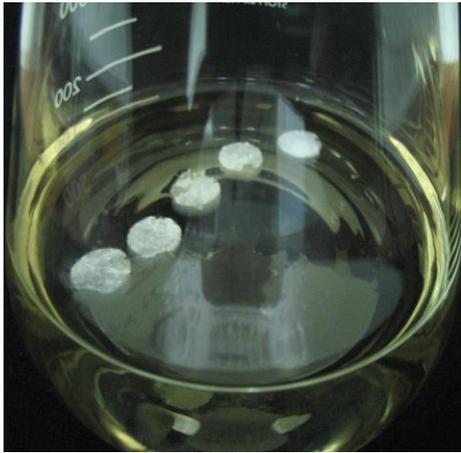


C



D

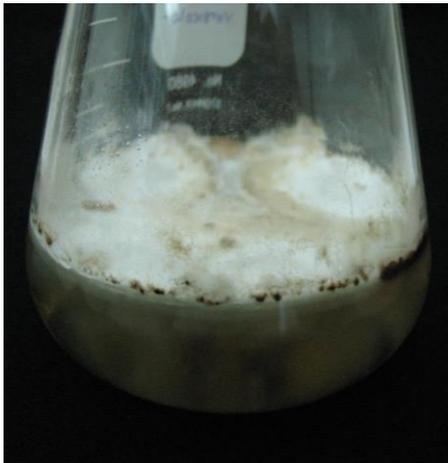
**Figura 11.** Aspecto del crecimiento de *Ganoderma lobatum*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



A



B



C

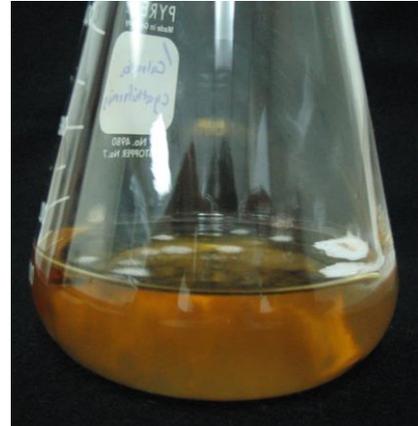


D

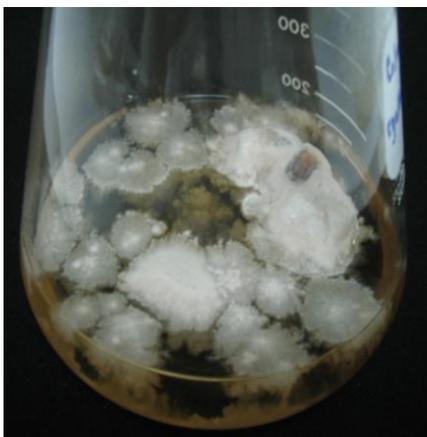
**Figura 12.** Aspecto del crecimiento de *Coriolus versicolor*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



A



B

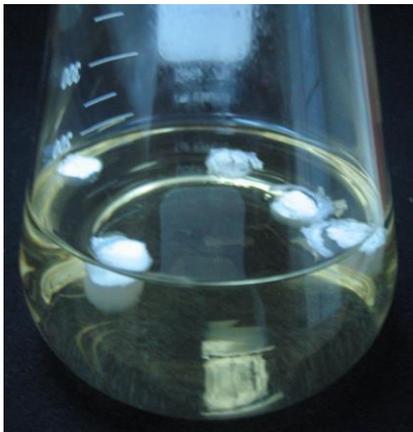


C

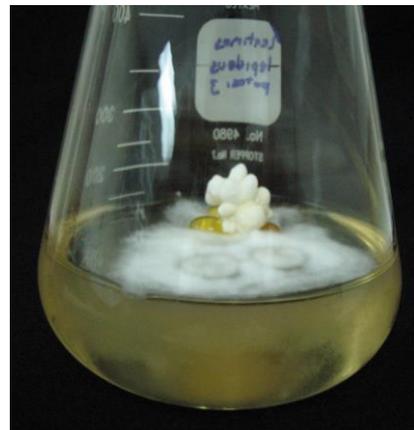


D

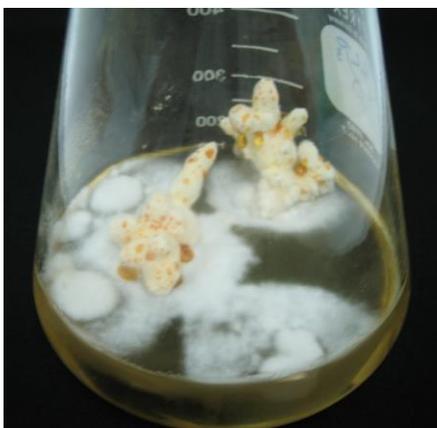
**Figura 13.** Aspecto del crecimiento de *Calvatia cyathiformis*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



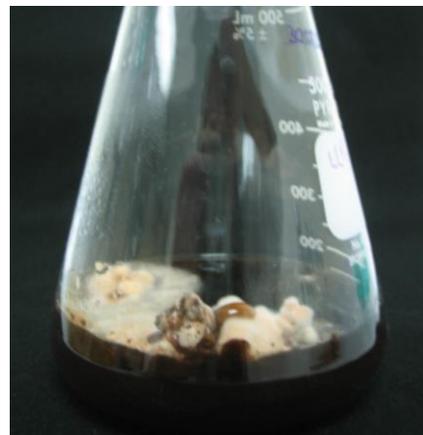
A



B

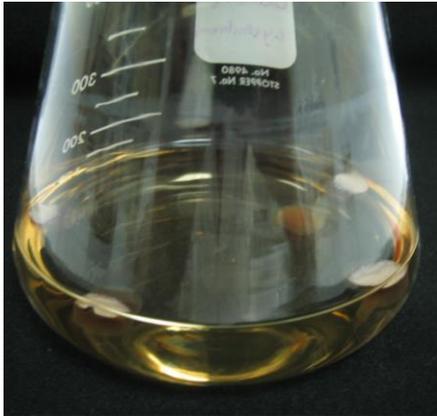


C

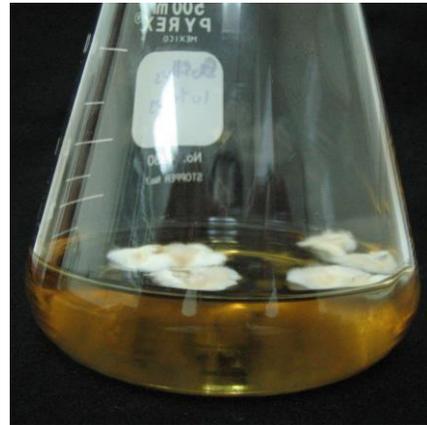


D

**Figura 14.** Aspecto del crecimiento de *Lentinus lepideus* . Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



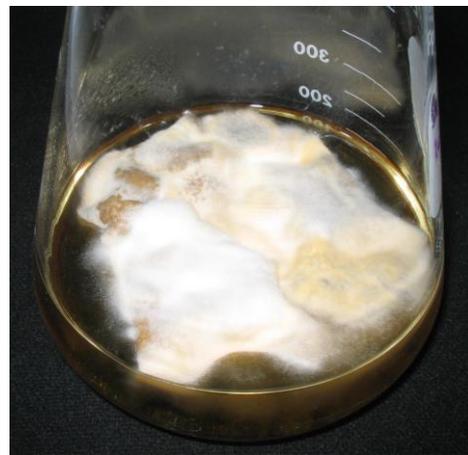
A



B

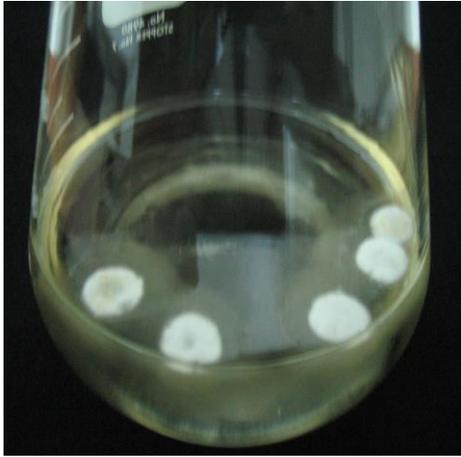


C

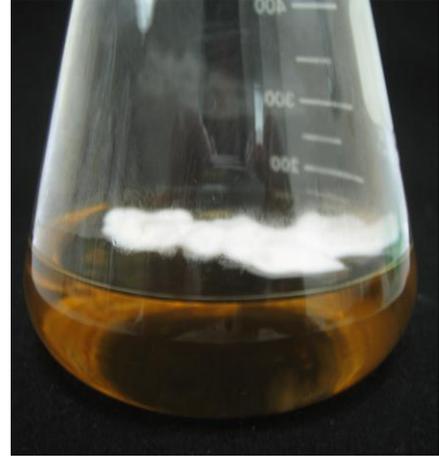


D

**Figura 15.** Aspecto del crecimiento de *Suillus luteus*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



A



B

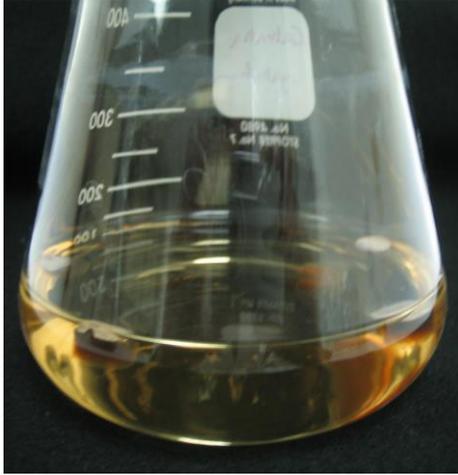


C



D

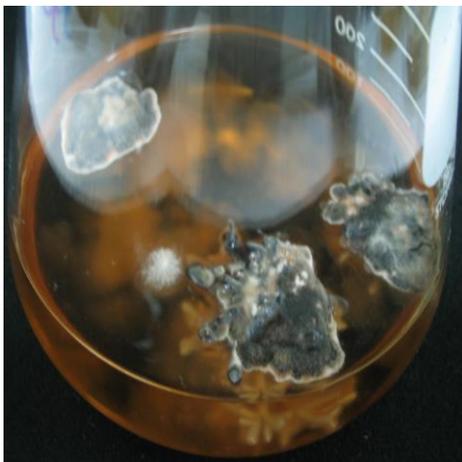
**Figura 16.** Aspecto del crecimiento de *Suillus lakei*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



A



B



C

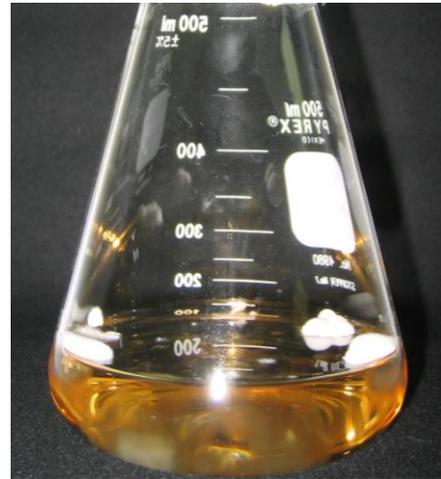


D

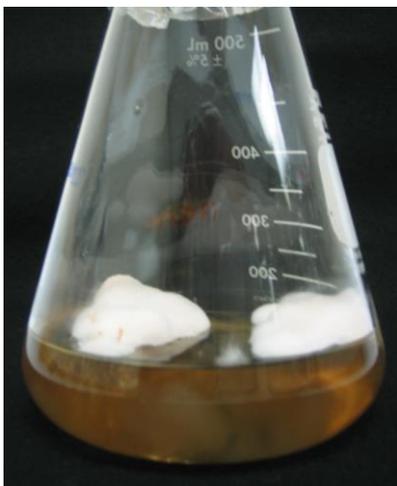
**Figura 17.** Aspecto del crecimiento de *Armillaria mellea*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.



A



B



C



D

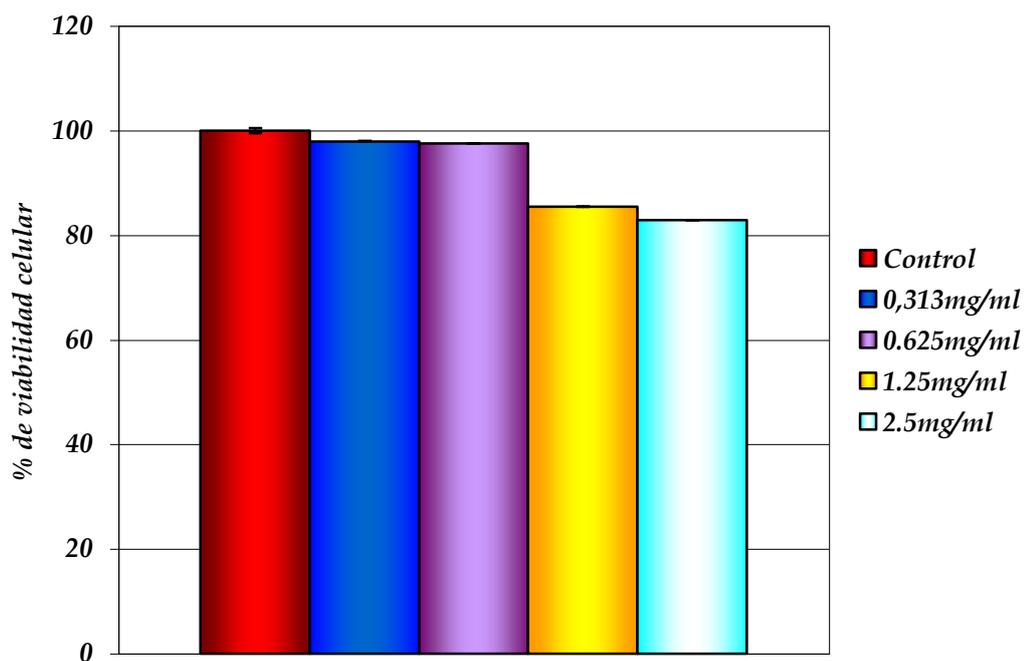
**Figura 18.** Aspecto del crecimiento de *Armillaria tabescens*. Tiempos de crecimiento: A. Basal; B. Una semana; C. Un mes; D. Dos meses.

### **3.3 Actividad biológica de las muestras de medio de cultivo.**

Se evaluó la actividad biológica (citotoxicidad, actividad antioxidante y antimicrobiana) de las diez cepas de basidiomicetos obtenidas a cuatro tiempos distintos de crecimiento: basal, una semana, un mes y dos meses. La actividad inmunomoduladora se evaluó en las dos cepas que presentaron mayor actividad, en el tiempo en el que se consideró podrían tener una mayor producción de metabolitos secundarios activos. Los tiempos de toma de muestra fueron establecidos tomando en consideración el tiempo basal, tiempo en el cual no debe presentarse ninguna actividad, ya que el microorganismo apenas estará adaptándose al nuevo ambiente, una semana, tiempo corto en el que se podría presentar algún metabolito temprano, y uno y dos meses como tiempos largos, ya que el metabolismo del hongo durante la fase inicial se concentra en su propio crecimiento, y es hasta que se agotan los nutrientes, cuando se activan las enzimas que forman parte de las rutas metabólicas secundarias del organismo.

#### **3.3.1 Citotoxicidad.**

Se evaluaron las 10 cepas de basidiomicetos, en los cuatro tiempos de crecimiento, en un rango de concentración de 10 mg/ml a 0.33 mg/ml. Ninguna de las muestra evaluadas fue citotóxica. Solo *Suillus lakei* produjo una reducción del 20% de la viabilidad celular y esto únicamente con la concentración de 2.5 mg/ml. (Figura 19).

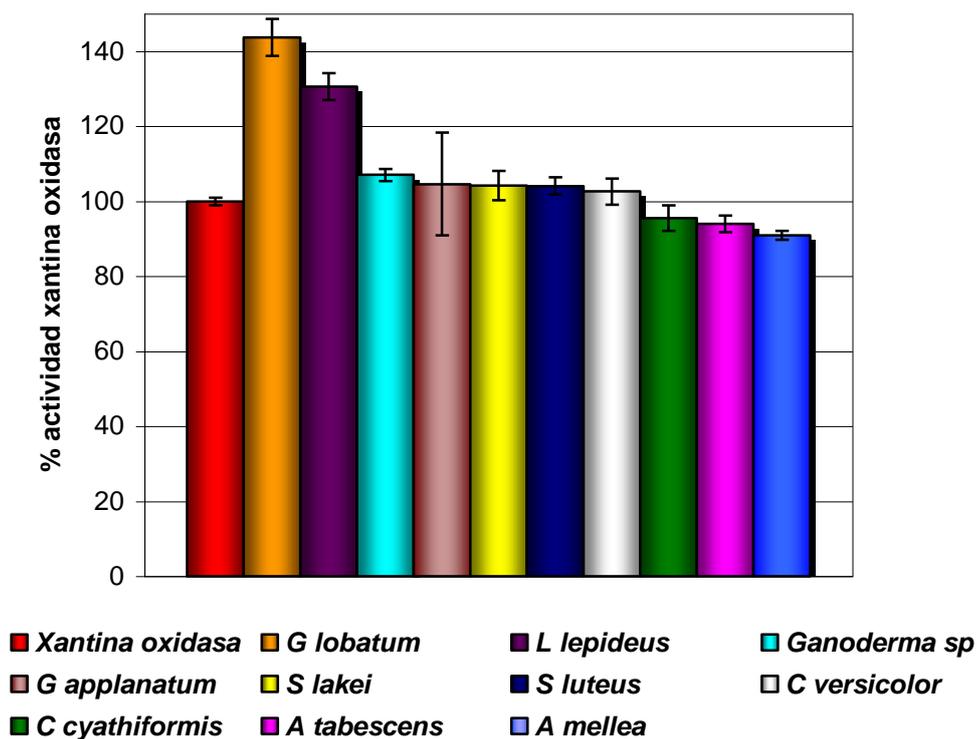


**Figura 19.** Disminución de viabilidad celular (Prueba de reducción de MTT) producida por la muestra de medio de cultivo de 2 meses de *S lakei*, a distintas concentraciones.

### 3.3.2 Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se evaluó cada hora durante seis horas en las muestras de las 10 cepas de basidiomicetos, en un rango de dosis de 10 mg/ml a 0.313 mg/ml, a los cuatro tiempos de cultivo establecidos.

Con las muestras de medio de cultivo de tiempo basal no se observó diferencia significativa con respecto al control.

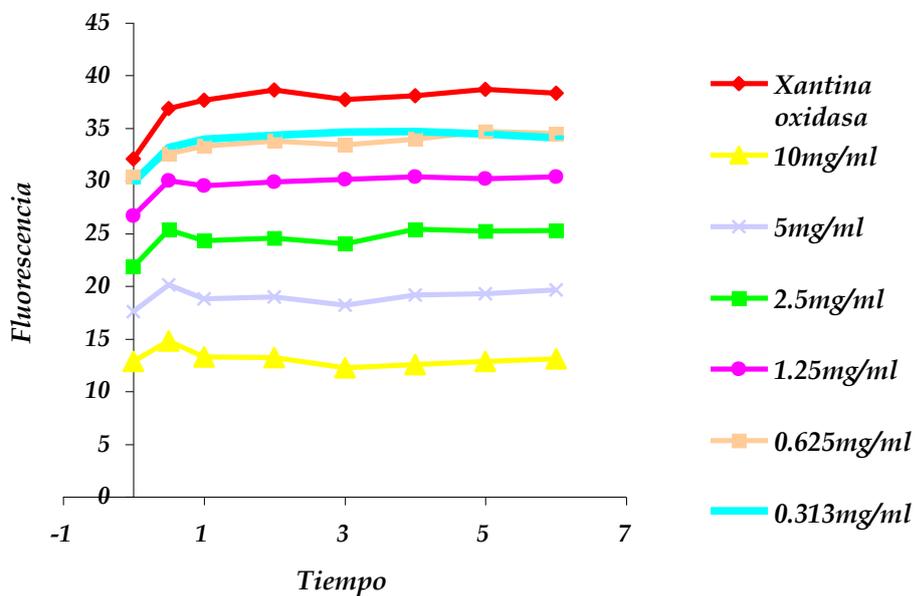


**Figura 20.** Actividad antioxidante de las muestras de medio de cultivo de una semana de crecimiento de las 10 cepas de basidiomicetos, a una concentración de 10 mg/ml.

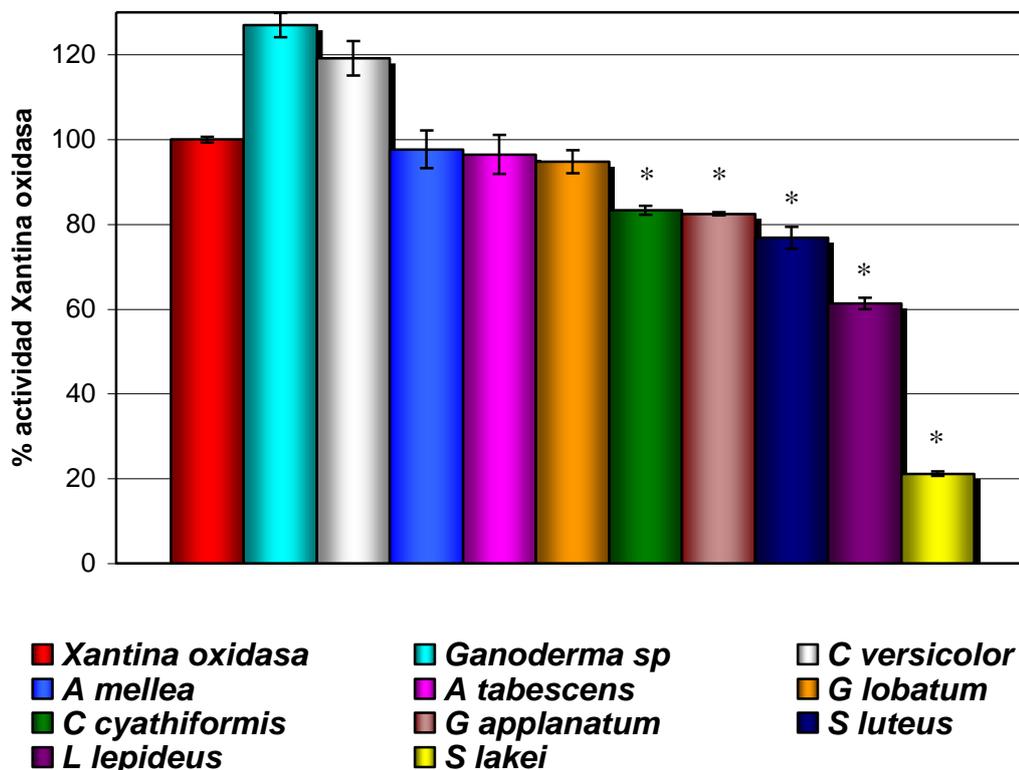
Las muestras de medio de cultivo de una semana de crecimiento no produjeron actividad antioxidante. La muestra de *Ganoderma lobatum* produjo un aumento en la actividad de xantina oxidasa de un 40% con relación al control. (Figura 20).

En las muestras que produjeron actividad antioxidante se observó que ésta inició a los 30 min. de exposición a las muestras de basidiomicetos y tuvo un incremento a la hora, para luego mantenerse constante durante las seis horas de evaluación. En todos los casos la actividad antioxidante fue directamente proporcional a la dosis. La figura 21 muestra la actividad

antioxidante producida por *Lentinus lepideus* de dos meses de crecimiento, evaluada en seis concentraciones.



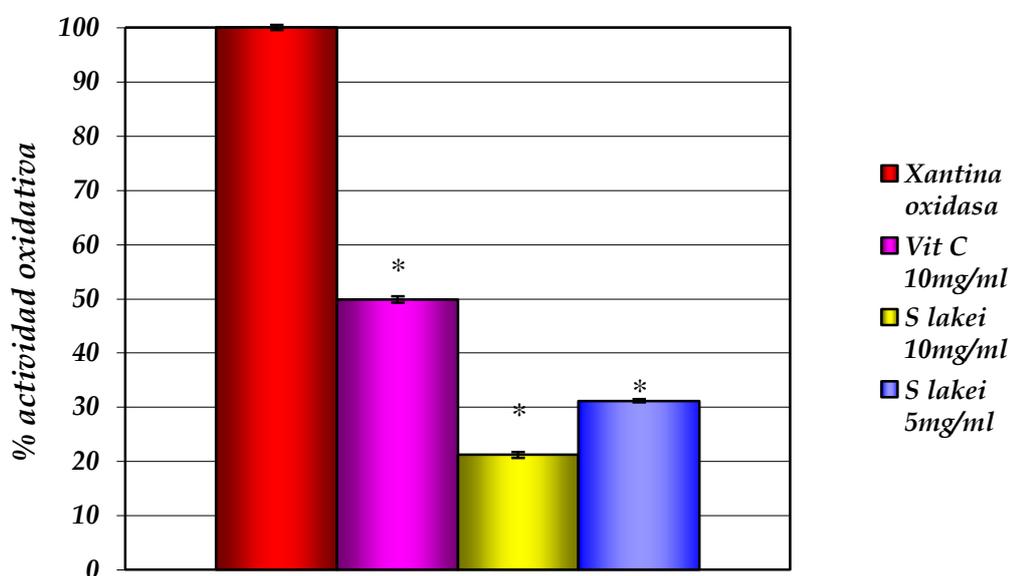
**Figura 21.** Actividad antioxidante de *L. lepideus* en relación con el tiempo y con las distintas concentraciones evaluadas.



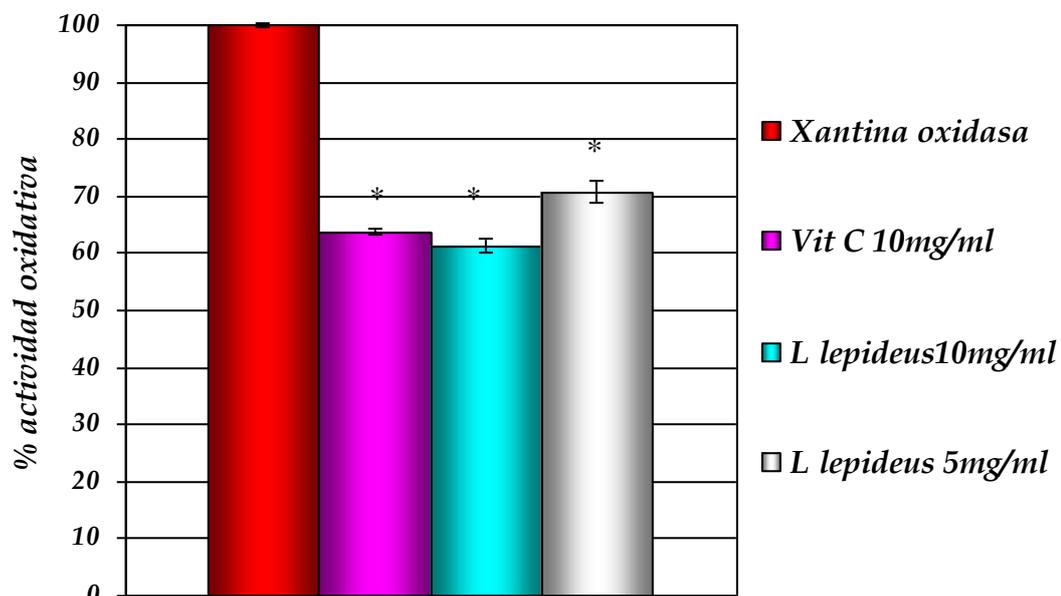
**Figura 22.** Actividad antioxidante de muestras de medio de cultivo de un mes de crecimiento de las 10 cepas de basidiomicetos a una concentración de 10 mg/ml. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

En las muestras de medio de cultivo de un mes de crecimiento se observó una importante actividad antioxidante, al reducirse en un 25%, 40% y 80% la actividad oxidativa de la xantina oxidasa por las muestras de *Suillus luteus*, *Lentinus lepideus* y *Suillus lakei*, respectivamente. Las muestras de *Ganoderma applanatum* y *Calvatia cyathiformis* produjeron una reducción del 20%. (Figura 22). Para las muestras más activas se realizó la prueba de DCFDA comparando su actividad antioxidante contra la de un potente antioxidante ya conocido: la vitamina C, a la misma concentración que las muestras de medio de cultivo a evaluar. Los resultados mostraron que S

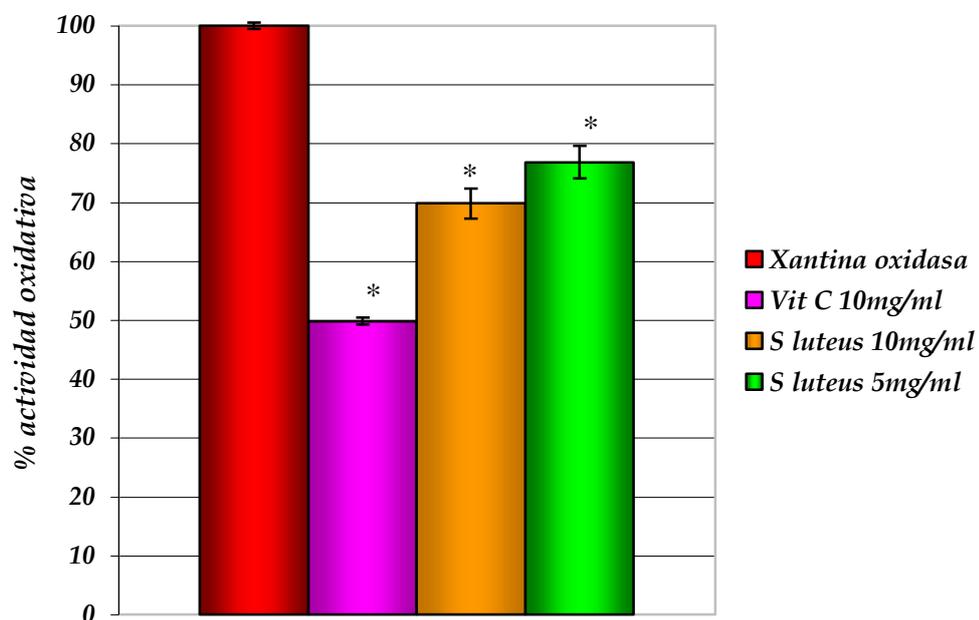
*lakei* produjo una actividad antioxidante más potente que la vitamina C a la misma concentración e incluso a concentraciones menores. (Figura 23). Por otro lado, la actividad antioxidante de *L. lepideus* fue casi igual a la de la vitamina C, al ser evaluada a la misma concentración. (Figura 24). En el caso de *S. luteus*, éste tuvo actividad antioxidante, pero no fue más potente que la vitamina C. (Figura 25).



**Figura 23.** Actividad antioxidante de muestras de *S lakei* de un mes de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

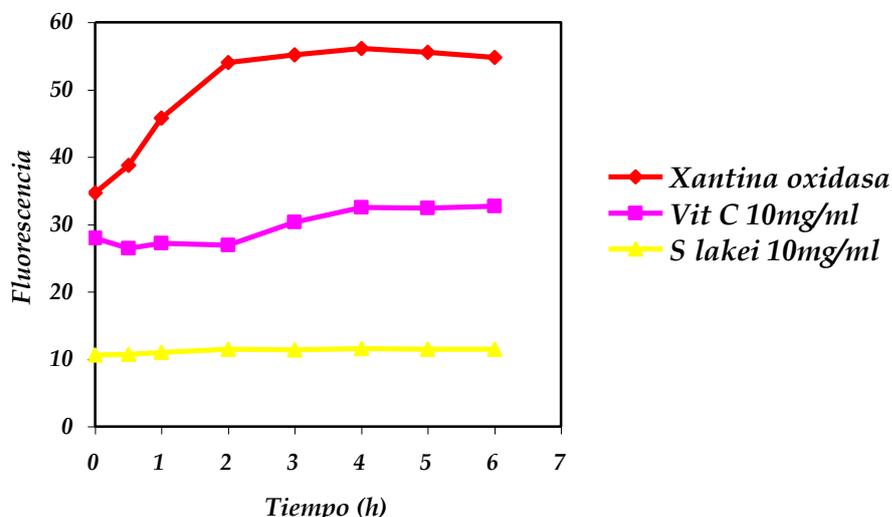


**Figura 24.** Actividad antioxidante de muestras de *L. leptideus* de un mes de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE, n=3. \*  $p < 0.05$

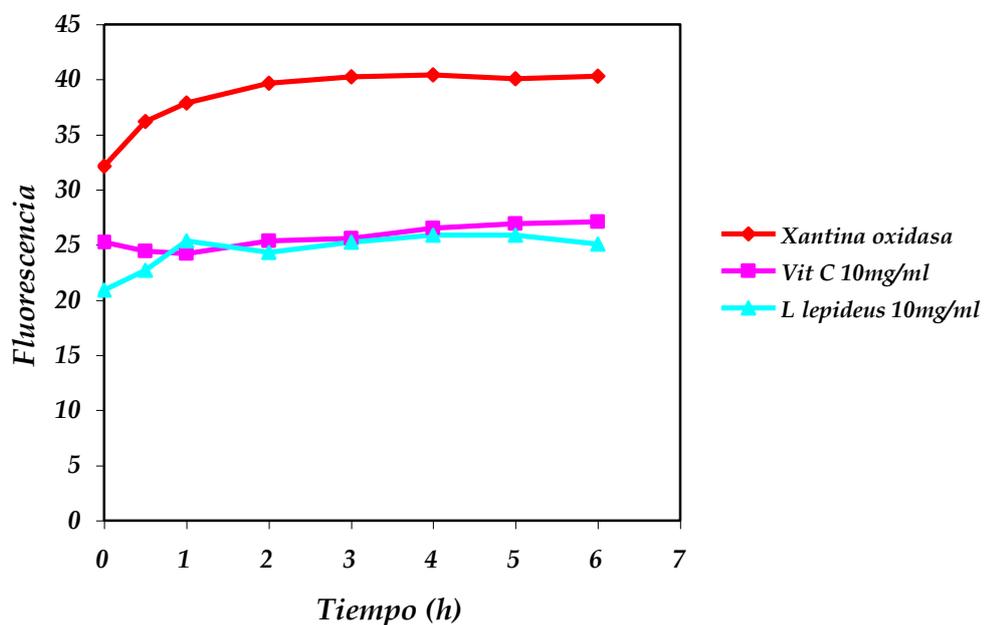


**Figura 25.** Actividad antioxidante de muestras de *S luteus* de un mes de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE, n=3. \*  $p < 0.05$

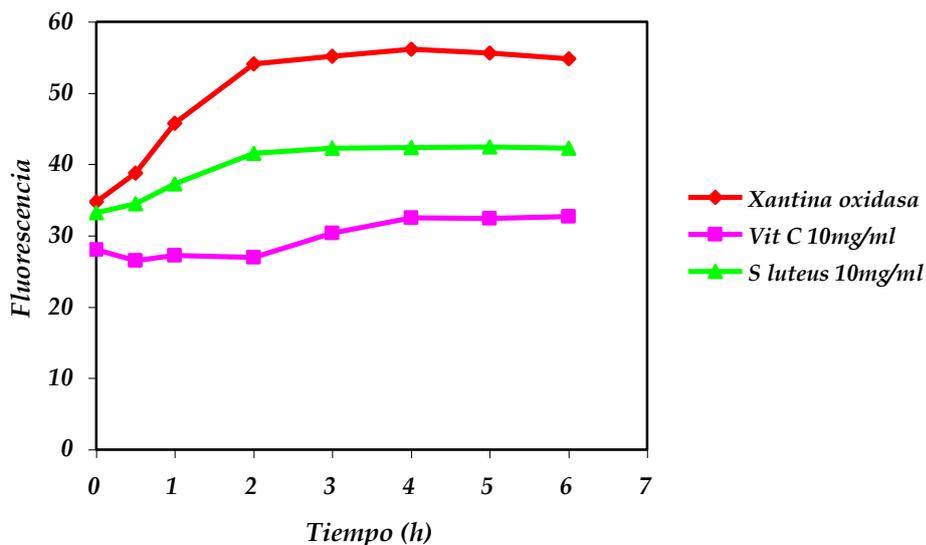
En las figuras 26, 27 y 28 se muestra el comportamiento de la actividad antioxidante de *S lakei*, *L leptideus* y *S luteus*, y de la vitamina C.



**Figura 26.** Actividad antioxidante de muestras de *S. lakei* de un mes de cultivo. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$



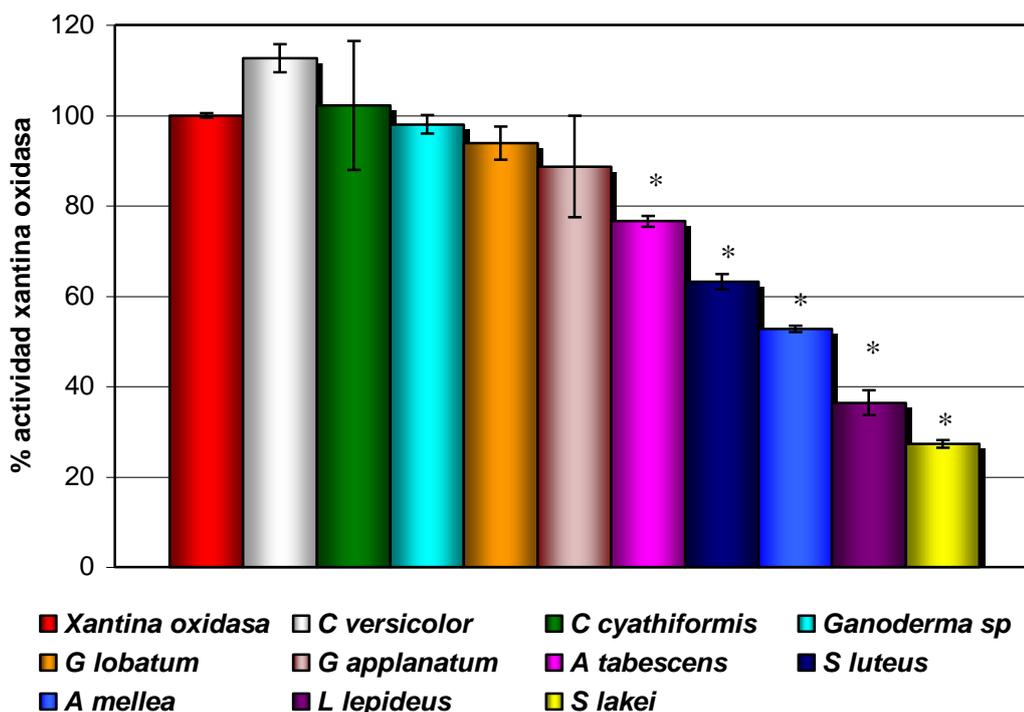
**Figura 27.** Actividad antioxidante de muestras de *L. leptideus* de un mes de cultivo. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$



**Figura 28.** Actividad antioxidante de muestras de *S. luteus* de un mes de cultivo. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

Las muestras de medio de cultivo de *Suillus luteus*, *Armillaria mellea*, *Lentinus lepideus*, y *Suillus lakei* de dos meses de crecimiento mostraron también tener actividad antioxidante significativa, al disminuir la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en un 40, 45, 65 y 75%, respectivamente. En el caso de *Armillaria tabescens*, ésta redujo la actividad de xantina oxidasa en un 25%. (Figura 29).

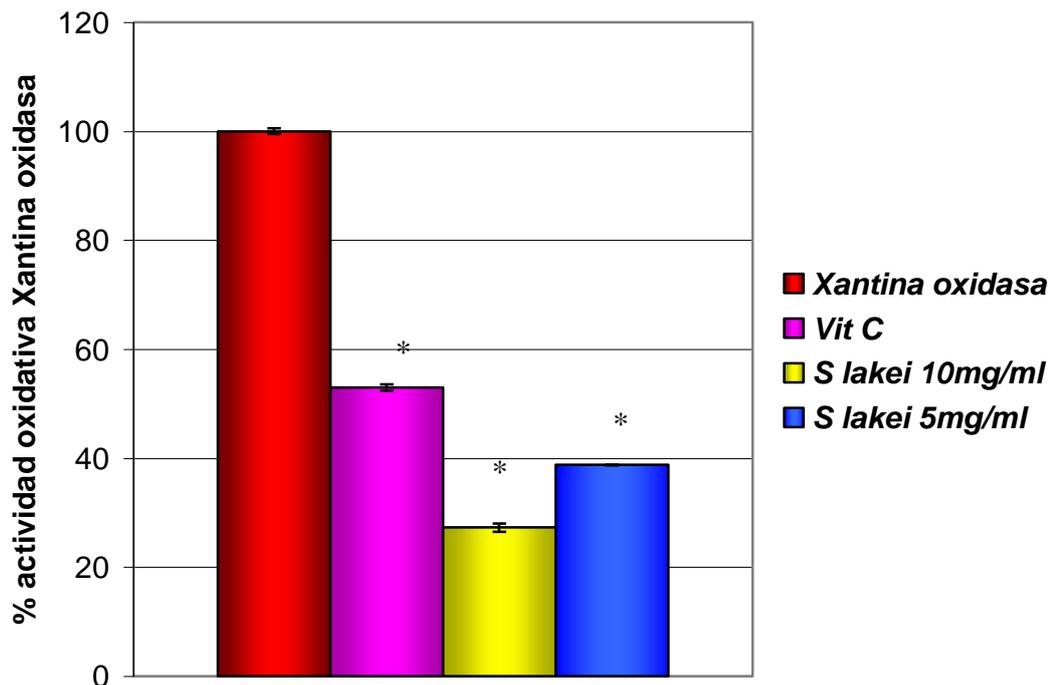
Para *A. mellea*, *L. lepideus* y *S. lakei* se comparó la actividad antioxidante contra la de la vitamina C. Al respecto se encontró que, al igual que para las muestras de un mes de crecimiento, las muestras de *S. lakei* de dos meses de crecimiento produjeron un efecto antioxidante más potente que la vitamina C, a la misma concentración y aun a una concentración menor. (Figura 30).



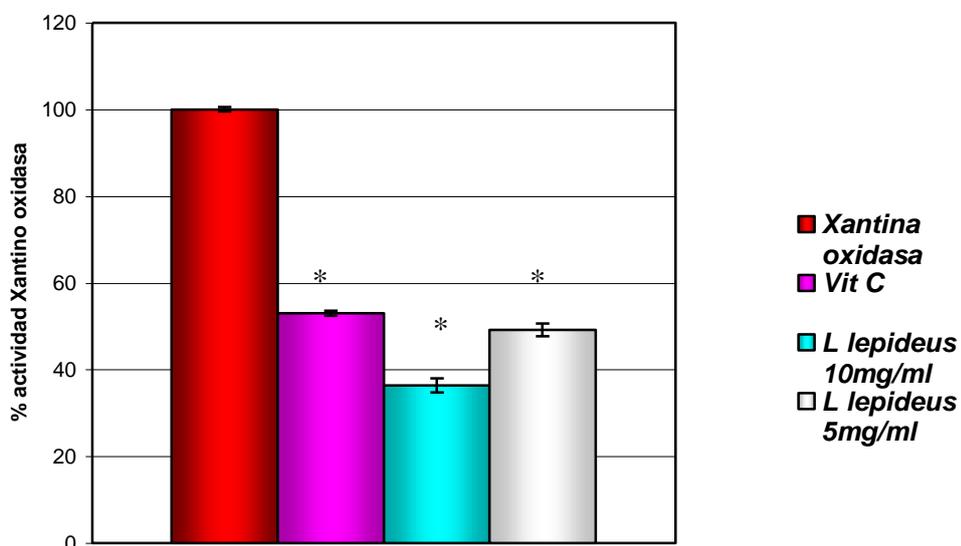
**Figura 29.** Actividad antioxidante de muestras de medio de cultivo de dos meses de crecimiento de las 10 cepas de basidiomicetos, a una concentración de 10 mg/ml. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

En el caso de las muestras de dos meses de crecimiento de *L. lepideus*, la actividad antioxidante fue también mayor que la de la vitamina C; las muestras de *A. mellea*, por otro lado, tuvieron una actividad antioxidante igual a la de la vitamina C a la misma concentración. (Figuras 31 y 32).

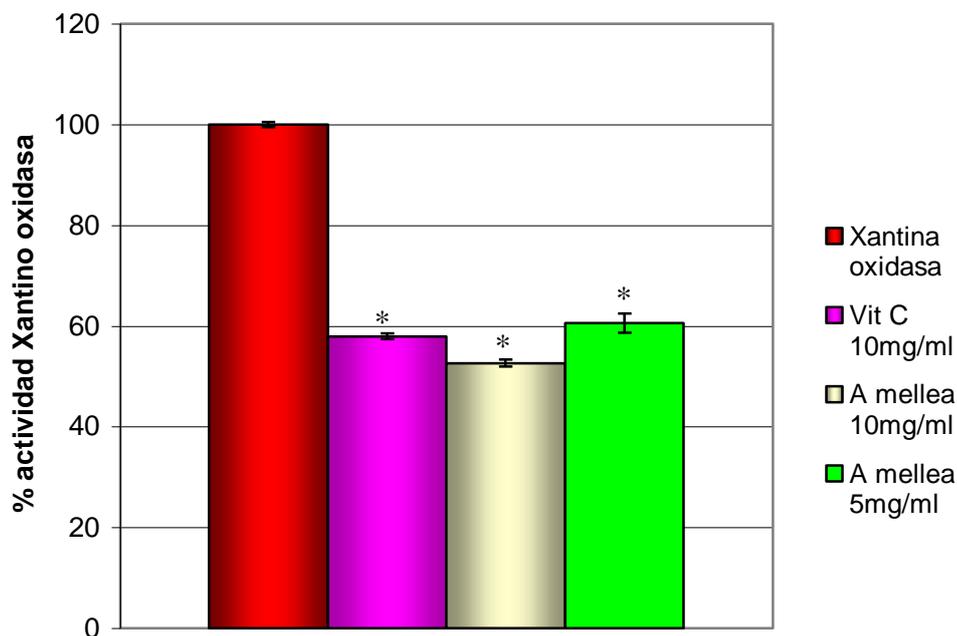
El comportamiento de la actividad antioxidante de estas cepas fue similar al mostrado por las muestras de un mes de crecimiento, es decir, la actividad antioxidante se mantuvo constante a través de las seis horas de evaluación.



**Figura 30.** Actividad antioxidante de muestras de *Suillus lakei* de dos meses de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$



**Figura 31.** Actividad antioxidante de muestras de *Lentinus lepideus* de dos meses de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$



**Figura 32.** Actividad antioxidante de muestras de *Armillaria mellea* de dos meses de cultivo, comparada con la de la vitamina C, a las dos horas de incubación. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

### 3.3.3 Actividad antimicrobiana.

En el caso de la evaluación de la actividad antimicrobiana, mediante la prueba de difusión en disco realizada para las muestras de los cuatro tiempos de cada una de las 10 cepas de basidiomicetos, ninguna de las muestras mostró poseer actividad antimicrobiana contra ninguno de los siete microorganismos probados.

Por lo anterior, se decidió evaluar las muestras utilizando la técnica de microdilución en caldo, reportada como de mayor sensibilidad. Los

resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana con esta técnica fueron los siguientes: ninguna de las muestras de tiempo basal o de una semana de crecimiento de las 10 cepas evaluadas tuvieron actividad antimicrobiana; las muestras de un mes de cultivo de *Suillus lakei*, de *Ganoderma applanatum* y de *Armillaria mellea*, resultaron activas, a la concentración más alta, contra *Sporothrix schenkii* LIID 1458. (Tabla III).

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> LIID Z-83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. smegmatis</i> LR-222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. schenkii</i> LIID 713	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. schenkii</i> LIID 1458	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

**Tabla III.** Actividad antimicrobiana de muestras de dos meses de cultivo de: 1.*C. versicolor*; 2.*L. lepideus*; 3.*Ganoderma sp*; 4.*G. applanatum*; 5.*G. lobatum*; 6.*C. cyathiformis*; 7.*S. luteus*; 8.*S. lakei*; 9.*A. mellea* 10.*A. tabescens* .

De las muestras de dos meses de cultivo, la muestra de *S. lakei* resultó activa, a la concentración más alta, contra *S. schenkii* LIID1458. Así mismo, *A. mellea* resultó activa, a la concentración más alta, contra *E. coli*, *S. aureus*, *M. smegmatis* y *S. schenkii* LIID1458. (Tabla IV).

Cepas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> LIID Z-83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. smegmatis</i> LR-222	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. schenkii</i> LIID 713	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. schenkii</i> LIID 1458	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

**Tabla IV.** Actividad antimicrobiana de muestras de dos meses de cultivo de: 1.*C versicolor*; 2.*L lepideus*; 3.*Ganoderma sp*; 4.*G applanatum*; 5.*G lobatum*; 6.*C cyathiformis*; 7.*S luteus*; 8.*S lakei*; 9.*A mellea* 10.*A tabescens* .

### 3.3.4 Actividad inmunomoduladora.

Para esta actividad, se decidió evaluar los dos basidiomicetos que tuvieron la mayor actividad antioxidante, además de tomar en consideración los reportes previos acerca de actividad inmunomoduladora de muestras de biomasa de especies de *Lentinus*.

Al respecto, *Suillus lakei* incrementó un 124% la producción de células formadoras de anticuerpos (Efecto inmunoestimulador), comparada con el control. (Tabla V).

Antígeno	CFA/millón
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	54±3
<i>Lentinus lepideus</i>	53±9
<i>Suillus lakei</i>	121±31

**Tabla V.** Número de células formadoras de anticuerpos producidas por la administración de 40 mg/kg de las muestras de *S lakei* y *L lepideus* a ratones BALB/c.

### 3.4 Fraccionamiento biodirigido.

Dado que *Suillus lakei* fue la cepa que produjo mayor actividad antioxidante, además de mostrar efecto antimicrobiano y actividad inmunomoduladora, se decidió fraccionar las muestras de dos meses de esta cepa utilizando solventes de distinta polaridad.

Se obtuvieron 4 fracciones: la fracción I, que correspondió a la obtenida por precipitación con etanol; la fracción II, que fue la fracción hexánica; la fracción III, obtenida con acetato de etilo y la fracción IV, obtenida por extracción con butanol.

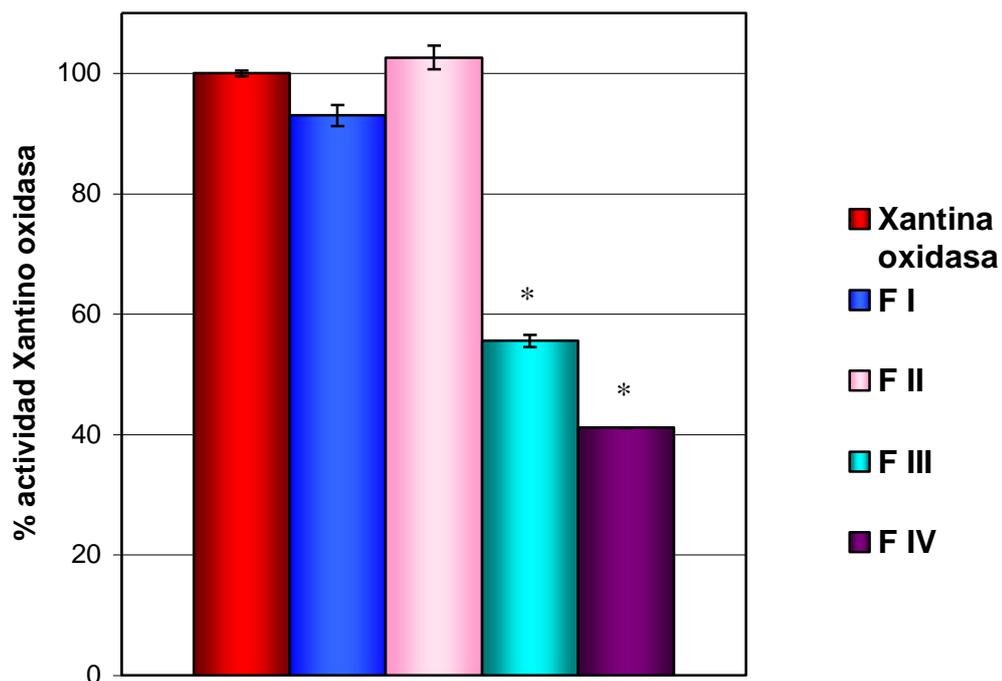
### **3.5 Actividad biológica de las fracciones.**

#### **3.5.1 Citotoxicidad.**

Al igual que para la muestra de medio de cultivo completa, ninguna de las cuatro fracciones obtenidas de *S lakei* fue citotóxica, aun a las concentraciones más altas. (1 mg/ml de cada fracción).

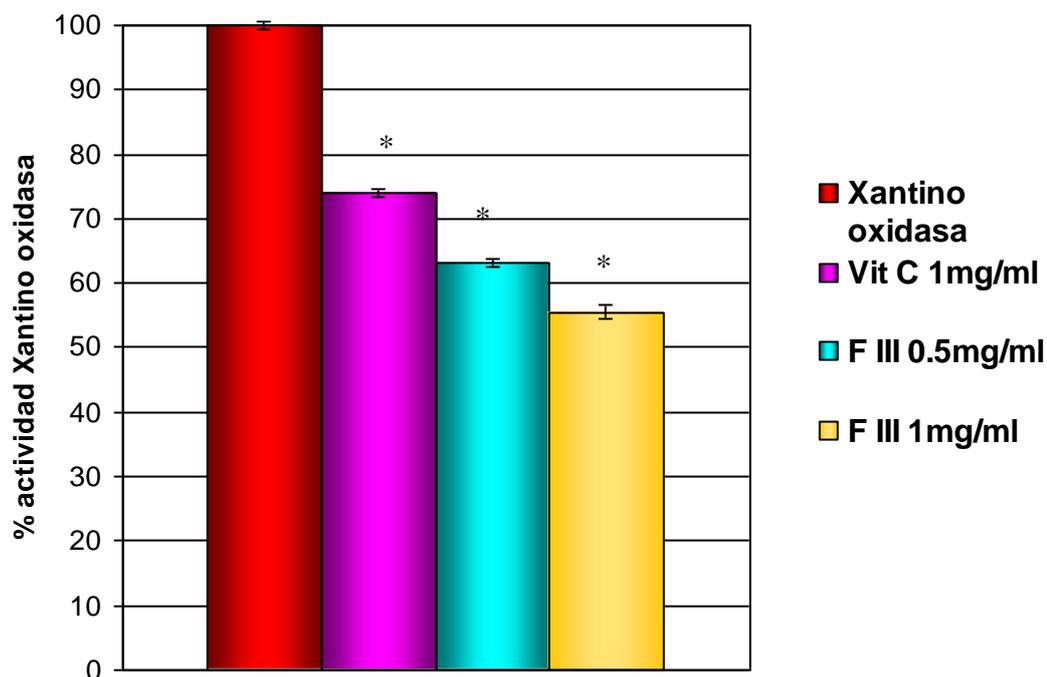
#### **3.5.2 Actividad antioxidante.**

La fracción que mostró una mayor actividad antioxidante fue la fracción butanólica (FIV), la cual redujo la actividad oxidativa de la xantino oxidasa en un 60%; la fracción FIII también mostró una importante actividad antioxidante al disminuir en un 45% la actividad de la xantino oxidasa. (Figura 33).

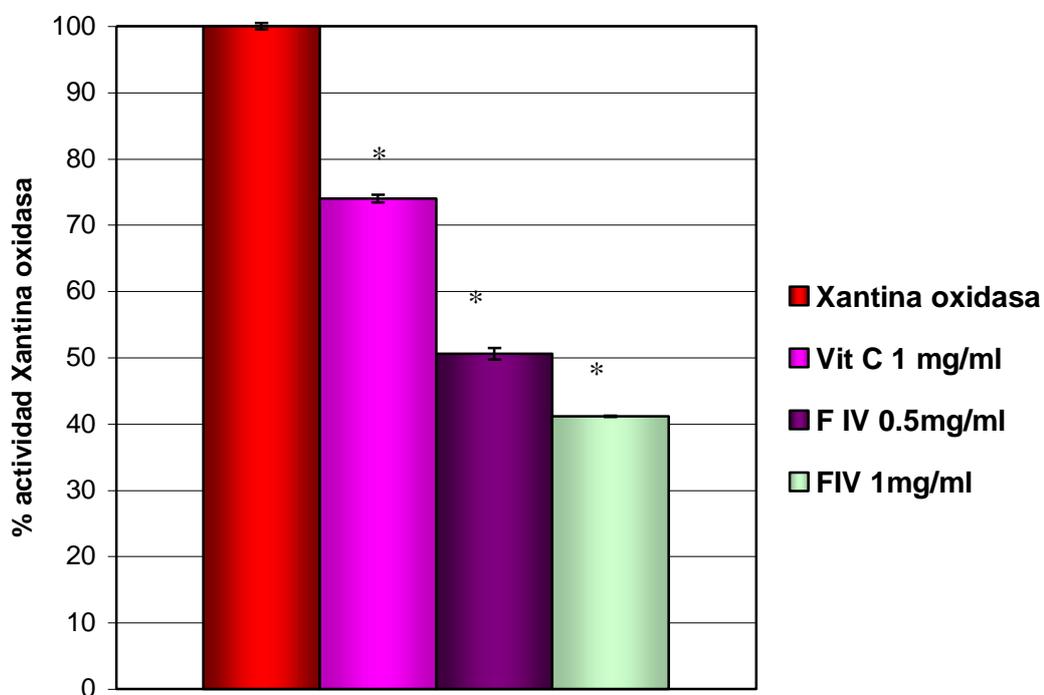


**Figura 33.** Actividad antioxidante de las cuatro fracciones obtenidas a partir de *S lakei* de dos meses de cultivo. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

Las fracciones FIII y IV fueron evaluadas comparando la actividad antioxidante de la muestra con la de la vitamina C, a la misma concentración. Ambas fracciones mostraron una actividad antioxidante mayor que la de la vitamina C, a la misma concentración y aun a la concentración de 0.5 mg/ml. (Figuras 34 y 35).



**Figura 34.** Actividad antioxidante de la fracción FIII de *S lakei*, comparada con la de la vitamina C. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$



**Figura 35.** Actividad antioxidante de la fracción FIV de *S lakei*, comparada con la de la vitamina C. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ . \*  $p < 0.05$

### 3.5.3 Actividad antimicrobiana.

Para esta evaluación, se realizó la técnica de microdilución en caldo, encontrando que la fracción FI fue activa contra todos los microorganismos probados, a la concentración más alta (1 mg/ml) y fue efectiva contra *S. schenkii* 1458, aun a la concentración de 500 µg/ml; la fracción FII no resultó activa contra ninguno de los microorganismos; la fracción FIII fue activa contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* Z-83, *M. smegmatis* y los dos *Sporothrix* a la concentración más alta evaluada, además fue activa contra *S. schenkii* 1458 a la concentración de 500 µg/ml. Finalmente, la fracción FIV resultó activa contra todos los microorganismos a la concentración de 1 mg/ml, a excepción de *S. schenkii* 713. (Tabla VI).

Cepas	FI	FII	FIII	FIV
<i>E. coli</i> ATCC	+	-	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC	+	-	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC	+	-	-	+
<i>C. albicans</i> LIID- Z-83	+	-	+	+
<i>M. smegmatis</i> LR-222	+	-	+	-
<i>S. schenkii</i> LIID-713	+	-	+	-
<i>S. schenkii</i> LIID- 1458	++	-	++	+

**Tabla VI.** Actividad antimicrobiana mostrada por las fracciones obtenidas de *Suillus lakei* de dos meses de cultivo.

### 3.5.4 Actividad inmunomoduladora.

De las fracciones obtenidas, se encontró que la más activa fue la fracción FIV, que produjo un incremento de hasta 200% en la producción de células formadoras de anticuerpos, comparada con el control (efecto inmunoestimulante); la fracción FI también mostró un aumento en el número de células formadoras de anticuerpos del 50%, al compararla con el control. La fracción FIII mostró una disminución del número de células formadoras de anticuerpos (cerca de 50%). (Tabla VII).

Antígeno	CFA/millón
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	29±6
Fracción I	45±9
Fracción II	33±9
Fracción III	18±3
Fracción IV	87±11

**Tabla VII.** Actividad inmunomoduladora mostrada por las fracciones obtenidas de *Suillus lakei* de dos meses de cultivo.

### 3.5.5 Rastreo fitoquímico preliminar.

Para la realización del rastreo fitoquímico se eligió la fracción más activa, de acuerdo con los resultados de la evaluación biológica, siendo ésta la fracción FIV, correspondiente a la fracción obtenida por extracción con butanol. A esta fracción se le cuantificó el contenido de proteínas, carbohidratos y fenoles totales; además de realizarse un rastreo cualitativo y un espectro IR.

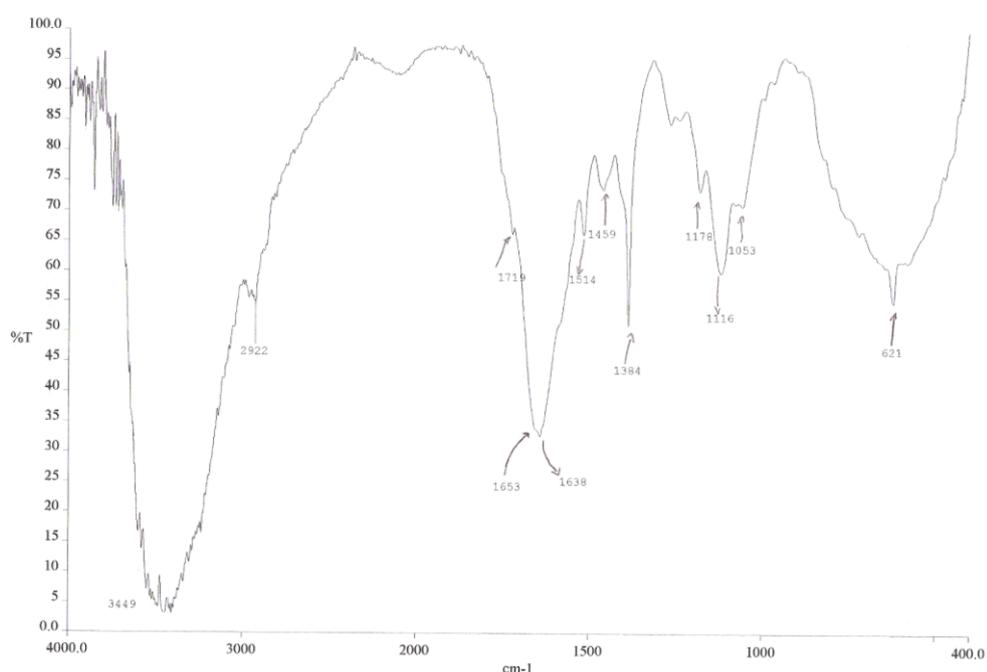
La fracción FIV tiene 13% de proteínas, 57% de carbohidratos y 25g de ácido gálico por 100g de muestra de fenoles totales. Al realizarse el estudio cualitativo, se encontró que FIV dio positivo para alcaloides y taninos condensados; al encontrarse un precipitado naranja y verde, respectivamente. (Tabla VIII).

Prueba	FI	FII	FIII	FIV
Alcaloides	-	-	-	+
Flavonoides	-	-	-	-
Saponinas	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	+
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-
Terpenoides	-	-	-	-

**Tabla VIII.** Resultados del rastreo fitoquímico realizado a la fracción butanólica.

El espectro IR de la fracción butanólica mostró una señal intensa y ancha a  $3449\text{cm}^{-1}$ , característica de grupos funcionales hidroxilo e imino, así como una banda a  $1719\text{cm}^{-1}$  donde están presentes los grupos carbonilo. Además presenta una señal en  $1653$  y  $1638\text{cm}^{-1}$ , que se debe a la presencia de enlaces C=C del tipo aromático. Las bandas entre  $110$  y  $1200$  de mediana intensidad corresponden a estiramientos C-O. (Figura 36).

La mayoría de los grupos funcionales están relacionados con compuestos polares de naturaleza glucosídica; además de cumplir con los grupos funcionales que se esperarían en caso de tener la presencia de moléculas del tipo de los alcaloides.



**Figura 36.** Espectro IR de la fracción butanólica obtenida de *Suillus lakei* de dos meses de cultivo.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

Existe una gran variedad de basidiomicetos que crecen en nuestro país y a la fecha, el potencial de los mismos como posible fuente de metabolitos secundarios con actividad farmacológica no ha sido evaluado para la inmensa mayoría de ellos. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que al igual que los basidiomicetos que crecen en oriente, para los que se ha demostrado que son fuente de compuestos con potencial farmacológico (actividad antitumoral e inmunomoduladora entre otras), algunas cepas de basidiomicetos que crecen en nuestro país tienen compuestos con potencial farmacológico ya que poseen actividad antioxidante, inmunomoduladora y antimicrobiana, además de no ser citotóxicos.

En este estudio se realizó la evaluación de diez cepas de Basidiomicetos originarios del noreste del país. La actividad biológica evaluada incluyó su efecto antioxidante, inmunomodulador, actividad antimicrobiana y citotoxicidad. .

Las cepas estudiadas en este trabajo fueron: *Coriolus versicolor*, *Lentinus lepideus*, *Ganoderma sp*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lobatum*, *Calvatia cyathiformis*, *Suillus luteus*, *Suillus lakei*, *Armillaria tabescens* y *Armillaria mellea*. Las cepas fueron cultivadas *in vitro*, lo que permitió controlar las condiciones de crecimiento en cuanto a temperatura, pH y fuente y cantidad de nutrientes, entre otros, además de poder evaluar la producción y secreción de metabolitos secundarios mediante la evaluación de muestras del medio de cultivo donde crecieron estas cepas, recolectadas a diferentes tiempos.

Ninguna de las cepas evaluadas fue citotóxica. Este hallazgo concuerda con los reportes de diversos autores, quienes han evaluado la actividad antitumoral de especies de Basidiomicetos que crecen en Oriente y han encontrado que esta actividad está directamente relacionada con su efecto inmunomodulador más que con una acción citotóxica directa.<sup>57-59</sup> Kobayashi y cols. encontraron un importante efecto antitumoral y antimetastásico del PSK -polisacárido unido a proteínas obtenido del micelio de *Coriolus versicolor* – mediado por una estimulación del sistema inmune, sin producción de citotoxicidad, así mismo, Shamtsyan et al, reportaron que la actividad antitumoral de varias especies de Basidiomicetos que crecen en Rusia era producida por un estimulación de las células monocíticas que sintetizan citocinas. La falta de citotoxicidad de la mayoría de los basidiomicetos evaluados a la fecha sugiere que los compuestos presentes en ellos podrían tener ciertas ventajas con respecto a compuestos con actividad antitumoral empleados en la actualidad, ya que no producirían los

efectos tóxicos relacionados con la citotoxicidad tanto hacia células tumorales como benignas.

En cuanto a la actividad biológica evaluada, es sabido que las especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, entre otros), producidas por los rayos del sol, radiación ionizante, o procesos metabólicos se han relacionado fuertemente con una gran variedad de estados patológicos, entre los que se encuentran enfermedades autoinmunes (como la artritis reumatoide), aterosclerosis y cáncer, todas relacionadas con el daño oxidativo sufrido por la célula, en el momento en el que se desequilibran los sistemas de defensa naturales del organismo contra la oxidación.<sup>60,61</sup>

En este estudio se demostró que cinco de las diez cepas de Basidiomicetos evaluados tuvieron una importante actividad antioxidante, siendo *Suillus lakei* el más activo. De particular interés fue el hecho de que esta actividad fuera incluso mayor que la de la vitamina C, al ser evaluados a la misma concentración; lo anterior resulta interesante si consideramos que esta cepa fue evaluada como extracto y no como compuesto puro. La actividad antioxidante de cepas de Basidiomicetos que crecen en Oriente ha sido reportada por varios autores.<sup>62-65</sup> Liu et al, reportaron en 1996, que muestras de micelio, cuerpo fructífero y medio de cultivo de *C versicolor*, *L edodes*, *G lucidum* y *Tricholoma lobayense*, mostraron actividad antioxidante producida por la captura de radicales hidroxilo y superóxido.<sup>66</sup> De la misma

manera, Mau et al, publicaron en 2002, que varias cepas de basidiomicetos originarias de Taiwán, poseían una actividad antioxidante relevante.<sup>67</sup>

La actividad antitumoral de compuestos aislados a partir de medio de cultivo de Basidiomicetos que crecen en otros países ha sido reportada por varios autores.<sup>68,69</sup> Como ejemplo está el caso del compuesto llamado PSPC (polysaccharide-protein complex) aislado del medio de cultivo de *Tricholoma lobayense*. Existen, además, múltiples reportes de actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* producida por compuestos aislados de micelio o cuerpo fructífero de Basidiomicetos que crecen en Oriente, en la mayoría de los casos esta actividad ha estado mediada por la estimulación del sistema inmune.<sup>70-78</sup> Este es el caso de la lentina, compuesto aislado del micelio y del cuerpo fructífero de *L. edodes* que fue patentado por su actividad antitumoral mediada por estimulación del sistema inmune.<sup>79, 80</sup> Así mismo se demostró que los  $\beta$ -D- glucanos obtenidos de *Ganoderma lucidum* deben su actividad antitumoral a un aumento en la liberación de citocinas por macrófagos activados (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y linfocitos T (IFN- $\gamma$ ); se comprobó que esto se encuentra mediado por la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B, el cual está envuelto en la regulación de la transcripción de muchos mediadores de la respuesta inmune. Además de esto, pueden producir una activación de los linfocitos B, produciendo un incremento en su tamaño, número y producción de anticuerpos.<sup>78, 79</sup>

Con relación a la evaluación de la actividad inmunomoduladora, el aumento significativo del número de células formadoras de anticuerpos

producido por *S lakei* indica que posee un importante efecto inmunoestimulante y considerando que para los Basidiomicetos que han demostrado poseer actividad antitumoral se ha reportado que ésta está mediada por activación del sistema inmune, se sugiere que esta cepa pudiera tener compuestos con potencial efecto antitumoral, lo cual será motivo de estudios posteriores.

Con relación a la actividad antimicrobiana, además de los estudios realizados con Basidiomicetos en modelos *in vivo*, en los cuales el principal mecanismo de acción es debido –al igual que la actividad antitumoral- a la estimulación del sistema inmune del huésped, se ha reportado actividad de fracciones o compuestos aislados a partir de micelio contra diversos microorganismos en ensayos realizados *in vitro*.<sup>80-82</sup> Anchel et al, en 1948, fue de los primeros en realizar evaluaciones de este tipo, al demostrar que muestras de medio de cultivo de *Coprinus similis* y *Lentinus degener* contra *Staphylococcus aureus*. tenían actividad antimicrobiana.<sup>82</sup> En este estudio las cepas de *Ganoderma applanatum*, *Armillaria mellea* y *Suillus lakei* demostraron tener actividad antimicrobiana.

Con relación a la gran actividad antimicrobiana encontrada en el medio de cultivo de *Armillaria mellea*, este hallazgo concuerda con lo reportado por Obuchi y cols., quienes lograron el aislamiento del ácido arnilárico y otros compuestos a partir del micelio de una cepa de *Armillaria mellea* que crece en China, y reportaron que estos compuestos poseen actividad antimicrobiana importante contra *Micrococcus luteus* ATCC9341,

*Staphylococcus aureus* 209PJC, *Bacillus subtilis* 6633 y *Candida albicans* NHL4019.<sup>38</sup>

En este estudio se seleccionó la cepa de *Suillus lakei* para su fraccionamiento biodirigido debido a que resultó ser el Basidiomiceto con mayor actividad antioxidante, además de poseer actividad antimicrobiana y producir estimulación del sistema inmune *in vivo*. La evaluación de la actividad biológica de las cuatro fracciones mostró que la fracción butanólica fue la más activa en cuanto a propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras, además de tener actividad antimicrobiana contra *E coli*, *S aureus*, *C. albicans* y *S schenkii* 1458.

El hecho de que la mayor actividad se haya concentrado en la fracción butanólica indica que los compuestos presentes en esta fracción son compuestos polares. La presencia de carbohidratos y proteínas encontrados en el rastreo fitoquímico corroboran este hecho, al igual que el espectro IR realizado para esta fracción en el que se observaron señales intensas que indican compuestos con gran cantidad de grupos hidroxilo, carbonilo y enlaces carbono-carbono, que sugieren la presencia de compuestos de naturaleza glucosídica.

Al respecto, existen numerosos reportes de que los compuestos activos que poseen propiedades inmunomoduladoras, y parte antioxidantes, son compuestos del tipo de polisacáridos o complejos polisacáridos-proteína. Los polisacáridos normalmente son  $\beta$ -D-Glucanos que están conformados

por cadenas largas de monómeros repetitivas y pueden encontrarse con ramificaciones 1-6 a partir del polímero 1,3. Los complejos polisacáridos-proteína están constituidos por un 25-38% de residuos de proteína y se dividen en dos porciones: la del polisacárido, formada por monosacáridos con uniones glucosídicas  $\alpha$ - (1,4) y  $\beta$ - (1,3), y la porción proteína tiene gran predominio de aminoácidos del tipo del ácido glutámico y aspártico.

Los resultados obtenidos acerca de la actividad antioxidante, inmunoestimulante y antimicrobiana de muestras de medio de cultivo de basidiomicetos cultivados *in vitro*, constituyen el primer reporte de actividad farmacológica de metabolitos secundarios secretados al medio de cultivo por basidiomicetos originarios del noreste del país.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

1. Ninguna de las muestras de las especies evaluadas resultó ser citotóxica.
2. *Calvatia cyathiformis*, *Armillaria mellea*, *Suillus luteus*, *Lentinus lepideus* y *Suillus lakei* mostraron tener actividad antioxidante, siendo *Lentinus lepideus* y *Suillus lakei* los más activos.
3. *Ganoderma applanatum*, *Armillaria mellea* y *Suillus lakei* mostraron tener actividad antimicrobiana.
4. . *Suillus lakei* fue la cepa con mayor actividad antioxidante.
5. *Suillus lakei* mostró tener actividad inmunoestimulante
6. La fracción butanólica de *Suillus lakei* fue la que tuvo mayor actividad antioxidante e inmunomoduladora; la fracción etanólica fue la que mostró mayor actividad antimicrobiana.

## **PERSPECTIVAS**

1. Lograr el aislamiento del o los compuestos responsables de las actividades farmacológicas descritas.
2. Evaluar el potencial de estos compuestos para las actividades farmacológicas descritas.
3. Continuar con la evaluación de la actividad farmacológica de otras cepas de Basidiomicetos que crecen en el noreste de México.
4. Modificar las condiciones de crecimiento de los Basidiomicetos para incrementar la producción de los metabolitos secundarios de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lindequist, U. et al. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. Oxford University Press. EUA. 2(3):285-299. 2005.
2. Statements, P et al. The mushroom cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at home. Agarikon Press. EUA. 1983.
3. Turner, W.B. Fungal metabolites. Academic Press. England. 1971.
4. Smith, J., Rowan, N., *et al.* Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde. Reino Unido. 2002.
5. Hoobs, C. Medicinal mushrooms. Botanica Press. EUA. 1995.
6. Statements, P. Growing gourmet and medical mushrooms. Ten Speed Press. EUA. 2000.
7. Liu, J. N-containing Compounds of Macromycetes. *Chemical Reviews*. 2004; 105 (7): 2723-2744.
8. Arora, D. Mushrooms demystified. Ten Speed Press, PO BOX 7123, EUA. 1985.
9. Samorini, G. New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001. 3: 257-278.
10. Wasson, R.G. Soma divine mushroom of immortality. Harcourt, Brace and Jovanovich. EUA. 1976.
11. Wasson, R.G. The wondrous mushrooms: mycolatry to Mesoamerica. McGraw-Hill. EUA. 1978.
12. Stadler, M. Production of bioactive secondary metabolites in the fruit bodies of Macrofungi as a response to injury. *Phytochemistry*. 1998. 49 (4): 1013-1019.

13. Packter, N.M. Studies on the biosíntesis of phenols in fungi.. *Biochem. J.* 1969. 114: 369-377.
14. Jing Gao, X. et al. In vivo antitumor effects of bitter principles from the antlered form of fruiting bodies of *Ganoderma Lucidum*. *J of Natural Medicines*.2005.
15. Zjawiony, J. Biologically active compounds from *Aphylophorales* (Polypore) Fungi. *J. Nat. Prod.* 2004. 67 (2): 300-310.
16. Brizuela, M et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Micol.* 1998. 15: 69-74.
17. Clericuzio, M et al. Structural Characterisation of metabolites from *Pholiota spumosa* (Basidiomycetes). *Croatia Chemical Acta.* 2004. 77 (4): 605-611.
18. Wasser, S et al, Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev in Immunol.* 1999. 19: 65-96.
19. Mizuno, T et al. Health foods and medicinal usage of mushrooms. *Food Review International.* 1995. 11:69-81.
20. Sadler, M et al. Functional foods: the consumer, the products and the evidence. *Royal Society of Chemistry. Inglaterra.*
21. Ikekawa, T et al. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res.* 1969. 29: 734-735.
22. Chihara, G et al. Inhibition of Mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Nature.* 1969. 222: 687-688.
23. Chihara G et al. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of Lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer detect Prev.* 1987. 1: 423-443.
24. Borchers, A et al. Mushrooms, tumors and immunity: an update. *Society for Experimental Biology and Medicine.* 2004. 393:406.
25. Chihara, G et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom) *Cancer Res.* 1970. 30: 2776-2781.
26. Chang, R. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev.* 1996. 54 (11): S91-93.
27. Russell, R. et al. *Ganoderma*- A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry.* 2006. 67: 1985-2001.

28. Kim, B et al. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVIII) Antitumor components of the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*. Korean J Pharmacol. 1993. 24:203-212.
29. Shie, Y et al. Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice. Am. J. Chin Med. 2001. 29:501-507.
30. Kabir, Y. et al. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). J. Nut. Sci Vitaminol. 1988. 34: 433-438.
31. Noguchi, M et al. Phase I study of a methanol extract of *Ganoderma lucidum*, edible and medicinal, in men with mild symptoms of bladder outlet obstruction. Urology. 2005. 66:121.
32. Li-Zhen, C et al. Regulatory effect of *ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2003. 24 (4): 312-326.
33. Wang G. et al. Antitumor active polysaccharides from the Chinese mushrooms Songshan lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57. 894-900.
34. Zhang, J et al. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. 2002. 71: 623-638.
35. Watanabe, N. et al. *Planta medica*. 1990. 56: 48.
36. Obuchi, T et al. Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta Medica*. 1990. 56:198-201.
37. Shamtsyan, M et al. Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. J. of Biotechnology. 2004. 113: 77-83
38. Chu, K. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. J. Clin Pharmacology. 2002. 42:976-984.
39. Kobayashi, H et al. Antimetastatic effects of PSK, a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. Cancer epidemiology, biomarkers and prevention. 1995. 4:275:281.
40. Mosman T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 1983. 65: 55.
41. Bass, D et al. Cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J. Immunol. 1983. 130: 1910-1918.

42. Alcalá, L. et al. Comparison of broth microdilution method using Hemophilus test medium and agar dilution method for susceptibility testing of *Eikenella corrodens*. 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36 (8): 2386-2388.
43. Nacional Comité for Clinical Laboratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved estándar M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
44. Cunningham A.J., and Szenberg A., Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology.* 1968. 14:599.
45. Maziero, R et al. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de microbiologia.* 1999. 30: 77-84.
46. Lowry, OH et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem.* 1951. 193.
47. Leninger, A. *Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function.* Worth Publisher, Inc. 1970. EUA.
48. Singleton, VL. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* 1999. 299: 152-178.
49. Domínguez, X.A, *Métodos de investigación fitoquímica,* AID, México, 1973.
50. Takaku, T et al. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus Blazei Murill* and its mechanism of action. *Biochem and Molecular Action of Nutr.* 2001. 1409-1413.
51. Lull, C. et al. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation.* 2005. 2: 63-80.
52. Jim, M et al. Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp Biol and Med.* 2003. 228: 749-758.
53. Halliwell, B et al. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984. 219: 1-4.
54. Sun, J et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric and Food Chem.* 2002. 50: 7449-7454.
55. Janardhanan, K. et al. Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. *Current Science.* 79 (7): 941-943.

56. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. African Journal of Biotechnology. 2006. 5 (11): 1146-1150.
57. Mau- J. et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. J agric Food Chem. 2001. 49: 5461-5467.
58. Leea, BC. et al. Biological activities of the polysaccharide produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola Frondosa*. Enzyme and Microbial Technology. 32 (5): 574-581.
59. Liu. F et al. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharides extracts. Life Science. 60 (10): 763- 771.
60. Mau- J et al. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. J Agric Food Chem. 2002. 50: 6072- 6077.
61. Liu, et al. Antitumor components of the culture filtrates from *Tricholoma* sp. World Journal of Microbiol and Biotech. 1995. 11: 486-490.
62. Ooi, V et al. Immunomodulating and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. Current Medicinal Chemistry. 2000. 7: 715-729.
63. Yin, Yuanmin et al. The immune effects of edible fungus polysaccharides compounds in mice. Asia Pac J Clin Nutr. 2007. 16 (1): 258-260.
64. Elaine, R. et al. A  $\beta$ - glucan from the fruiting bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. Carbohydrate Polymers. 2006. 66 (2): 252-257.
65. Daba, A S et al. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. African J Biotech. 2003. 2 (12). 672-678.
66. Takimoto, H et al. Potentiation of cytotoxic activity in Naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot water extracts from *Agaricus brazei* fruiting bodies. Biol Pharm Bull. 2004. 27 (3): 404-406.
67. Jin, M et al. Induction of B cell proliferation and NF- $\kappa$ B activation by a water soluble glycan from *Lentinus lepideus*. Int. J. Immunopharmacol. 1996. 18 (8/9): 439-448.
68. Tzianabos, A et al. Polysaccharides immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clinical Microbiology. Reviews. 2000. 13 (4): 523-533.

69. Garza Ocañas, L et al. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencia, UANL*. 2006. 9 (2): 164-170.
70. Choi, JJ. et al. Control of cytokine gene expresión by PG101, a water soluble extract prepared from *Lentinus lepideus*. *Biochem and Biophys Research Communications*. 339 (3): 880-887.
71. Sorimachi, K et al. Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus Blazer Murill* fractions in Vitro. *Cell Struct. Funct*. 2001. 26 (2): 103-108.
72. Kuo, M et al. *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF- $\kappa$ B. *J of Ethnopharmacol*. 2005.
73. Wang, SY. et al. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer*. 1997. 70. 699- 705.
74. Rosa, LH et al. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003. 98 (7): 967-974.
75. Benedict, RG et al. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *J of Pharmaceutical Sciences*. 1972. 61 (11): 1820-1822.
76. Inchausti, A et al. Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from basidiomycetes. *Phytother Res*. 1997. 11: 193-197.
77. Ofodile, LN. et al. Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytother Res*. 2005. 19 (4): 310-313.
78. Buenafe Rofuli, N et al. Antimicrobial and antagonistic properties of *Ganoderma lucidum*. *Int J of Med Mushrooms*. 2005. 7(3): 150.
79. Suay, I et al. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Anton van Leeuwenh*. 2000. 78: 129-139.
80. Hirasawa, M et al. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (Shiitake, an edible mushroom). *Int J of Antimicrobial Agents*. 1999. 11: 151-157.
81. Hatvani, N et al. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int J of Antimicrobial Agents*. 2001. 17: 71- 74.
82. Anchel, M et al. Antibiotic substances from basidiomycetes III: *Coprinus similis* and *Lentinus degener*. 1948. 34: 498-502.



**APÉNDICE A.**

**Técnica de Cunningham.**

## **APÉNDICE A.**

### **Técnica de Cunningham.**

#### **I. Preparación de la solución de glóbulos rojos de carnero al 10%.**

La sangre de carnero, una vez extraída, se dejó madurar por una semana; pasado este tiempo, los eritrocitos se sometieron a centrifugación a 3000rpm durante 5 minutos para separar el material celular. Se retiró el sobrenadante y el material celular se sometió a 3 lavados con solución salina al 0.85%. Una vez lavados los eritrocitos, se elaboró la solución al 10% (v/v) de eritrocitos de carnero en solución salina al 0.85%.

#### **II. Obtención del suero de cobayo adsorto.**

El suero de cobayo se obtuvo de cobayos sanos, mediante punción intracardiaca, administrando anestesia al animal antes de la punción. Una vez obtenida la sangre, se permitió la formación del coágulo manteniendo la muestra durante 20 minutos a 4°C; posteriormente, se centrifugó a 3000rpm a 4°C, durante 5 minutos y se recuperó el suero sobrenadante. Una vez obtenido, el suero se coloca en incubación a 4°C con eritrocitos de carnero, previamente lavados con solución salina al 0.85%; esta operación tiene la función de adsorber en la superficie de los eritrocitos de carnero, cualquier

anticuerpo natural que pudiera encontrarse en el suero. Una vez hecho esto, el suero se centrifuga a 3000 rpm a 4°C durante 5 minutos, para separar el suero de los eritrocitos; se recupera el suero y se mantiene a 4°C hasta su utilización.

### **III. Preparación del Sistema Indicador.**

El sistema indicador estuvo compuesto por:

- a) 200 µl de la solución de eritrocitos de carnero al 10%.
- b) 200 µl de suero de cobayo previamente adsorto.
- c) 2 ml de medio RMPI 1640 suplementado con SFB al 5%.

### **IV. Tratamiento de los portaobjetos.**

Los portaobjetos se colocaron en canastillas metálicas para portaobjetos, se sumergieron en un recipiente con agua bidestilada y se sometieron a ebullición durante 20 min. Posteriormente, se les cambió el agua y se pusieron en ebullición con agua y extran durante 20 min. Se sacaron las canastillas y se enjuagaron con agua corriente hasta que quedaron totalmente libres de espuma. Luego se colocaron de nuevo en agua bidestilada y se sometieron otros 20 min. a ebullición. En seguida se sacaron y se dejaron secar por evaporación, para colocarlos en un recipiente con alcohol-acetona (v/v) durante 20 min, con el objetivo de desengrasarlos. Finalmente se dejaron secar durante 15 min. antes de proceder a la construcción de las cámaras de Cunningham.

## V. Construcción de cámaras de Cunningham.

Una vez que los portaobjetos fueron desengrasados y cuidando de no engrasarlos de nuevo, las cámaras se elaboraron colocando un portaobjetos junto al otro, en sentido horizontal; posteriormente, se colocó en la unión de ambos portaobjetos, cinta biadherente. De la misma manera, se colocó cinta biadherente en el extremo exterior de uno de los portaobjetos. Posteriormente, se colocó un portaobjetos justo encima del otro, ejerciendo presión para que quedaran bien adheridos. La cámara ya lista para emplearse, se llenó con el sistema indicador y la muestra; el espacio que se llenó es aquel que quedó entre los dos portaobjetos.

## VI. Cálculo para la determinación de CFA/millón.

Los cálculos para obtener el número de CFA-IgM/millón se hicieron de la siguiente manera:

CFA-IgM

En 1000 $\mu$ l están contenidas -----5x10<sup>6</sup> células

En 200 $\mu$ l -----X

$$X = 1 \times 10^6 \text{ células.}$$

200  $\mu$ l de células + 200  $\mu$ l de SI = 400  $\mu$ l

400  $\mu$ l-----1x10<sup>6</sup> células

\*150  $\mu$ l-----X

$$X = 0.375 \times 10^6 \text{ células.}$$

\*Volumen colocado en la cámara

En  $0.375 \times 10^6$  células-----No de CFA que se contaron

En  $1 \times 10^6$  células-----X

X = No. De CFA-IgM/millón.

## **APÉNDICE B.**

### **Método de Lowry.**

## **APÉNDICE B.**

### **Método de Lowry.**

#### **I. Preparación de la solución C.**

##### **Ia. Preparación de la solución A:**

Se colocan 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en con 4 g de NaOH y se aforan a 1l con agua libre de iones.

##### **Ib. Preparación de la solución B:**

Se prepara una solución de 0.78 g de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  en 20 ml de agua libre de iones. Por otro lado, se prepara una solución con 1.34 g de tartrato de sodio y potasio disueltos en 20 ml de agua libre de iones.

La solución B se prepara mediante la mezcla de las dos soluciones anteriores, una vez mezcladas, se afora a 1l con agua libre de iones.

##### **Ic. Preparación de la solución C:**

Se mezclan 50 ml de la solución A con 1 ml de la solución B.

#### **II. Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu.**

Se mezclan 10 ml del reactivo de Folin con 19 ml de agua libre de iones.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Patricia González Barranco**  
**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con**  
**orientación terminal en Farmacología y Toxicología**

**Título de la Tesis:** Detección de la producción de metabolitos secundarios por Macromicetos del noreste de México, cultivados *in vitro*, y evaluación de su actividad biológica.

**Área de estudio:** Farmacología y Toxicología.

### Biografía:

**Datos personales:** Lugar y fecha de nacimiento: Monterrey, N.L., México; el 20 de noviembre de 1980. Estado civil: soltera.

**Escolaridad:** Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, en 2002. Diplomado en Farmacia Comunitaria y Asistencial por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, en el 2003.

**Experiencia profesional:** Participación como Farmacéutico en la Farmacia comunitaria perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas, UANL de agosto de 2001 a marzo de 2002. Presentación de trabajos de investigación en Congresos Nacionales e Internacionales:

- “Evaluación de la producción de metabolitos secundarios activos por una cepa mexicana de *neolentinus lepideus*”. IX Congreso Nacional de Micología. Ensenada, Baja California. Octubre de 2006.
- “Immunomodulating properties of two mexican strains of Basidiomycetes”. Phytochemical Society of North America 2007 Annual Meeting. St Louis, Missouri, EUA. Julio de 2007.
- “Detección de la producción de metabolitos secundarios de macromicetos del noreste de México y evaluación de su actividad biológica”. Congreso de Investigación Biomédica. Monterrey, Nuevo León. Agosto de 2007.
- “Actividad inmunomoduladora, antioxidante, citotóxica y antimicrobiana de una cepa mexicana de *Suillus lakei*”. Congreso de Investigación Biomédica. Monterrey, Nuevo León. Agosto de 2007.

### Distinciones:

- Reconocimiento como: Mejor estudiante de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Ciencias Químicas, UANL. 1997- 2002.
- Testimonio de alto rendimiento académico en el Examen General para el Egreso de la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo. CENEVAL. 2002.
- Reconocimiento como: Estudiante distinguido en el Programa de Doctorado en Ciencias con orientación terminal en Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina, UANL, 2004.
- Reconocimiento como: Estudiante distinguido en el Programa de Doctorado en Ciencias con Orientación terminal en Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina, UANL. 2006.