

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACION DE CITOTOXICIDAD SELECTIVA
ESTRES OXIDATIVO Y EFECTO
INMUNOMODULADOR DE EXTRACTOS DE
MACROMICETOS DEL NORESTE DE MEXICO**

Por

Q.F.B. XOCHITL SOFIA RAMIREZ GOMEZ

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

Febrero del 2005

TD

QK626

.R3

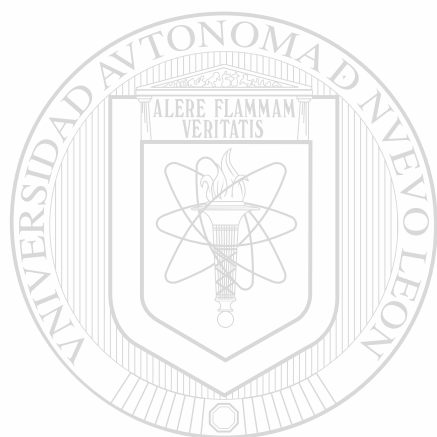
2005

c.1

Q.F.B. XOCHITL SOFIA RAMIREZ GOMEZ



1080127184



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACION DE CITOTOXICIDAD SELECTIVA,
ESTRÉS OXIDATIVO Y EFECTO INMUNOMODULADOR
DE EXTRACTOS DE MACROMICETOS
DEL NORESTE DE MEXICO.**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

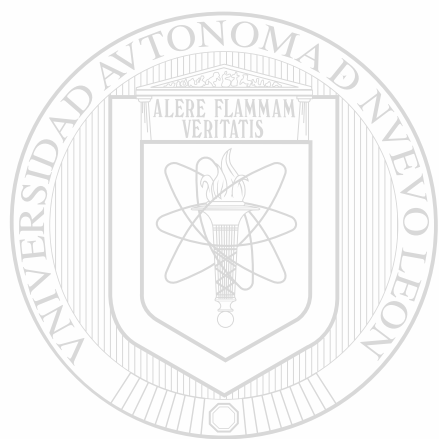
Por

Q.F.B. XOCHITL SOFIA RAMIREZ GOMEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON Especialidad en
Farmacología y Toxicología.**

Febrero del 2005

TD
QK626
.R3
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

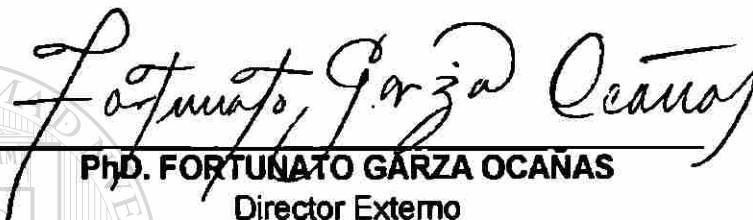


EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SELECTIVA, ESTRÉS OXIDATIVO Y EFECTO INMUNOMODULADOR DE EXTRACTOS DE MACROMICETOS DEL NORESTE DE MEXICO

Aprobación de la Tesis:



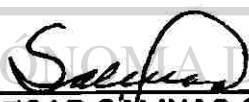
Dr. Med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Director de Tesis



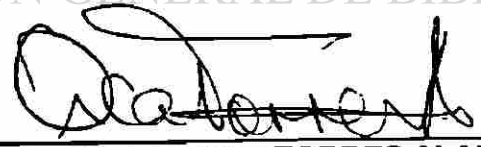
PhD. FORTUNATO GARZA OCAÑAS
Director Externo




DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co-Director de Tesis



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Co-Director de Tesis



Dr. Med. OSCAR TORRES ALANIS
Comisión de Tesis



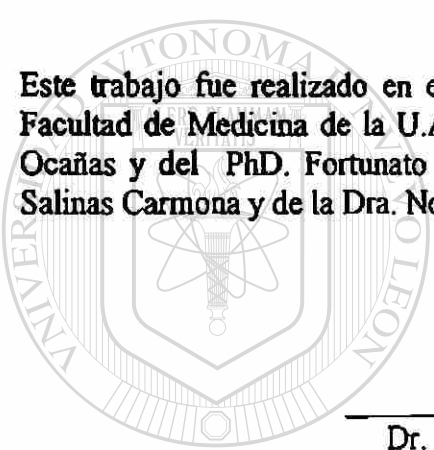
DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado


**EVALUACION DE CITOTOXICIDAD SELECTIVA, ESTRÉS OXIDATIVO
Y EFECTO INMUNOMODULADOR DE EXTRACTOS DE MACROMICETOS
DEL NORESTE DE MEXICO**

Presentado por

Q.F.B. Xóchitl Sofía Ramírez Gómez

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas y del PhD. Fortunato Garza Ocañas y la codirección del PhD. Mario César Salinas Carmona y de la Dra. Noemí Waksman de Torres.




Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Director de Tesis


PhD. Fortunato Garza Ocañas
Director Externo de Tesis

PhD. Mario César Salinas Carmona
Co-Director de Tesis

Dra. Noemí Waksman de Torres
Co-Director de Tesis

Xóchitl Sofia Ramírez Gómez

Fecha de graduación: Febrero 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina.

Título del Estudio:

EVALUACION DE CITOTOXICIDAD
SELECTIVA, ESTRÉS OXIDATIVO Y
EFECTO INMUNOMODULADOR DE
EXTRACTOS DE MACROMICETOS DEL
NORESTE DE MEXICO

Número de páginas:105

Candidato para la obtención del Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en
Farmacología y Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología Y Toxicología

Propósito y Método del Estudio: Los macromicetos han sido utilizados ampliamente en la medicina tradicional de países orientales para la prevención y/o tratamiento de varias enfermedades incluyendo el cáncer y recientemente se han postulado como potenciales fuentes naturales de sustancias bioactivas con actividad antitumoral e inmunomoduladora. México posee una gran diversidad de macromicetos y la evaluación de la actividad biológica de los mismos constituye a la fecha un campo no explorado. En este estudio se realizó una evaluación sistemática de la actividad biológica de cuatro especies de macromicetos del Noreste de México con el propósito de evaluar su actividad biológica y detectar a las especies que tuvieran potencial terapéutico. En este trabajo se describen los resultados de la evaluación de Citotoxicidad Selectiva, Estrés Celular Oxidativo y efecto Inmunomodulador de extractos acuosos y metanólicos de: *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, del Noreste de México. Las especies se aislaron y cultivaron *in vitro* en fase acuosa a partir de muestras obtenidas en fase sólida y se realizaron extracciones metanólicas y acuosas de la biomasa. La Citotoxicidad Selectiva se evaluó mediante revisión morfológica y prueba de MTT en células de hígado de Chang (benignas) y Hepatoma G2 (tumoraes). El estrés celular oxidativo se evaluó mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína y el efecto inmunomodulador mediante la técnica de Jerne modificada por Cunningham en ratones BALB/c. Se realizó el fraccionamiento inicial biodirigido mediante precipitación fraccionada de *Lentinus lepideus*, debido a que fue la especie que tuvo mayor actividad antioxidante e inmunomoduladora. Se obtuvieron 4 fracciones (FI, FII, FIII y FIV) y se evaluó su actividad biológica.

Contribuciones y Conclusiones: En el presente trabajo se reporta por primera vez la actividad biológica de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* y de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas de *Lentinus lepideus*. Se establecieron las condiciones para cultivos de macromicetos *in vitro*. También se determinó que todas las especies evaluadas tuvieron actividad antioxidante e inmunomoduladora y no fueron citotóxicas. Se propone que las especies de macromicetos evaluadas tienen sustancias inmunomoduladoras con potencial quimioterapéutico en padecimientos que involucren al sistema inmune.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas

AGRADECIMIENTOS

Señor gracias por darme la dicha y la satisfacción de terminar esta meta tan importante en mi vida, porque siempre has estado conmigo y sobre todo por haberme rodeado de personas extraordinarias que me han enseñado a vivir.

A mi Familia por su infinito amor y confianza, gracias por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado y por motivarme día a día a seguir adelante.

Con toda mi admiración, cariño y respeto a la Dra. Lourdes Garza Ocañas y al Dr. Fortunato Garza Ocañas, asesores de mi tesis; así como al Dr. Oscar Torres Alanís, por su amistad, confianza, apoyo y enseñanzas, así como su guía y comentarios en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona y a la Dra. Noemí Waksman de Torres, miembros del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López con admiración, cariño y respeto gracias por sus conocimientos.

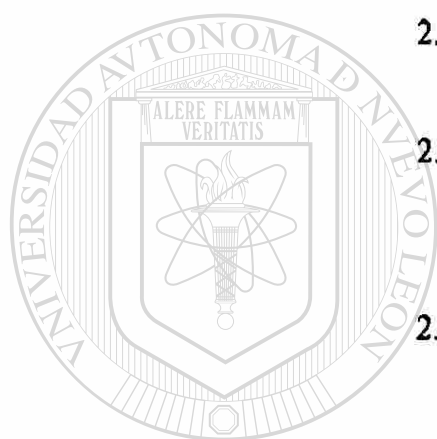
A mis amigos y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

A PAICYT UANL por el apoyo otorgado SA 678-02 y SA 968-04 para la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIAL Y METODOS	17
2.1 Material	17
2.1.1 Material biológico	17
2.1.1.1 Material fúngico	17
2.1.1.2 Líneas celulares	17
2.1.1.3 Animales	18
2.1.1.4 Glóbulos rojos de carnero	18
2.1.2 Material y equipo general	18
2.1.3 Reactivos	20
2.1.3.1 Reactivos para aislamiento y cultivo de macromicetos <i>in vitro</i>	20
2.1.3.2 Reactivos para extracciones y fraccionamiento	20
2.1.3.3 Reactivos para cultivo de líneas celulares prueba de MTT y prueba de DCFDA	21
2.1.3.4 Reactivos para la técnica de Jerne modificada por Cunningham	22
2.2 Métodos	23
2.2.1 Recolección, identificación y clasificación de macromicetos	23
2.2.2 Aislamiento de macromicetos	23
2.2.2.1 Identificación microscópica de micelio puro	23
2.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de macromicetos	24
2.2.3.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido	24
2.2.3.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido	24

Capítulo	Página
2.2.4 Obtención de biomasa	25
2.2.5 Obtención de extractos a partir de biomasa	25
2.2.5.1 Obtención de extractos metanólicos	25
2.2.5.2 Obtención de extractos acuosos	25
2.2.6 Evaluación de actividad biológica de extractos de macromicetos	26
2.2.6.1 Evaluación de citotoxicidad selectiva	26
2.2.6.1.1 Cultivo de líneas celulares benignas y tumorales	26
2.2.6.1.2 Cultivo de células hepáticas de origen benigno y tumoral en placa de 96 celdillas.	27
2.2.6.1.3 Preparación de extractos para la evaluación de citotoxicidad selectiva y estrés oxidativo	27
2.2.6.1.4 Exposición de líneas celulares benignas y tumorales a los extractos acuosos y metanólicos.	28
2.2.6.1.5 Evaluación de citotoxicidad selectiva	28
2.2.6.1.5.1 Evaluación microscópica	28
2.2.6.1.5.2 Prueba de reducción del metiltiazolterazolio (MTT)	29
2.2.6.1.6 Cálculo de la concentración citotóxica cincuenta por ciento (CT ₅₀)	29
2.2.7 Evaluación de estrés oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)	30
2.2.7.1 Exposición de células de hígado de Chang a extractos acuosos y metanólicos	30



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo

Página

2.2.8 Evaluación del efecto inmunomodulador	31
2.2.8.1 Administración de extractos	31
2.2.8.2 Esquema de administración de extractos	31
2.2.8.3 Inmunizaciones	32
2.2.8.4 Determinación de células formadoras de placas hemolíticas.	32
2.2.8.5 Obtención de células de bazo	32
2.2.8.6 Preparación de células para llenado de cámaras de Cunningham	34
2.2.9 Fraccionamiento inicial biodirigido de <i>Lentinus lepideus</i>	35
2.2.9.1 Precipitación fraccionada	36
2.2.9.1.1 Obtención de fracciones FI y FII	36
2.2.9.1.2 Obtención de fracciones FIII y FIV	36
2.2.10 Evaluación de actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV	37
2.2.11 Análisis estadístico	37

3. RESULTADOS

3.1 Material fúngico	38
3.2 Aislamiento de macromicetos	39
3.3 Identificación de cultivos puros	39
3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de macromicetos	40
3.4.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido	40
3.4.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido	41
3.5 Obtención de biomasa	42
3.6 Obtención de extractos metanólicos y acuosos	43
3.7 Evaluación de citotoxicidad selectiva	44

Capítulo

Página

3.7.1 Revisión microscópica y prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)	44
3.8 Evaluación de estrés celular oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)	46
3.8.1 Extractos metanólicos	46
3.8.2 Extractos acuosos	52
3.9 Evaluación del efecto inmunomodulador	59
3.9.1 Extractos metanólicos administrados 24 horas antes de la inmunización	59
3.9.2 Extractos metanólicos administrados de manera conjunta con la inmunización	62
3.9.3 Extractos metanólicos administrados 24 horas después de la inmunización	65
3.9.4 Extractos acuosos administrados 24 horas antes de la inmunización	68
3.9.5 Extractos acuosos administrados de manera conjunta con la inmunización	71
3.9.6 Extractos acuosos administrados 24 horas después de la inmunización	74
3.10 Fraccionamiento inicial biodirigido de <i>Lentinus lepideus</i>	77
3.11 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas de <i>Lentinus lepideus</i>	77
3.11.1 Evaluación de citotoxicidad selectiva mediante revisión microscópica y prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)	77
3.11.2 Evaluación de estrés oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)	78
3.11.3 Evaluación de efecto inmunomodulador	80

Capítulo**Página**

3.11.3.1 Fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> administradas 24 horas antes de la inmunización	81
3.11.3.2 Fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> administradas conjuntamente con la inmunización	82
3.11.3.3 Fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> administradas 24 horas después de la inmunización	84

4. DISCUSION	86
---------------------	----

5. CONCLUSIONES	94
------------------------	----

PERSPECTIVAS	95
---------------------	----

BIBLIOGRAFIA	96
---------------------	----

APENDICE 1	101
-------------------	-----

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Macromicetos: A) <i>Pleurotus ostreatus</i> , B) <i>Naematoloma fascicularis</i> , C) <i>Armillaria mellea</i> , D) <i>Calvatia gigantea</i> , E) <i>Ganoderma lucidum</i> , F) <i>Grifola frondosa</i> .	2
2. Ciclo de reproducción de los basidiomicetos.	4
3. Obtención de extractos metanólicos y acuosos de <i>Armillaria tabescens</i> , <i>Lentinus lepideus</i> , <i>Calvatia cyathiformis</i> y <i>Ganoderma applanatum</i> .	26
4. Aspecto de los carpóforos de las especies de macromicetos evaluadas.	38
5. Cepas aisladas de carpóforos: <i>Armillaria tabescens</i> , <i>Lentinus lepideus</i> , <i>Calvatia cyathiformis</i> y <i>Ganoderma applanatum</i> .	39
6. Aspecto del crecimiento miceliar en medio sólido: <i>Armillaria tabescens</i> , <i>Lentinus lepideus</i> , <i>Calvatia cyathiformis</i> y <i>Ganoderma applanatum</i> .	40
7. Aspecto de los cultivos de macromicetos en medio líquido: <i>Armillaria tabescens</i> , <i>Lentinus lepideus</i> , <i>Calvatia cyathiformis</i> . y <i>Ganoderma applanatum</i> .	41
8. Aspecto de la biomasa filtrada: <i>Armillaria tabescens</i> , <i>Lentinus lepideus</i> , <i>Calvatia cyathiformis</i> y <i>Ganoderma applanatum</i> .	42
9. Efecto de extractos metanólicos de <i>Armillaria tabescens</i> sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang.	46
10. Efecto de extractos metanólicos de <i>Armillaria tabescens</i> sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang.	47
11. Efecto de extractos metanólicos de <i>Lentinus lepideus</i> sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang.	48
12. Efecto de extractos metanólicos de <i>Lentinus lepideus</i> sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang.	49
13. Efecto de extractos metanólicos de <i>Calvatia cyathiformis</i> sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang.	49
14. Efecto de extractos metanólicos de <i>Calvatia cyathiformis</i> sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang.	50
15. Efecto de extractos metanólicos de <i>Ganoderma applanatum</i> sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang.	51

16. Efecto de extractos metanólicos de *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. 52
17. Efecto de extractos acuosos de *Armillaria tabescens* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang. 53
18. Efecto de extractos acuosos de *Armillaria tabescens* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. 54
19. Efecto de extractos acuosos de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang. 54
20. Efecto de extractos acuosos de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. 55
21. Efecto de extractos acuosos de *Calvatia cyathiformis* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang. 56
22. Efecto de extractos acuosos de *Calvatia cyathiformis* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. 57
23. Efecto de los extractos acuosos de *Ganoderma applanatum* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang. 57
24. Efecto de extractos acuosos de *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. 58
25. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos sobre la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. 60
26. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos sobre la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. 61
27. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. 63
28. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. 64
29. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. 66

30. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. 67
31. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización en la producción de células de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. 69
32. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. 70
33. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. 72
34. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. 73
35. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. 75
36. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. 76
37. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. 79
38. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. 80
39. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. 82
40. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. 83
41. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. 85

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Miligramos (mg) y por ciento de recuperación (%) de extractos metanólicos.	43
II. Miligramos (mg) y por ciento de recuperación (%) de extractos acuosos.	44
III. Valores de CT ₅₀ obtenidos para extractos metanólicos de macromicetos mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT.	45
IV. Valores de CT ₅₀ obtenidos para extractos acuosos de macromicetos mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT.	45
V. CFP-IgM en respuesta a la administración de 20 mg/Kg de extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización.	59
VI. CFP-IgM en respuesta a extractos metanólicos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización.	62
VII. CFP-IgM en respuesta a extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización.	65
VIII. CFP-IgM en respuesta a extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización.	68
IX. CFP-IgM en respuesta a extractos acuosos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización.	71
X. CFP-IgM en respuesta a extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización.	74
XI. Miligramos (mg) y % de recuperación de fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> .	77
XII. Valores de CT ₅₀ obtenidos en células de hígado de Chang y Hep G2 mediante revisión microscópica y prueba de reducción del MTT, para fracciones FI, FII, FIII y FIV de <i>Lentinus lepideus</i> .	78
XIII. CFP-IgM en respuesta a las fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> administradas 24 hrs antes de la inmunización en ratones hembras y machos.	81
XIV. CFP-IgM en respuesta a las fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> administradas conjuntamente con la inmunización en ratones hembras y machos.	83
XV. CFP-IgM en respuesta a las fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> administradas 24 hrs después de la inmunización en ratones hembras y machos.	84

ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μL	Microlitros
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
cm	Centímetros
Cel/mL	Células por mililitro
Cols	Colaboradores
CFP-IgM	Células formadoras de placas hemolíticas IgM
CO_2	Dióxido de carbono
CT_0	Concentración citotóxica 0%
CT_{50}	Concentración citotóxica 50%
CT_{100}	Concentración citotóxica 100%
DE	Desviación estándar
g	Gramos
hrs	Horas
Ig M	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón- γ
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramo
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número de muestra
pH	Potencial de iones hidrógeno
MP	Molecular probes
PQM	Productos Químicos Monterrey
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
T	Tiempo
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
U/mL	Unidades por mililitro
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
v.o.	Vía oral
v/v	Volumen/volumen

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Los hongos se clasifican taxonómicamente en dos grandes divisiones: Mastygomicota y Amastygomicota. La división Amastygomicota se compone de 4 subdivisiones: Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina.

La subdivisión Basidiomycotina (Basidiomicetos), consiste de más de 15 000 especies conocidas y en este grupo se incluyen los hongos comestibles y medicinales^{1,2}.

Basidiomicetos

Los Basidiomicetos también conocidos como macromicetos son hongos[®] macroscópicos que se pueden ver a simple vista, los cuales se consideran los más evolucionados del reino fungi. Estos organismos presentan una gran variedad de formas, tamaños, colores y aromas. Su hábitat natural es muy variado, ya que crecen en bosque de pino-encino, roble, álamo, abetos, en el suelo o bien sobre algún sustrato como troncos y plantas muertas. Los macromicetos pueden vivir en diversas condiciones ambientales y la mayor producción y diversidad se registra en los meses de Julio y Agosto donde las condiciones de temperatura y humedad son favorables para su reproducción y crecimiento¹⁻⁷ (Figura 1).



Figura 1. Macromicetos: A) *Pleurotus ostreatus*, B) *Naematoloma fascicularis*, C) *Armillaria mellea*, D) *Calvatia gigantea*, E) *Ganoderma lucidum*, F) *Grifola frondosa*.

En cuanto a su estructura los basidiomicetos están formados por hifas, éstas adoptan generalmente formas filamentosas y septadas y tienden a ramificarse para formar el micelio, el cual puede observarse a simple vista en forma de colonia fúngica (masa algodonosa). De acuerdo a su función, el micelio se divide en vegetativo y reproductor; el primero esta inmerso en el substrato y se encarga de la absorción de los nutrientes; el segundo, también llamado micelio aéreo, se encuentra libre y de él emergen las fructificaciones o cuerpos fructíferos llamados también basidiocarpos o carpóforos; estas fructificaciones son los hongos que podemos ver en el prado o en el bosque y en ellas se desarrollan los basidios y en ellos se forman las basidiosporas que tienen la función de multiplicación y dispersión de estos hongos en la naturaleza. Las esporas de los hongos pueden ser de tipo asexual y sexual, las de tipo asexual se denominan conidios y las sexuales se denominan esporas. Al madurar las esporas son liberadas y al germinar dan lugar a nuevos micelios, y con ello el ciclo comienza de nuevo. De esta manera cuando se dan las condiciones adecuadas para la formación de esporas aparecen los hongos que nos son familiares¹⁻⁸ (Figura 2).

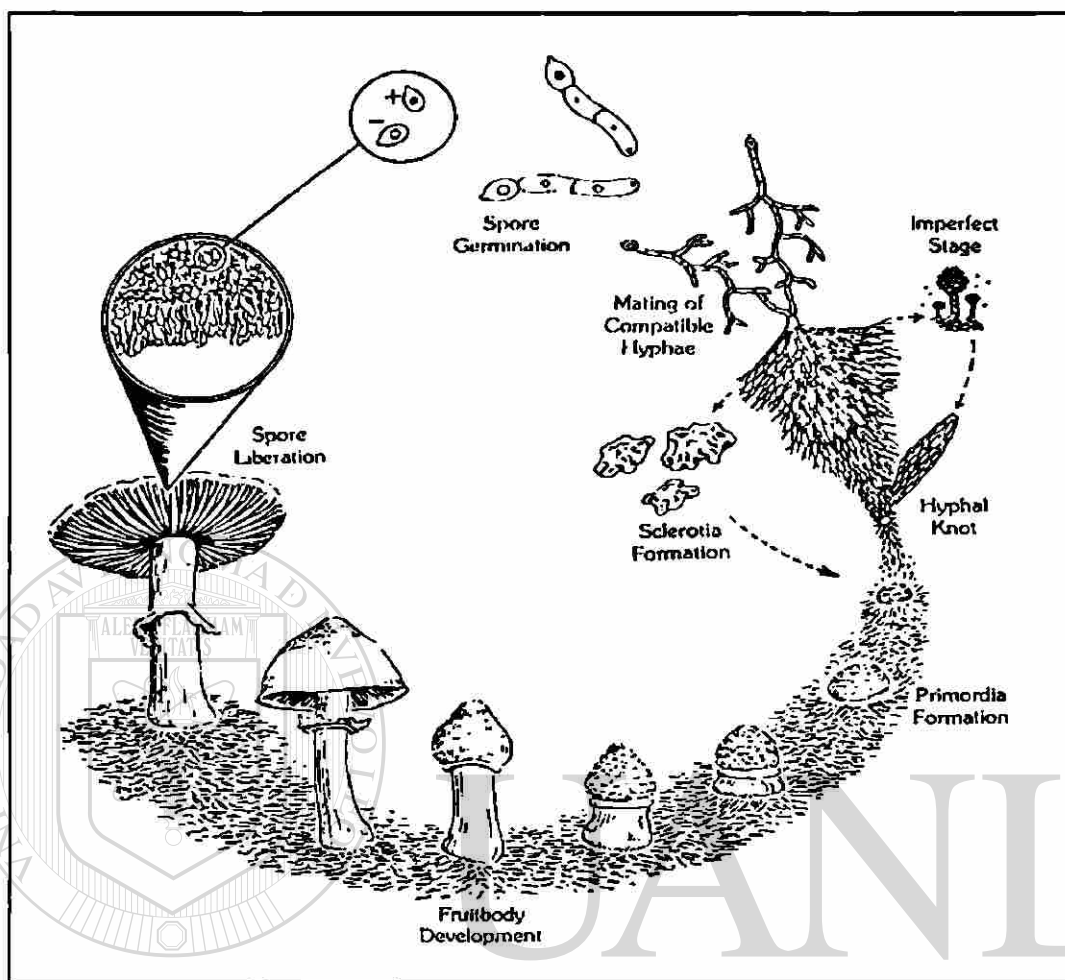


Figura 2. Ciclo de reproducción de los basidiomicetos (Stamets, 1983)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los hongos en la historia

A través de la historia los macromicetos al igual que las plantas han formado parte elemental en la vida del hombre ya que los ha utilizado como alimento, como medicamento y como estimulantes o alucinógenos en ceremonias religiosas. De esta manera los hongos han estado desde tiempos inmemoriales ligados a diversas culturas como la Griega, Romana, Egipcia, Maya y Oriental y han tenido diferentes significados y valores en cada una de ellas^{1,2}.

Los Griegos y Romanos, creían que cuando se presentaba una tormenta, los hongos eran enviados a la tierra por el Dios Júpiter en forma de rayo y que en el lugar donde éste caía, el hongo aparecía de manera mágica debajo de la tierra; ahora se sabe que este hongo corresponde a las trufas, cuyas fructificaciones no se pueden ver, pues éstas crecen por debajo de la tierra. Este hongo comestible es ampliamente utilizado en la cocina mediterránea².

Los egipcios, en cambio, tenían la creencia de que los hongos eran un regalo del Dios Osiris y recientemente se han encontrado algunos recipientes con polvos en las tumbas de los faraones; en un principio se consideró que estos frascos se habían utilizado en rituales, pero en los años 60 se analizaron exhaustivamente y se comprobó que se trataba de mezclas de distintos hongos molidos, no venenosos y todos con propiedades curativas, lo que hizo suponer que fueron colocados en las tumbas como **bagaje medicinal para el gran viaje del muerto hacia la otra vida**^{1,2}.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

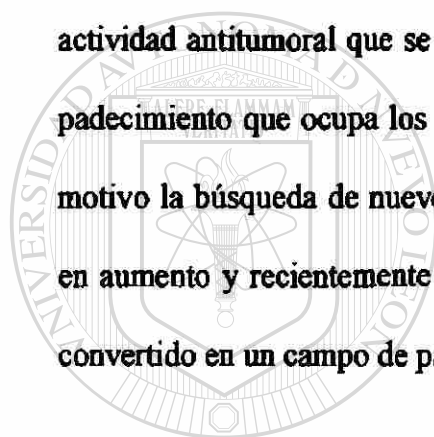
Por otro lado los antropólogos afirman que para las culturas precolombinas de México y Guatemala los hongos eran sagrados, venerados y utilizados en rituales de ceremonias religiosas, ya que, a lo largo de todo el antiguo territorio Maya se han encontrado figurillas de piedra con remates en forma de hongo que datan 3000 años A.C.⁹⁻¹¹.

Los países asiáticos como China, Corea y Japón han utilizado a los macromicetos desde hace más de 7000 años como base de su medicina tradicional y alimentación^{1,12}. Para estas culturas los hongos son "el elixir de la vida" y por esta razón los han incorporado en preparaciones de tónicos, tinturas, tés, sopas y otros alimentos, así como ingredientes de formulas herbales con el fin de obtener beneficios para su salud¹. Dentro de las especies más utilizadas por la cultura oriental se encuentran algunos hongos comestibles a los que se les han atribuido propiedades medicinales como *Lentinus*, *Auricularia*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* y *Tremella*, así como otras especies no comestibles con propiedades medicinales como *Ganoderma* y *Coriolus*¹²⁻¹⁹.

Actualmente el uso de los macromicetos se ha extendido prácticamente en todo el mundo, debido al gran valor ecológico, alimenticio y al potencial medicinal que presentan. En este contexto los basidiomicetos desempeñan un papel muy importante en la vida de los bosques, ya que algunas especies de estos hongos se encuentran formando micorrizas, las cuales son asociaciones simbióticas mutualistas que forman con la mayoría de las raíces de los árboles y además participan en los procesos de biodegradación de la materia orgánica^{1,2,13,20}.

Por otro lado, diversas especies comestibles se han utilizado ampliamente por su sabor y por poseer propiedades medicinales, por lo que recientemente han sido llamados nutraceuticos, es decir, son alimentos que además de proporcionar cantidades importantes de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, tienen la propiedad prevenir y/o curar algunas enfermedades^{13, 15-21}.

En este contexto los macromicetos han tenido en las últimas décadas un gran impacto en el área de la salud, ya que se ha demostrado que algunas especies como *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* y *Calvatia gigantea*, entre otras, utilizadas ampliamente en la medicina tradicional de China, Corea y Japón¹³⁻¹⁵, poseen efectos potencialmente terapéuticos entre los que se incluyen efectos hipoglucemiantes, hipocolesterolemiantes, antihipertensivos, analgésicos, antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales e inmunomoduladores²²⁻²⁹. De particular interés ha sido la actividad antitumoral que se ha reportado para algunos de ellos, ya que el cáncer es un padecimiento que ocupa los primeros lugares de morbilidad en el mundo. Por tal motivo la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con actividad antineoplásica ha ido en aumento y recientemente el estudio de la actividad antitumoral de los hongos se ha convertido en un campo de particular interés.



UANL

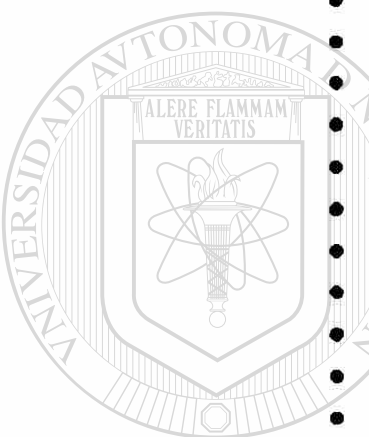
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Especies de hongos medicinales utilizados en la medicina tradicional de China, Corea y Japón

- *Agaricus blazei*
- *Armillaria mellea*
- *Auricularia auricula*
- *Boletus edulis*
- *Calvatia gigantea*
- *Dendropolyporus umbellatus*
- *Flammulina velutipes*
- *Ganoderma lucidum*
- *Ganoderma applanatum*
- *Grifola frondosa*
- *Hericium erinaceous*
- *Inonotus obliquus*
- *Lentimus edodes*
- *Pleurotus ostreatus*
- *Pholiota nameko*
- *Poria cocos*
- *Schizophyllum commune*
- *Trametes (Coriolus) versicolor*
- *Tremella fuciformis*
- *Volvariella volvacea*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los macromicetos se han postulado como nuevas fuentes naturales potenciales de compuestos bioactivos, ya que se han aislado a partir del micelio y cuerpos fructíferos de estos hongos una gran variedad de componentes macromoleculares tales como polisacáridos, proteoglucanos y ácidos nucleicos, los cuales han demostrado poseer actividad antitumoral relacionada con la activación de la respuesta inmune del hospedero^{13,30-33}.

A pesar de que los países asiáticos han utilizado a los macromicetos ampliamente en su medicina tradicional, la actividad antitumoral de los mismos fue demostrada por primera vez en 1957 por Lucas y cols.³⁴ quienes emplearon extractos acuosos obtenidos de carpóforos de *Boletus edulis* y observaron que dichos extractos inhibían el crecimiento del tumor S180 implantado en ratones. Posteriormente, en 1960 Lucas y cols.³⁵ aislaron a partir de carpóforos de *Calvatia gigantea* un compuesto al cual llamaron Calvacina, este compuesto mostró tener actividad antitumoral *in vitro* hacia líneas celulares de Sarcoma 180, carcinoma 755, Leucemia L-1210 y HeLa.

En 1969 Ikekawa y cols.³⁶ reportaron que los extractos acuosos obtenidos de cuerpos fructíferos de siete hongos comestibles silvestres: *Auricularia auricula-judae*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *P. spodoleucus*, *Tricholoma matsutake*, tenían actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Recientemente, la investigación de los hongos medicinales se ha enfocado principalmente al aislamiento de compuestos con actividad antitumoral, mediada por el sistema inmune. En este contexto las especies más estudiadas son *Lentinus edodes* o Shiitake, *Ganoderma lucidum* o Reishi, *Coriolus versicolor* o Kowaratake y *Grifola frondosa* o Maitake¹³. Las sustancias antitumorales aisladas de estos macromicetos son principalmente polisacáridos y proteoglucanos, los cuales han recibido una especial atención debido a que son poco tóxicos. Los polisacáridos y proteoglucanos mejor estudiados son los denominados: Lentinan, LEM, LAP y KS-2 de *Lentinus edodes*, PSK y PSP de *Coriolus versicolor* y PSG de *Ganoderma lucidum*^{13,37-40}.

Lentinus edodes

Lentinus edodes, es un hongo silvestre y comestibles, actualmente constituye el segundo hongo más cultivado en el mundo, después de *Agaricus bisporus* (Champiñón)³⁷. La actividad antitumoral de este hongo se demostró en 1969 por Chihara y cols.⁴¹ quienes aislaron de carpóforos de este hongo un polisacárido al que llamaron Lentina, el cual administrado vía oral (v.o.) e intraperitoneal (i.p.) produjo una regresión completa del tumor S180 transplantado en ratones CD1/ICS. Posteriormente en 1977 Bluhm⁴², elucidó la estructura química de este compuesto, utilizando métodos de cristalografía y comprobó que se trataba de un polisacárido β -D-glucano lineal con enlaces (1-3), poco soluble en agua y con un peso molecular entre 950 y 1050 KDa.

En 1978 Chihara³⁹ observó que la actividad antitumoral de la Lentina se producía por estimulación del sistema inmune, posteriormente en 1987 Chihara y cols.⁴³ observaron que la Lentina aumentaba la producción de citocinas como IL-1, IL-2, FNT- α , así como la activación de células T, células B, Células NK y macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En 1978 Fujii y cols.⁴⁴ aislaron a partir de extractos acuosos de micelio de *Lentinus edodes* mediante precipitación con etanol un polisacárido al que llamó KS-2, este compuesto inhibió el crecimiento de tumores implantados en ratones, al ser administrado v.o. e i.p. En estos ratones se observó un aumento de los niveles séricos de interferón, con la consecuente activación de macrófagos.

Otros polisacáridos antitumorales obtenidos de *Lentinus edodes* son el LEM y LAP, los cuales se obtuvieron a partir de micelio y medio de cultivo respectivamente, ambos son activos v.o. e i.p. produciendo un efecto antitumoral en animales y en el humano. En 1987 Lin y cols.⁴⁵ reportaron que este efecto está mediado por la activación del sistema inmune del hospedero.

De todos los polisacáridos obtenidos de *Lentinus edodes*, la Lentina ha sido la más estudiada y actualmente se encuentra en estudios fase clínica, al respecto se ha demostrado que la combinación de Lentina con otras drogas antineoplásicas incrementa la reducción del tamaño del tumor y prolonga la vida en pacientes con cáncer gástrico^{46,47}.

Grifola frondosa

La fracción D extraída de cuerpos fructíferos de *Grifola frondosa* contiene β -D-glucanos con enlaces (1-3) y ramificaciones (1-6). Esta fracción es un modificador de la respuesta biológica (MRB) al igual que Lentina, obtenida de *Lentinus edodes*. Estos polisacáridos estimulan la actividad de células inmunocompetentes como macrófagos, células T cooperadoras y células T citotóxicas, las cuales son las encargadas de la destrucción de células tumorales⁴⁸. En 1987 Namba y cols.⁴⁹⁻⁵⁰ reportaron que al administrar la fracción D, v.o. e i.p. a ratones con tumores implantados, ésta produjo una disminución del 86% del tamaño de los tumores sin causar efectos adversos.

Posteriormente, esta fracción se utilizó en estudios clínicos en pacientes con cáncer de pulmón y mama en estadio II-IV, en estos pacientes la fracción D produjo un aumento en los niveles de IL-2, dicho aumento se relacionó con la activación de macrófagos y células NK⁵¹.

Coriolus versicolor

Coriolus versicolor es un hongo que pertenece a la familia Poliporaceae y ha sido utilizado ampliamente en la medicina tradicional de China y Japón para el tratamiento de cáncer^{1,14}. A partir de cultivos de micelio de este hongo se aisló un complejo polisacárido-proteína (proteoglucano) altamente soluble en agua, de peso molecular de 94 KDa denominado PSK. Este compuesto se comercializa con el nombre de Krestin® y se ha utilizado en el tratamiento de cáncer colorectal y como coadyuvante en la quimioterapia, radioterapia y cirugía de pacientes con cáncer gastrointestinal, cervicouterino, de mama y de pulmón^{52,53}.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En 1993 Yang⁵⁴ observó que el PSP, un polisacárido aislado a partir de extractos de micelio de *Coriolus* mediante precipitación con etanol produjo una inhibición completa del tumor S180 implantado en ratón.

Ganoderma lucidum

Ganoderma lucidum es conocido en China y Japón como el hongo de la longevidad y se utiliza ampliamente en estos países para el tratamiento del cáncer^{1,13,55}. El PSG es un polisacárido soluble en agua, aislado a partir de extractos acuosos de carpóforos de *Ganoderma lucidum*. En 1985 Sone y cols.⁵⁶ reportaron que este compuesto produjo una inhibición significativa en el crecimiento del tumor S180 implantado en ratones y disminuyó las metástasis. En 1984 Mizuno y cols.⁵⁷ reportaron que la actividad antitumoral del PSG estaba mediada por el sistema inmune ya que este compuesto produjo un aumento en la actividad de macrófagos y linfocitos T, así como en la promoción, síntesis y liberación de varios tipos de citocinas, incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF- α , y IFN- γ , los cuales tienen un papel muy importante en la regulación de la respuesta del sistema inmune, así como en la supresión del crecimiento de células tumorales. Por otro lado, se ha reportado que los extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de carpóforos de *Ganoderma lucidum* tienen actividad antioxidante al atrapar radicales libres como el radical superóxido e hidroxilo^{58,59}.

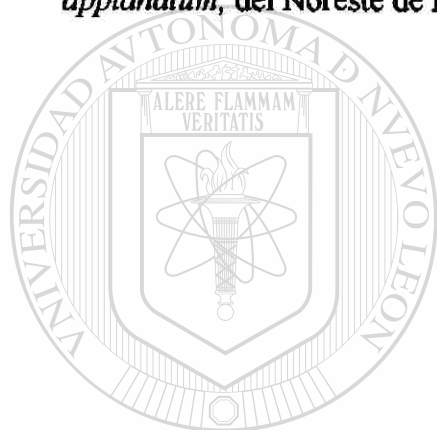
Recientemente se han aislado una gran cantidad de polisacáridos y proteoglucanos bioactivos a partir de carpóforos de macromicetos y todos han mostrado poseer actividad antitumoral mediada por el sistema inmune⁶⁰.

A pesar de que México es un país destacado por su alta diversidad de macromicetos ya que se estima que existen aproximadamente 200 000 especies en el país, la evaluación de la actividad biológica de los mismos constituye a la fecha un campo poco explorado en nuestro país por este motivo y basados en los antecedentes reportados para los macromicetos que crecen en países orientales se inició un estudio sistemático encaminado a la evaluación de la actividad biológica de las especies de macromicetos que crecen en nuestro país con el propósito de determinar cuales de ellas poseen efectos potencialmente terapéuticos y postularlos de esta manera como posibles fármacos o fuentes naturales para la obtención de fármacos activos contra el cáncer u otros padecimientos relacionados en los que esté involucrado el sistema inmune.

En este trabajo se evaluó la citotoxicidad selectiva, el estrés celular oxidativo y el efecto inmunomodulador de extractos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* del noreste de México, las cuales fueron seleccionadas en base a criterios etnofarmacológicos y quimitaxonómicos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la Citotoxicidad Selectiva, Estrés Oxidativo y el Efecto Inmunomodulador, de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, del Noreste de México.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. **Aislar cultivos puros de macromicetos a partir de cuerpos fructíferos.**
2. **Cultivar los macromicetos en fase acuosa a partir de muestras obtenidas en fase sólida.**
3. **Obtener extractos de la biomasa de las especies cultivadas.**
4. **Evaluar la citotoxicidad selectiva de los extractos de la biomasa.**
5. **Evaluar el estrés oxidativo de los extractos de la biomasa.**
6. **Evaluar el efecto inmunomodulador de los extractos de la biomasa.**
7. **Fraccionamiento inicial biodirigido de los extractos que resulten más activos o de particular interés.**

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1.1 MATERIAL FUNGICO

En este estudio se utilizaron carpóforos frescos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis*, y *Ganoderma applanatum* recolectados en bosques templados de coníferas y de encinos del municipio de Galeana, N.L., en el año 2001.

Los hongos fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Departamento de

Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.1.1.2 LINEAS CELULARES

Para los cultivos celulares se utilizaron dos líneas celulares hepáticas de origen humano: Células de hígado de Chang (CCL13) origen normal y células de hepatoma HepG2 (HB8065) origen neoplásico obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, EUA.

2.1.1.3 ANIMALES

Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa BALB/c entre 8 y 12 semanas de edad, con un peso promedio de 30-35 g, los cuales se mantuvieron en jaulas de acrílico con tapa de rejilla metálica, bajo condiciones estándar de laboratorio: ciclo luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de 22°C y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

2.1.1.4 GLOBULOS ROJOS DE CARNERO

Los glóbulos rojos de carnero se obtuvieron del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL.

2.1.2 MATERIAL Y EQUIPO GENERAL

Asa bacteriológica de platino (Baxter)

Autoclave Market Forge Sterilmatic

Balanza analítica Mettler-Toledo AB204

Balanza granataria Mettler- Toledo PB3001

Batidora manual Braun multiquick

Cajas de Petri desechables (Corning)

Cámara de Neubauer

Campana de Flujo laminar (Labconco)

Centrifuga Beckman Spinchrone

Equipo de disección

Espectrofotómetro Bio Assay Reader HTS7000 (Perkin Elmer)

Frascos de cultivo T25 Costar 3055

Frascos de vidrio de 100, 250 y 500 mL con tapón de rosca (Pyrex)

Matraces erlenmeyer de fondo plano de 500 mL (Pyrex)

Matraces erlenmeyer de diferentes capacidades (Pyrex)

Membranas de filtración de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore)

Microscopio Binocular (Carl Zeiss)

Invertoscopio Axiovert 100 (Carl Zeiss)

Incubadora modelo 5410 (Napco)

Liofilizador VirTis Freezemobile 12 mod. 6211-0120

Papel filtro Whatman número 1

Placa de Calentamiento con agitador magnético (Sigma)

Placas para cultivo celular de 96 celdillas (Costar)

Pipetas automáticas y puntillas 10-100 μL , 20-200 μL y de 100-1000 μL (Eppendorf) [®]

Pipetas lineales de 25, 10 y 5 mL

Pipetas Pasteur desechables (Kimble)

Pipeteador automático Pipet-aid (Sigma)

Portaobjetos de vidrio 25X75 (Corning)

Potenciómetro Φ 320 pH Meter (Beckman)

Probetas de diferentes capacidades (Pyrex)

Puntillas para pipetas automáticas

Rotavapor 011 Büchi

Vasos de precipitado de diferentes capacidades

Vórtex (American Scientific Products)

2.1.3 REACTIVOS

2.1.3.1 Reactivos para Aislamiento y Cultivo de Micromicetos *in vitro*

Agar DIFCO

Agua bidestilada

Cloruro de calcio Merck

Cloruro férrico Sigma

Cloruro de sodio Sigma

D-(+) glucosa Sigma

Extracto de levadura Bioxon

Extracto de malta Bioxon

Fosfato de amonio Sigma

Fosfato de potasio monobásico Sigma

Hidrocloruro de tiamina Sigma

Sulfato de magnesio heptahidratado PQM

Ácido cítrico monohidratado PQM

Fosfato de sodio dibásico Baker



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

2.1.3.2 Reactivos para extracciones y fraccionamiento

Ácido acético glacial	PQM
Agua destilada	
Etanol	Fermont
Hidróxido de sodio	PQM
Metanol	Fermont
Oxalato de amonio	Fermont

2.1.3.3 Reactivos para cultivo de líneas celulares, prueba de MTT y prueba de

DCFDA

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

Dimetil sulfóxido (DMSO) Sigma

Fosfato de sodio monobásico Sigma

Fosfato de potasio dibásico Sigma

Medio esencial mínimo (MEM) Sigma

Suero fetal bovino Sigma

Tripsina Sigma

Xantina oxidasa grado IV Sigma

2.1.3.4 Reactivos para la técnica de Jerne modificada por Cunningham

Acetona	PQM
Ácido acético glacial	PQM
Cloruro de sodio	Sigma
Medio RPMI1640	Sigma
Metanol	Fermont
Suero fetal de ternera	Sigma
Solución de Hanks	Sigma



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2 METODOS

2.2.1 Recolección, identificación y clasificación de macromicetos

El material fúngico estudiado fue recolectado en el año 2001 en bosque de pino-encino del municipio de Galeana, Nuevo León. Los especímenes recolectados fueron identificados, clasificados y registrados en el departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares.

2.2.2 Aislamiento de macromicetos

Los cultivos puros de macromicetos se obtuvieron siguiendo los principios técnicos para el aislamiento y propagación de tejidos fúngicos utilizando el medio de Melin Norkrans⁶¹.

2.2.2.1 Identificación microscópica de micelio puro

Se tomó una pequeña cantidad de micelio de los cultivos obtenidos y por medio de una asa bacteriológica de platino estéril se realizaron preparaciones con KOH al 10%, posteriormente se observaron al microscopio de luz con diferentes aumentos (10X, 40X y 100X) con el fin de eliminar los cultivos que tuvieran contaminantes.

2.2.3 Cultivo *in vitro* de macromicetos

2.2.3.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido

El cultivo de macromicetos se llevó a cabo en condiciones de esterilidad con campana de flujo laminar y material estéril. A partir de cepas aisladas de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, se tomaron muestras de micelio con un bisturí estéril y se colocaron en cajas de petri que contenían medio modificado de Melin Norkrans, pH 6.5; se utilizó agar como agente solidificante; posteriormente las cajas de petri se sellaron con parafilm y se incubaron a 25 °C durante 4 semanas.

2.2.3.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido

Se tomaron inóculos a partir de cultivos obtenidos en medio sólido de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* y se inocularon matraces erlenmeyer de 500 mL que contenían 150 mL de medio modificado de Melin Norkrans, pH 6.5 y sin el agente solidificante (agar). Los matraces se sellaron con tapones de gasa estéril y papel aluminio, se incubaron a 25 °C y se observó el crecimiento miceliar cada 24 horas durante dos meses.

2.2.4 Obtención de biomasa

Después de dos meses de crecimiento miceliar en medio líquido, la biomasa se recuperó por filtración, se lavó varias veces con agua destilada, y se sometió a proceso de liofilización como método de secado. La biomasa seca se colocó en bolsas de papel estraza, las cuales se sellaron, etiquetaron y se almacenaron en oscuridad a 25 °C para su posterior utilización.

2.2.5 Obtención de extractos a partir de biomasa

2.2.5.1 Obtención de extractos metanólicos

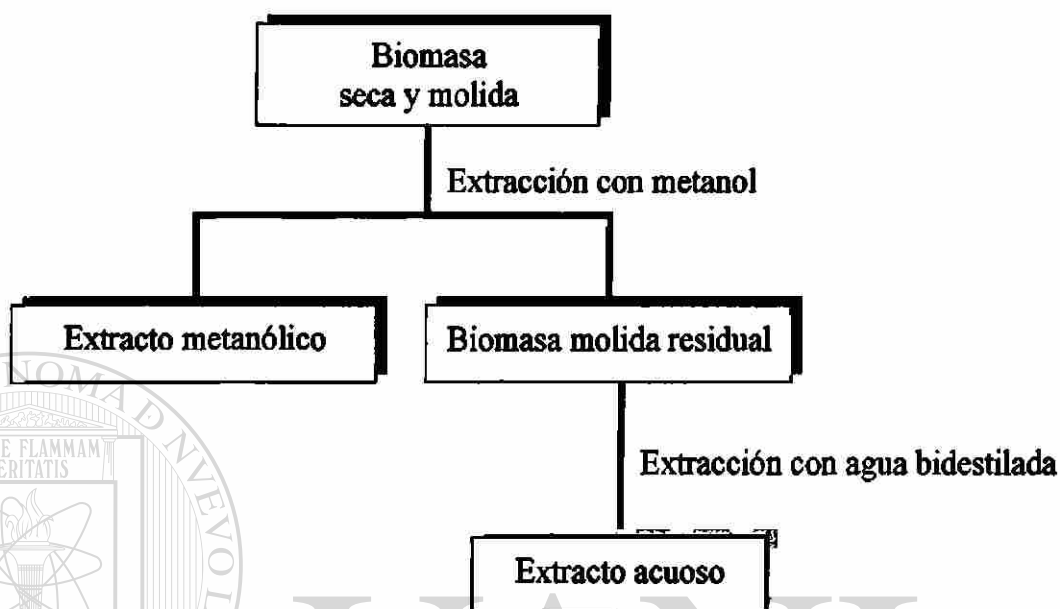
Un gramo de biomasa seca y molida de cada hongo se extrajo tres veces con 25 mL de metanol cada vez. Los extractos metanólicos se evaporaron a presión reducida en rotavapor a 38 °C. Los extractos se recuperaron, se liofilizaron, se pesaron, se etiquetaron y se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz hasta su utilización

(Figura 3).

2.2.5.2 Obtención de extractos acuosos

El residuo que se obtuvo del extracto metanólico de cada hongo, se extrajo 3 veces con 25 mL de agua bidestilada cada vez. Los extractos acuosos se concentraron hasta sequedad en un liofilizador, se pesaron, se etiquetaron y se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz hasta su utilización (Figura 3).

Figura 3. Obtención de extractos metanólicos y acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.



2.2.6 Evaluación de actividad biológica de extractos de macromicetos

2.2.6.1. Evaluación de citotoxicidad selectiva

2.2.6.1.1 Cultivo de líneas celulares benignas y tumorales

Para la evaluación de citotoxicidad selectiva *in vitro* se utilizaron dos líneas celulares de origen humano: Células de hígado de Chang (Benignas) y Células de hepatoma, Hep G2 (Tumorales), las cuales se mantuvieron en frascos de cultivo utilizando como nutriente medio esencial mínimo (MEM) suplementado al 10% con suero fetal bovino. Los frascos se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire, hasta la formación de monocapa celular (2-3 días).

2.2.6.1.2 Cultivo de células hepáticas de origen benigno y tumoral en placas de 96 celdillas

Las monocapas celulares contenidas en frascos para cultivo se expusieron a 1.5 mL de tripsina al 0.25% durante 5 a 15 min para desprender las células del frasco de cultivo y separarlas entre sí. Después de este tiempo se agregaron 1.5 mL de MEM + SFB 10% para bloquear la acción de la tripsina. La viabilidad celular se determinó de acuerdo a la técnica de exclusión del azul de tripano⁶². De esta suspensión celular se tomaron 100 μ L y se colocaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se determinó la concentración celular. La densidad celular se ajustó a 2×10^4 células por cada 0.1 mL. Posteriormente se agregaron 0.1 mL de la suspensión celular a cada pozo de la placa de 96 celdillas, las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire durante 24–48 hrs hasta la formación de monocapa celular.

2.2.6.1.3 Preparación de extractos para la evaluación de citotoxicidad selectiva y estrés oxidativo

Los extractos se disolvieron en el medio de cultivo de las líneas celulares (MEM) y se esterilizaron mediante filtración a través de membranas de 0.22 μ m de diámetro.

2.2.6.1.4 Exposición de líneas celulares benignas y tumorales a los extractos acuosos y metanólicos

Se retiró el medio de cultivo (MEM+SFB10%) de las placas de 96 celdillas que contenían las monocapas celulares, y se les agregó 0.1 mL de MEM a cada celdilla. Se evaluaron doce diferentes concentraciones (rango de 2 mg/mL a 0.98 mg/mL) para cada uno de los extracto acuosos y metanólicos de cada una de las especies evaluadas. Las placas se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire durante 72 hrs. Se utilizaron tres celdillas para cada extracto con cada línea celular. Se dejaron celdillas control las cuales solo recibieron el solvente (MEM). La evaluación se realizó en tres ocasiones diferentes en experimentos separados.

2.2.6.1.5 Evaluación de citotoxicidad selectiva

2.2.6.1.5.1 Evaluación microscópica

Una vez transcurrido el periodo de exposición de las células a los extractos, las células se revisaron microscópicamente con diferentes factores de amplificación (100X, 200X y 300X). El criterio de citotoxicidad evaluado fue la adhesión celular a la placa de cultivo, las celdillas donde todas las células estaban desprendidas se consideraron como celdillas con concentración citotóxica total o cien por ciento CT₁₀₀ y las celdillas con adhesión celular igual a las células de las celdillas control, se consideraron como celdillas con concentración no citotóxica o cero por ciento CT₀.

2.2.6.1.5.2 Prueba de reducción del metiltiazolterazolio (MTT)

Después de la revisión microscópica, se evaluó la capacidad de las deshidrogenasas succínicas mitocondriales de las células viables para reducir el metiltiazolterazolio a formazan de acuerdo al método de Mosman⁶³.

Después del periodo de exposición celular a los extractos, se retiró el medio de la placa de 96 celdillas, se agregaron 0.1 mL de MTT (0.5 mg/mL) en cada celdilla y se agregó 0.2 mL de alcohol isopropílico a cada celdilla; la placa se incubó en oscuridad durante 30 min. Posteriormente se midió la absorbancia a una λ de 540 nm. Las celdillas cuya absorbancia fue cero se consideraron como celdillas con concentración citotóxica total CT_{100} y las celdillas donde la absorbancia fue igual a la de los controles se consideraron como celdillas con concentración no citotóxica CT_0 .

2.2.6.1.6 Cálculo de la concentración citotóxica cincuenta por ciento (CT_{50})

La concentración citotóxica cincuenta por ciento (CT_{50}) de cada uno de los extractos evaluados en los dos tipos celulares (benignas y tumorales) se calculó de acuerdo al criterio de Ekwall⁶⁴.

2.2.7 Evaluación de estrés oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

2.2.7.1 Exposición de células de hígado de Chang a extractos acuosos y metanólicos

Para la evaluación de estrés oxidativo se utilizó el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) como indicador intracelular de especies reactivas de oxígeno (radicales libres), de acuerdo al método de Bass y cols.⁶⁵

El DCFDA es desacetilado intracelularmente a diclorofluoresceína (DCF), el cual fluoresce en presencia de radicales libres presentes dentro de la célula. La prueba de DCFDA de acuerdo al método de Bass y cols. se realizó de la siguiente manera:

Se sembraron placas de 96 celdillas con células de hígado de Chang a una densidad celular de 2×10^4 cel/mL, con los nutrientes ya mencionados y se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire para formación de monocapa celular.

Una vez formada la monocapa se le retiró el medio (MEM) de las placa y se agregaron 0.2 mL de una solución que contenía DCFDA 0.05 mg/mL + Xantina oxidasa 0.06 U/mL a cada celdilla. Las células fueron expuestas a los extractos en el mismo rango de dosis utilizado para evaluar citotoxicidad, las placas se incubaron a 37 °C y se midió la fluorescencia emitida cada hora durante un periodo de 6 horas a una $\lambda=485$ nm de excitación y $\lambda=530$ nm de emisión. Como control positivo de estrés oxidativo se utilizaron celdillas con MEM + DCFDA + Xantina oxidasa y como control negativo se utilizaron celdillas con MEM + DCFDA. La evaluación se realizó en tres ocasiones diferentes en experimentos separados.

2.2.8 Evaluación del efecto inmunomodulador

El efecto de los extractos sobre la respuesta del sistema inmune del ratón BALB/c contra antígenos Timodependientes (Glóbulos rojos de carnero) se evaluó de acuerdo a la técnica de Jerne modificada por Cunningham⁶⁶.

2.2.8.1 Administración de extractos

Para este estudio se utilizaron ratones BALB/c de ambos sexos, los cuales fueron separados en grupos (n = 8) para cada grupo. Después de 6 horas de ayuno, los ratones recibieron mediante sonda orogástrica, una dosis única de 20 mg/Kg de extractos acuosos o metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* respectivamente.

2.2.8.2 Esquema de Administración de extractos

Los extractos acuosos y metanólicos de cada una de las especies evaluadas se administraron de acuerdo al siguiente esquema:

- 1) 24 horas antes de la inmunización.
- 2) Conjunta con la inmunización.
- 3) 24 horas después de la inmunización.

Los grupos controles recibieron el solvente en que se disolvieron los extractos (Agua bidestilada).

2.2.8.3 Inmunizaciones

Todos los ratones se inmunizaron vía intraperitoneal (i.p.). Los ratones que recibieron los extractos se inmunizaron con 0.2 mL de glóbulos rojos de carnero al 10%. Los ratones del grupo control negativo se inmunizaron con 0.2 mL de solución salina estéril al 0.85% y los ratones del grupo control positivo se inmunizaron con 0.2 mL de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10%.

En el apéndice 1 se muestra la preparación del antígeno Timodependiente (Glóbulos rojos de carnero)

2.2.8.4 Determinación de células formadoras de placas hemolíticas

La técnica de Jerne modificado por Cunningham se utilizó para medir la producción de células formadoras de anticuerpos IgM a las 72 horas de inmunización en células de

bazo de ratón y de esta manera se determinó el comportamiento de los extractos acuosos y metánolicos, en relación a los glóbulos rojos de carnero en cuanto a su capacidad para inducir la producción de células formadoras de anticuerpos IgM (CFP-IgM).

2.2.8.5 Obtención de células de bazo

Después de 72 horas de la inmunización, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se realizó un corte en U en la parte superior izquierda del abdomen y se extrajo el bazo libre de tejido adiposo, el cual se colocó en una caja de Petri que contenía 5 mL de solución de Hanks, pH 7.4, posteriormente se disgregó el bazo con pinzas de cirugía.

La suspensión celular obtenida se resuspendió varias veces con una pipeta Paster para deshacer los grumos. Posteriormente la suspensión celular se pasó a un tubo de ensayo de 15 mL el cuál estaba colocado en un baño de hielo. Posteriormente se agregaron 5 mL de la solución de Hanks a la caja de Petri y se volvió a resuspender para recuperar las células que hubiesen quedado adheridas al fondo de la caja Petri y esta suspensión celular se pasó al tubo de ensayo que contenía las primeras células recuperadas. El tubo con la suspensión celular se dejó reposar en forma vertical a 4 °C durante 5 min con el objetivo de que los detritus celulares se sedimentaran. La suspensión de células se pasó con otra pipeta Pasteur a un tubo cónico de 15 mL de capacidad y se centrifugó a 2400 rpm y 4 °C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió golpeando gentilmente en la parte inferior del tubo; se agregaron 10 mL de solución de Hanks, se mezcló perfectamente y se centrifugó bajo las condiciones señaladas anteriormente. Después del segundo lavado, las células se resuspendieron en un volumen de 10 mL de solución de Hanks y se tomaron 2 alícuotas de 0.1 mL, 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 alícuota se colocó en 0.9 mL de ácido acético al 2% (células diluidas 1:10), se mezcló en vórtex y se tomó un volumen de 10 μ L para llenar la cámara de Neubauer, se dejó sedimentar las células dentro de la cámara por 1 min y se determinó la concentración celular.

La suspensión de células se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores, después del tercer lavado, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 10 mL de la solución de Hanks. La densidad celular se ajustó a una concentración de 5×10^6 células/mL en medio RPMI suplementado con suero fetal de ternera al 5% (SFT 5%) el cuál tiene actividad mitogénica sobre las células B.

2.2.8.6 Preparación de células para llenado de cámaras de Cunningham

En tubos de ensaye de 12 X 75 mm, se colocaron 200 μ L de células de bazo ajustadas a una concentración de 5×10^6 células/mL, procedentes de los ratones inmunizados y que recibieron los extractos, así como de los ratones correspondientes a los inmunizados con glóbulos rojos de carnero al 10% (control positivo) y con solución salina al 0.85% (control negativo). Posteriormente se agregó a cada tubo 200 μ L de sistema indicador (Apéndice 1) para la determinación de CFP-IgM. Cada tubo se mezcló perfectamente y se tomó de cada uno un volumen de 150 μ L, los cuales se colocaron en cámaras de Cunningham previamente etiquetadas.

Las cámaras se sellaron por los extremos con una mezcla de parafina-vaselina y se incubaron a 37 °C durante 1 hr; después de la incubación se contaron las placas hemolíticas en un microscopio de bajo poder de iluminación adaptado con una placa de vidrio cuadrículada para facilitar la cuenta.

La construcción de cámaras de Cunningham y los cálculos para la determinación del número de CFP-IgM, se muestran en el apéndice 1.

2.2.9 Fraccionamiento inicial biodirigido de extractos de *Lentinus lepideus*

El fraccionamiento de *Lentinus lepideus* se realizó de acuerdo a los métodos estándar para el fraccionamiento de polisacáridos solubles e insolubles en agua reportados por Mizuno 1986.

A partir de un gramo de biomasa seca y molida de *Lentinus lepideus* se realizaron extracciones metanólicas y acuosas como se describió anteriormente. El extracto metanólico se etiquetó como E1 y el extracto acuoso como E2, ambos se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz. El residuo que se obtuvo al filtrar el extracto acuoso se extrajo tres veces con 25 mL de oxalato de amonio al 1% cada vez, el extracto de oxalato de amonio se etiquetó como E3, se liofilizó y se almacenó a 4 °C protegido de la luz. El residuo que se obtuvo al filtrar el extracto de oxalato de amonio se extrajo tres veces con 25 mL de hidróxido de sodio al 5% cada vez, el extracto de hidróxido de sodio se etiquetó como E4, se liofilizó y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

2.2.9.1 Precipitación fraccionada

2.2.9.1.1 Obtención de fracciones FI y FII

Los extractos E2 y E3 se disolvieron en 25 mL de agua bidestilada, posteriormente se les adicionó un volumen equivalente de etanol a 4 °C, hasta la formación de un precipitado, los precipitados obtenidos a partir de E2 y E3 se recuperaron por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los precipitados se dializaron, se liofilizaron y se etiquetaron como FI y FII respectivamente y se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz.

2.2.9.1.2 Obtención de fracciones FIII y FIV

El extracto E4 se disolvió en 25 mL de agua bidestilada y se le agregó ácido acético glacial al 50% para ajustar el pH a 6, inmediatamente se observó la formación de un precipitado el cual se separó por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. El precipitado se dializó, se liofilizó, se etiquetó como FIII y se almacenó a 4 °C protegido de la luz. Al sobrenadante obtenido en el paso anterior se le agregó un volumen equivalente de etanol a 4 °C hasta la formación de un precipitado, el cual se recuperó por centrifugación, se liofilizó, se etiquetó como FIV y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

2.2.10 Evaluación de actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV

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

Citotoxicidad selectiva

- a) Revisión microscópica
- b) Prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)

Estrés oxidativo

- a) Prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

Efecto inmunomodulador

- a) Técnica de Jerne modificada por Cunningham

La metodología utilizada para evaluar la actividad biológica de FI, FII, FIII y FIV fue la misma que se describió anteriormente para la evaluación de los extractos acuosos y metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

2.2.11. Análisis estadístico

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

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Material fúngico

La figura 4 muestra los carpóforos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*. Estos hongos fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares.

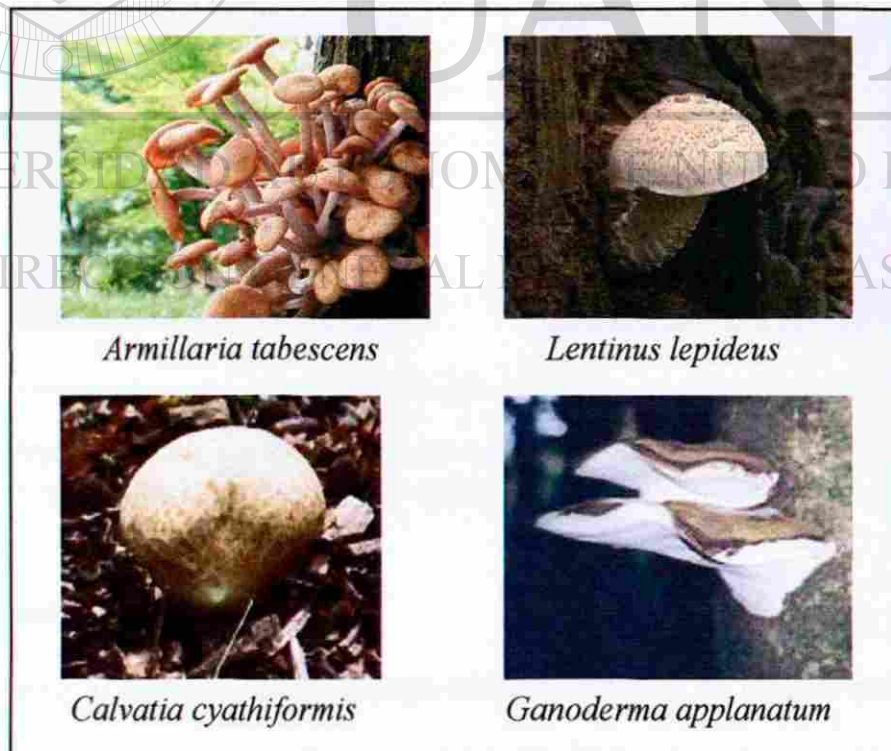


Figura 4. Aspecto de los carpóforos de las especies de macromicetos evaluadas.

3.2 Aislamiento de macromicetos

Las cepas aisladas en cultivo puro fueron obtenidas al llevar a cabo transferencias sucesivas en medios de cultivo selectivos a fin de eliminar los contaminantes no deseados. La figura 5 muestra los resultados.

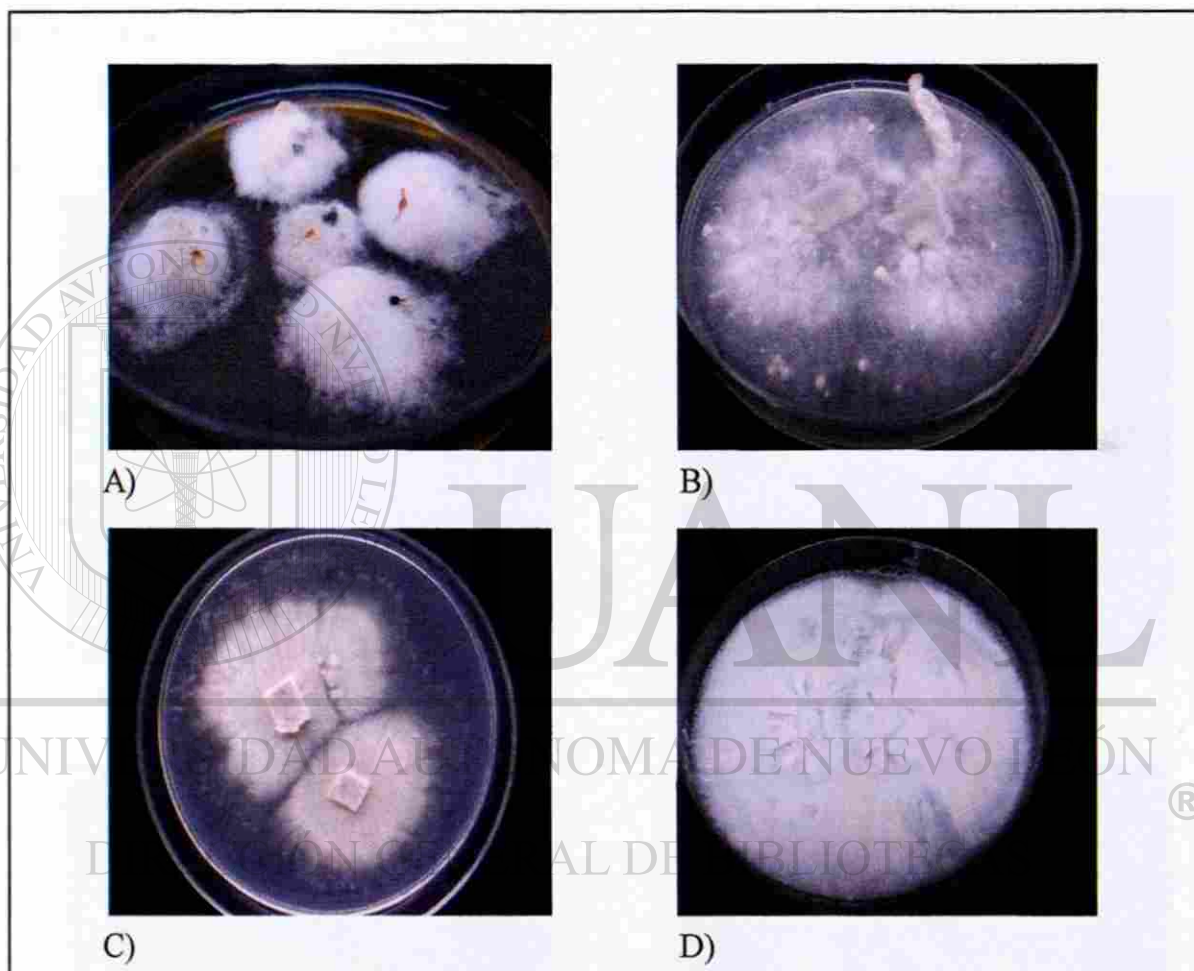


Figura 5. Cepas aisladas de carpóforos: A) *Armillaria tabescens*, B) *Lentinus lepideus*, C) *Calvatia cyathiformis*, D) *Ganoderma applanatum*. .

3.3 Identificación de Cultivos puros

Se revisaron al microscopio compuesto las preparaciones de micelio con diferentes aumentos (10X, 40X y 100 X). En todas las preparaciones se observó la presencia de estructuras fúngicas conocidas como hifas ramificadas y septadas características de los basidiomicetos.

3.4 Cultivo *in vitro* de macromicetos

3.4.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido

En la figura 6 se muestra el crecimiento miceliar en medio sólido de Melin Norkrans, incubados a 25 °C, durante 3 a 4 semanas. En estos cultivos se utilizó agar como agente solidificante.

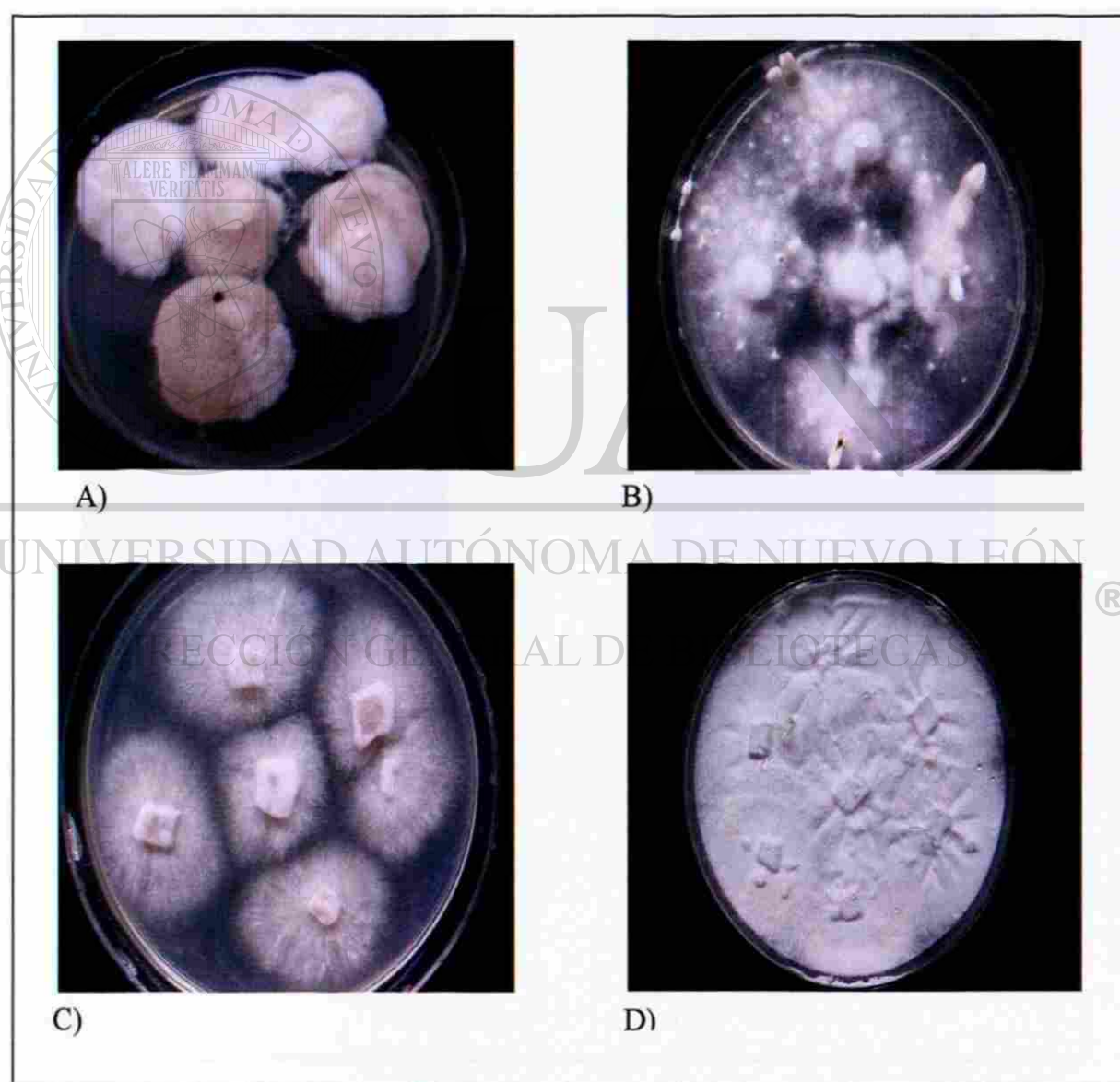


Figura 6. Aspecto del crecimiento miceliar en medio sólido: A) *Armillaria tabescens*, B) *Lentinus lepideus*, C) *Calvatia cyathiformis*, D) *Ganoderma applanatum*.

3.4.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido

En la figura 7 se muestra el crecimiento miceliar de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en medio líquido de Melin Norkrans e incubados a 25 °C, durante 2 meses.

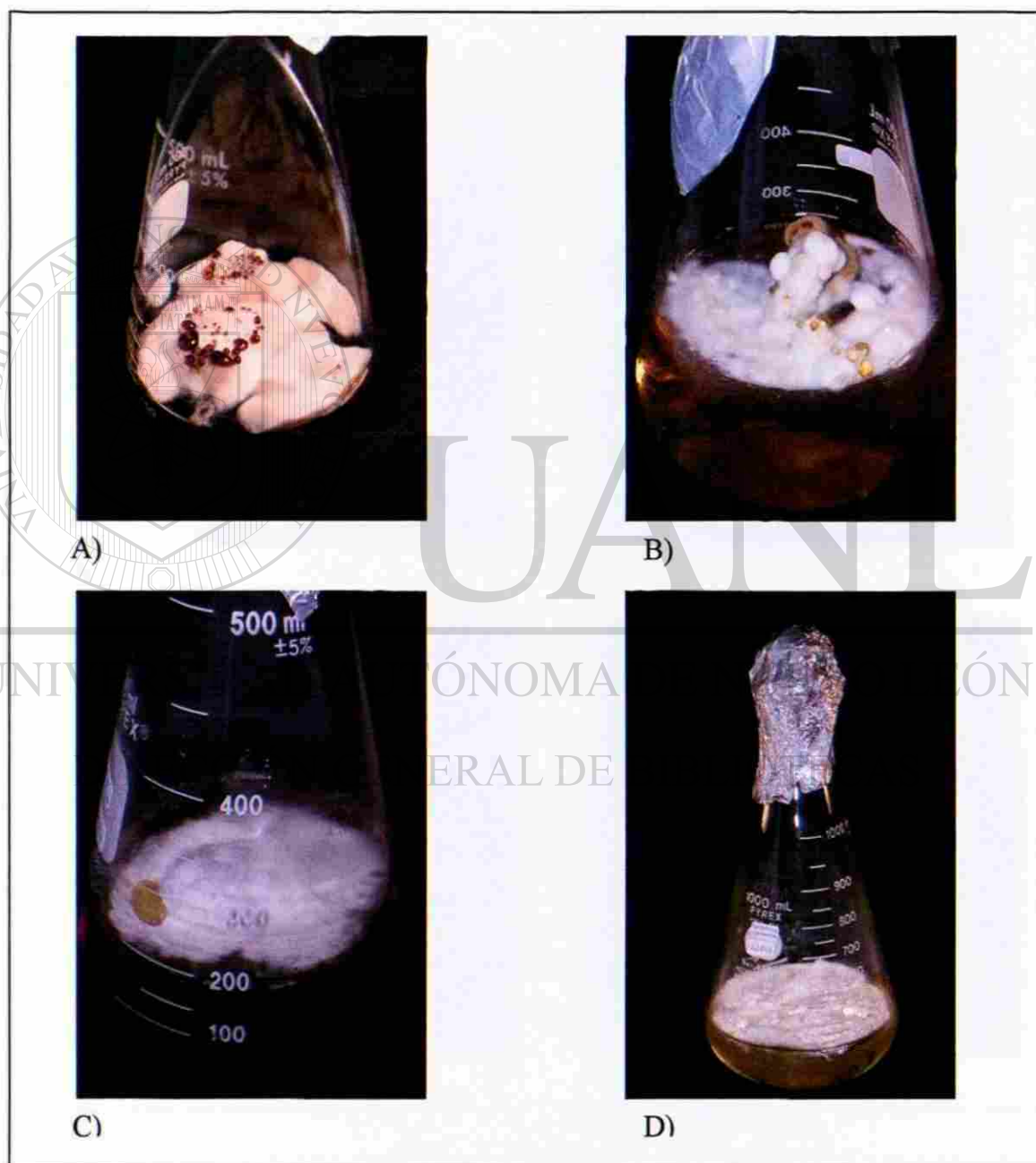


Figura 7. Aspecto de los cultivo de macromicetos en medio líquido: A) *Armillaria tabescens*, B) *Lentinus lepideus*, C) *Calvatia cyathiformis*, D) *Ganoderma applanatum*.

3.5 Obtención de biomasa de macromicetos

En las figura 8 se muestra la biomasa filtrada de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, obtenida a los dos meses de incubación a 25°C.

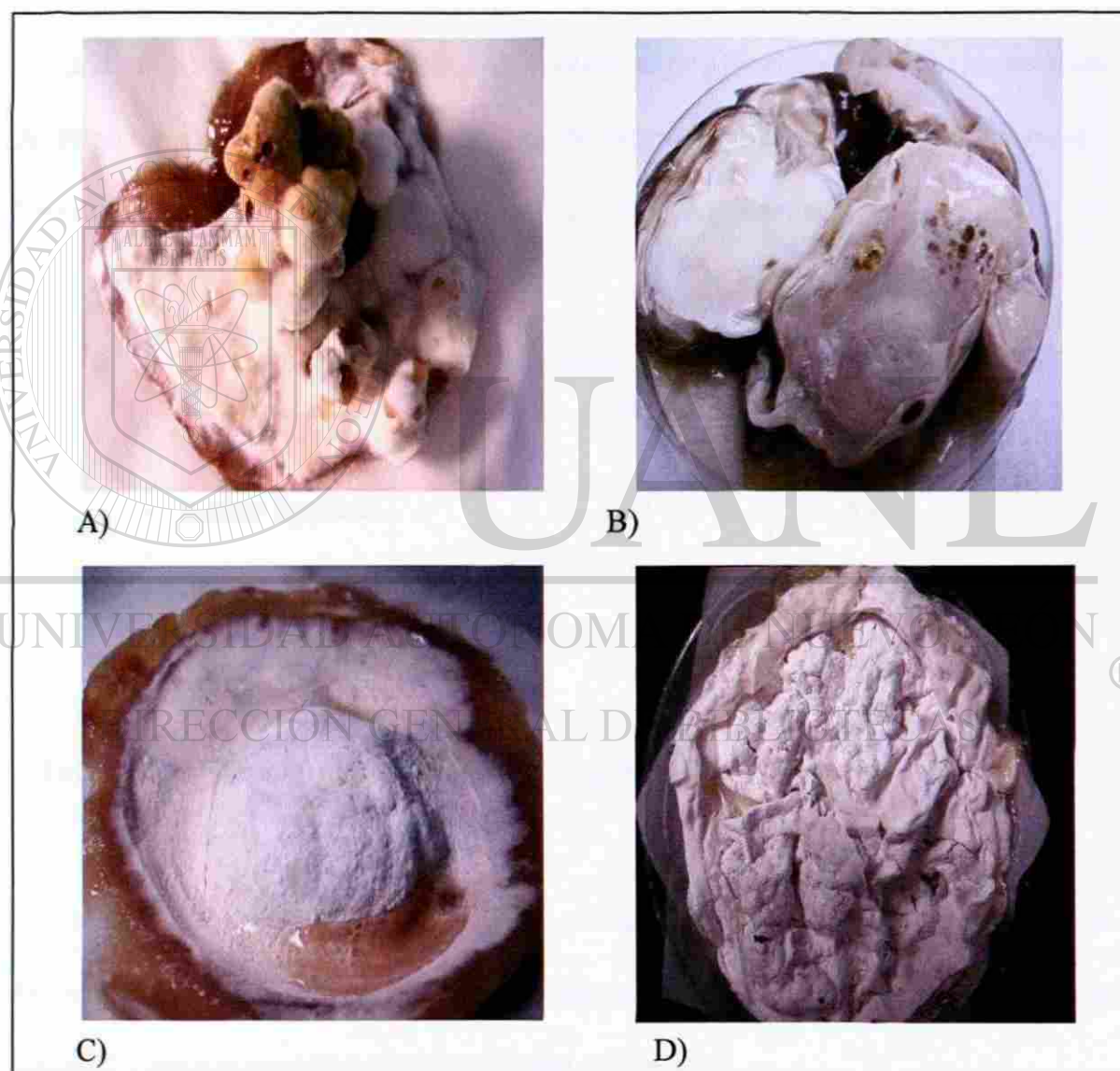


Figura 8. Aspecto de la biomasa filtrada: A) *Armillaria tabescens*, B) *Lentinus lepideus*, C) *Calvatia cyathiformis*, D) *Ganoderma applanatum*.

3.6 Obtención de extractos metanólicos y acuosos

Las extracciones metanólicas y acuosas se realizaron a partir de de biomasa seca y molida de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

En la tabla I se muestran las cantidades obtenidas (mg) y el porciento de recuperación de extractos metanólicos a partir de 1 g de biomasa seca de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

Extractos metanólicos	Cantidad obtenida (mg)	Recuperación (%)
<i>Armillaria tabescens</i>	43.7	4.37
<i>Lentinus lepideus</i>	54.2	5.42
<i>Calvatia cyathiformis</i>	33.8	3.38
<i>Ganoderma applanatum</i>	54.2	5.42

Tabla I. Miligramos (mg) y porciento de recuperación (%) de extractos metanólicos.

En la tabla II se muestran las cantidades obtenidas y el porciento de recuperación de extractos acuosos a partir de 1 g de biomasa seca de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

Extractos acuosos	Cantidad obtenida (mg)	Recuperación (%)
<i>Armillaria tabescens</i>	159.2	15.92
<i>Lentinus lepideus</i>	118.0	11.80
<i>Calvatia cyathiformis</i>	141.5	14.15
<i>Ganoderma applanatum</i>	126.0	12.60

Tabla II. Miligramos (mg) y porcentaje de recuperación (%) de extractos acuosos.

3.7 Evaluación de citotoxicidad selectiva

3.7.1 Revisión microscópica y prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)

Después de la exposición de las células de hígado de Chang y de hepatoma a los extractos acuosos y metanólicos de macromicetos, se determinó que la concentración

citotóxica cincuenta por ciento (CT₅₀) de extractos acuosos y metanólicos de *Armillaria tabescens* y *Lentinus lepideus* obtenidas por evaluación microscópica y con la prueba de

reducción del MTT fue de 500 µg/mL para ambos tipos celulares. En el caso de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* la CT₅₀ obtenida por evaluación microscópica y con la prueba de reducción del MTT fue de 700 µg/mL para ambos tipos celulares. La comparación de los resultados obtenidos en las dos líneas celulares mostró que no hubo diferencia significativa entre las CT₅₀ obtenidas con los dos parámetros de citotoxicidad evaluados.

En la tabla III se muestran los valores de CT_{50} obtenidos mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT, para extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

CT ₅₀ después de 72 hrs de exposición a extractos metanólicos				
CT ₅₀ (µg/mL)				
Línea celular	<i>Lentinus lepideus</i>	<i>Armillaria tabescens</i>	<i>Calvatia cyathiformis</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>
Chang liver	500	500	700	700
Hep G2	500	500	700	700

Tabla III. Valores de CT_{50} obtenidos para extractos metanólicos de macromicetos, mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT.

En la tabla IV se muestran los valores de CT_{50} obtenidos mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT, para extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

CT ₅₀ después de 72 hrs de exposición a extractos acuosos				
CT ₅₀ (µg/mL)				
Línea celular	<i>Lentinus lepideus</i>	<i>Armillaria tabescens</i>	<i>Calvatia cyathiformis</i>	<i>Ganoderma applanatum</i>
Chang liver	500	500	700	700
Hep G2	500	500	700	700

Tabla IV. Valores de CT_{50} obtenidos para extractos acuosos de macromicetos, mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT.

3.8 Evaluación de estrés celular oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

3.8.1 Extractos metanólicos

Al evaluar el efecto de los extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa (inductor de radicales libres) se observó que los extractos de las cuatro especies evaluadas inhibieron la actividad oxidativa de esta enzima.

El efecto de los extractos metanólicos de *Armillaria tabescens* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 9.

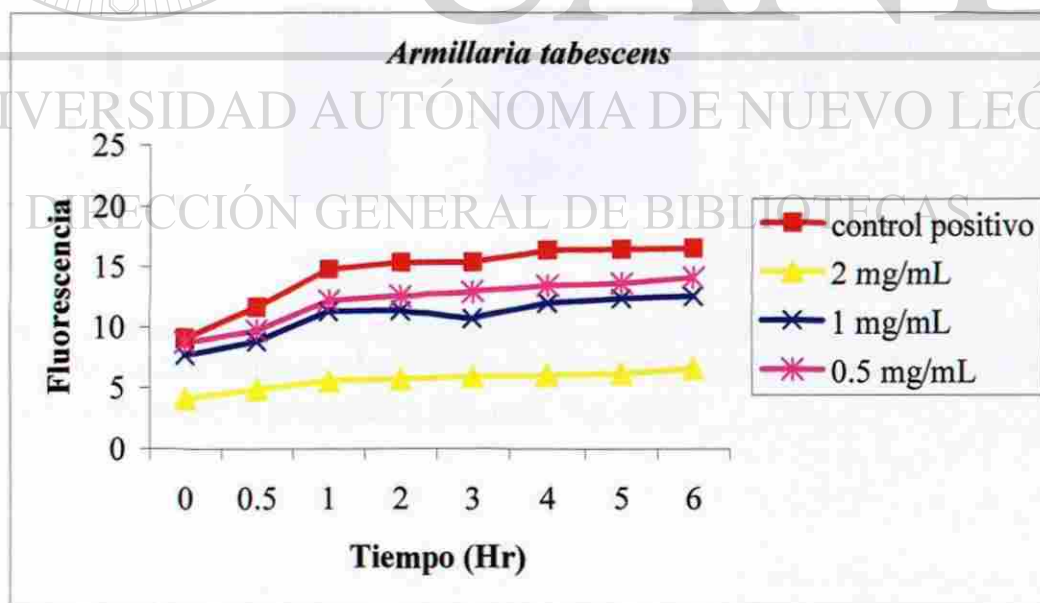


Figura 9. Efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (61.5%) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL. (Figura 10).

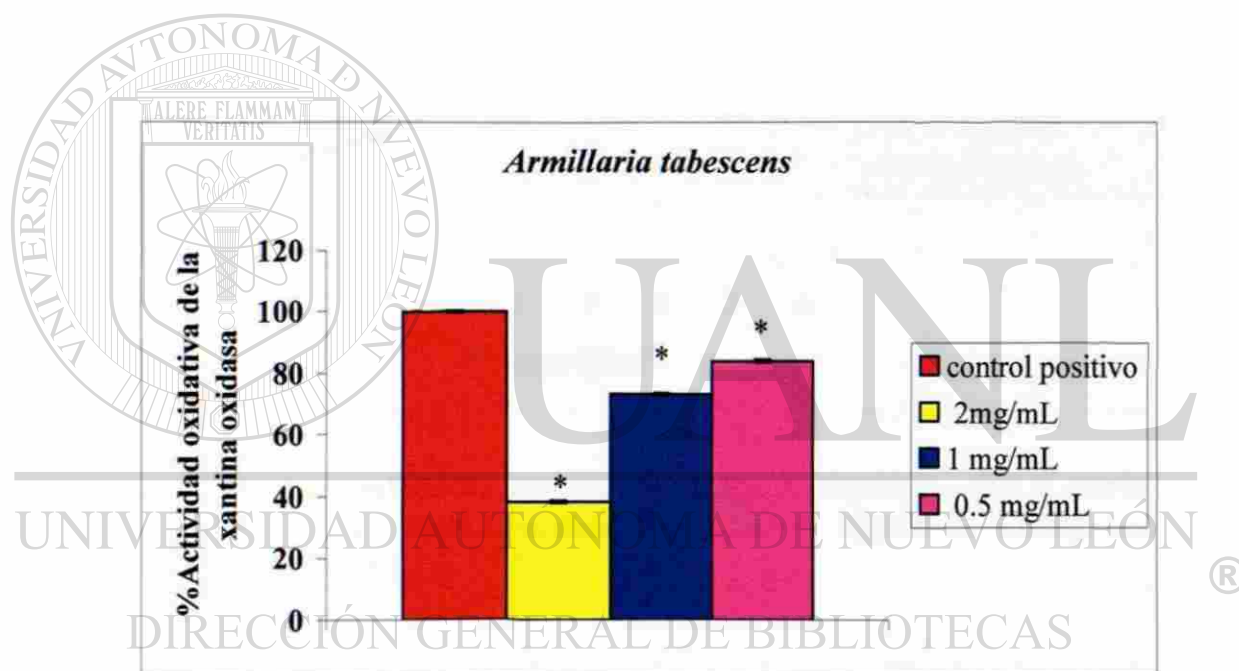


Figura 10. Efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens* sobre la actividad oxidativa de xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3. * p < 0.05

El efecto de los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 11.

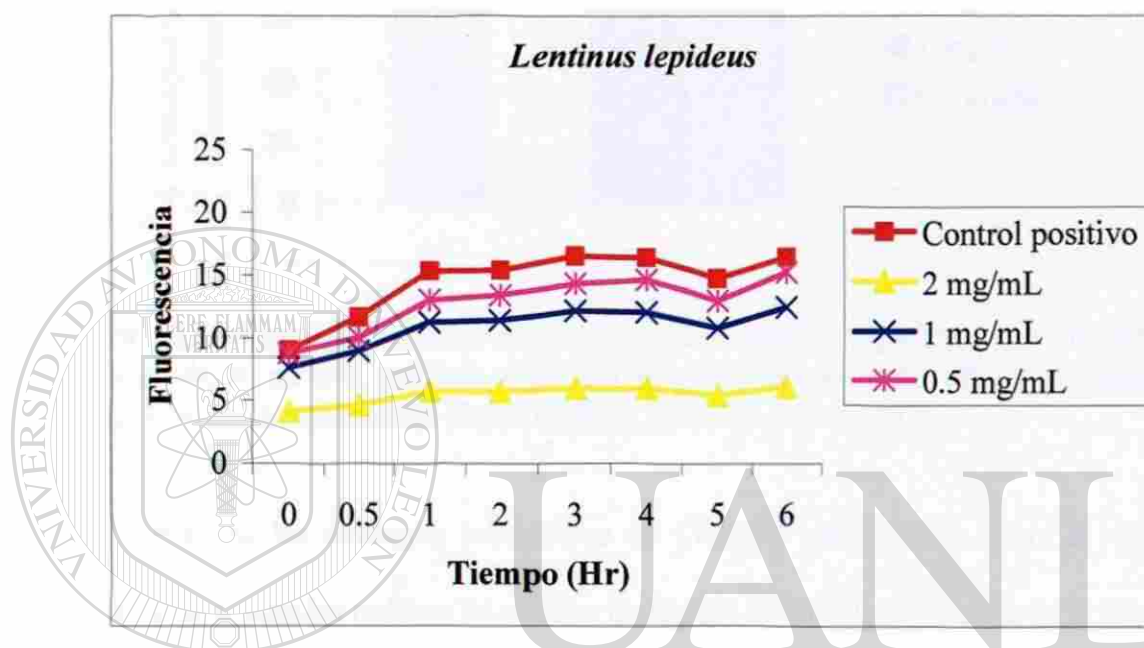


Figura 11. Efecto de extractos metanólicos de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (62.8%) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL (Figura 12).

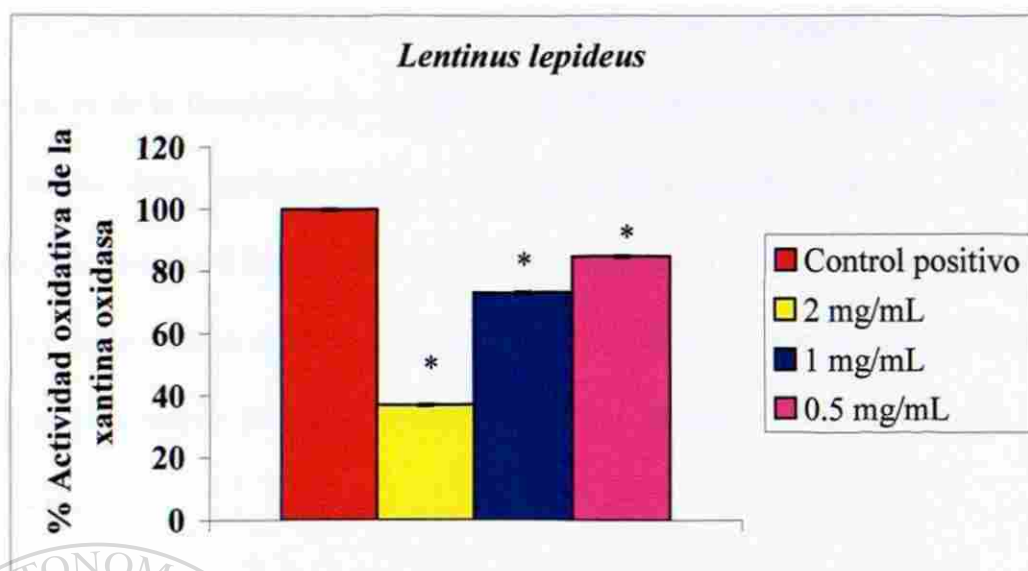


Figura 12. Efecto de extractos metanólicos de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$. * $p < 0.05$

El efecto de los extractos metanólico de *Calvatia cyathiformis* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 13.

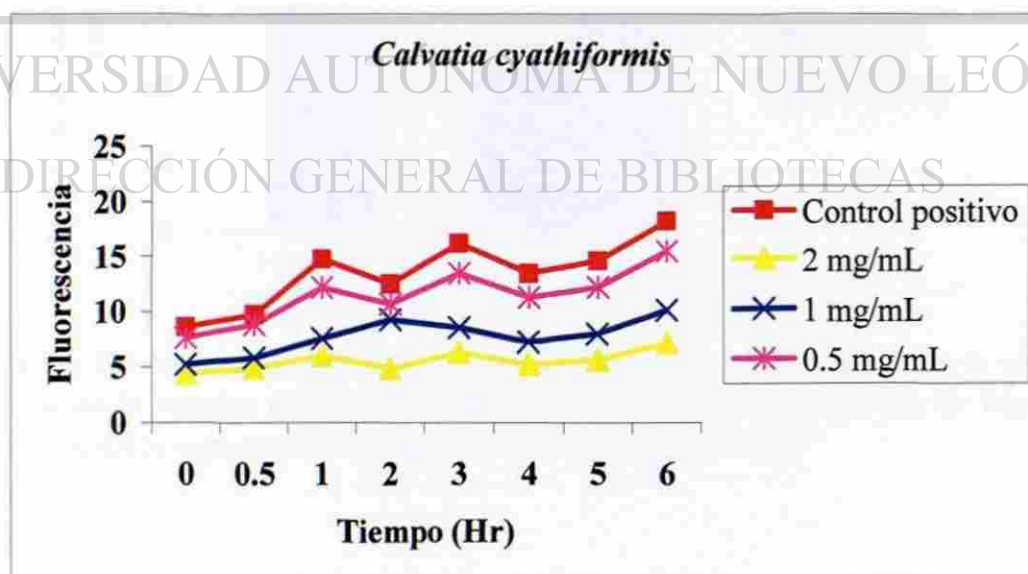


Figura 13. Efecto de extractos metanólicos de *Calvatia cyathiformis* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (59 %) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL (Figura 14).

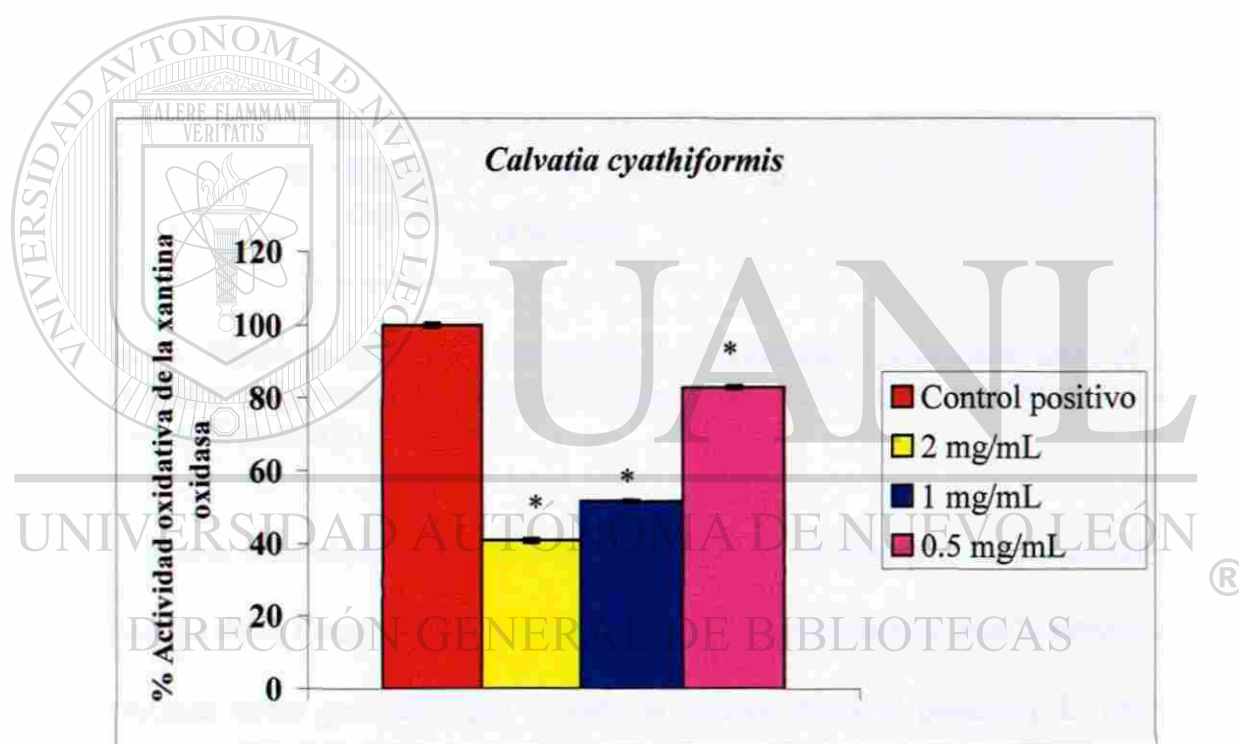


Figura 14. Efecto de extractos metanólicos de *Calvatia cyathiformis* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$. * $p < 0.05$

El efecto de los extractos metanólicos de *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 15.

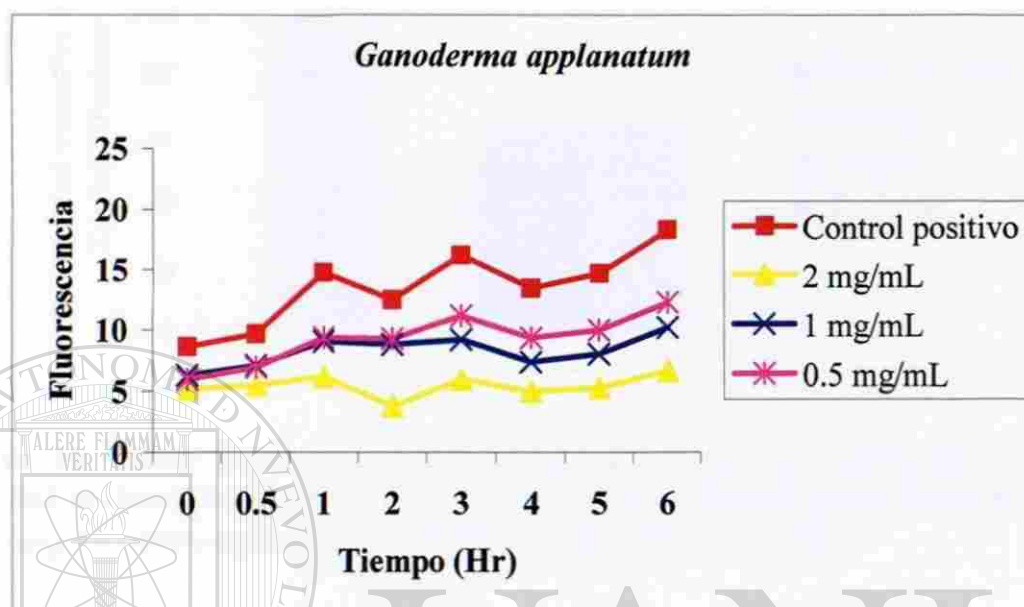


Figura 15. Efecto de extractos metanólicos de *Ganoderma applanatum* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (57.7%) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL. (Figura 16).

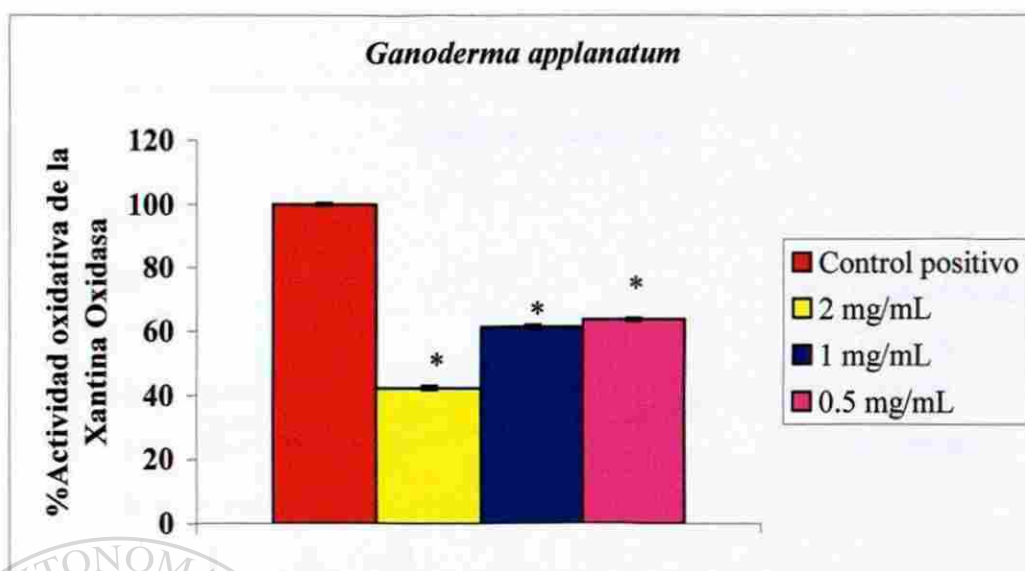


Figura 16. Efecto de extractos metanólicos de *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3. * $p < 0.05$

3.8.2 Extractos acuosos

Al evaluar el efecto de los extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa (inductor de radicales libres), se observó que los extractos de las cuatro especies evaluadas inhibieron la actividad oxidativa de esta enzima.

El efecto de los extractos acuosos de *Armillaria tabescens* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 17.

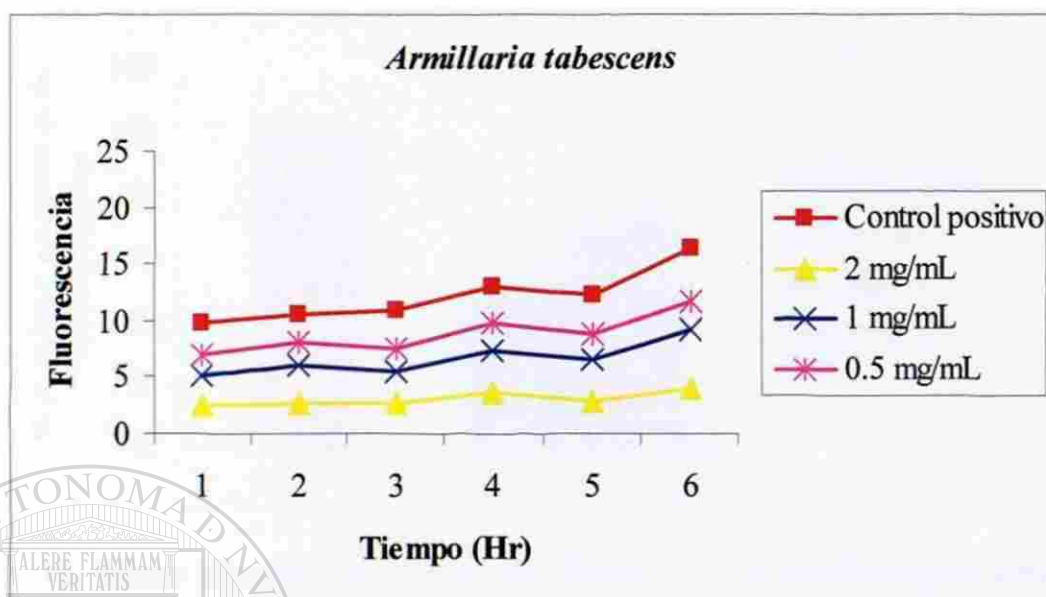


Figura 17. Efecto de extractos acuosos de *Armillaria tabescens* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (76.2 %) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL (Figura 18).

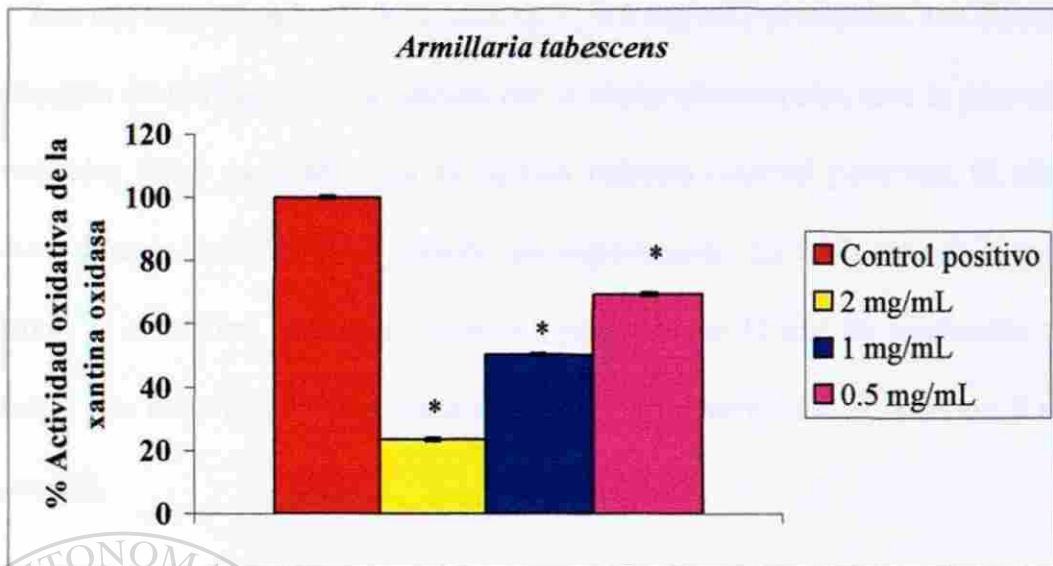


Figura 18. Efecto de extractos acuosos de *Armillaria tabescens* sobre la actividad oxidativa de xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3. * $p < 0.05$

El efecto de extractos acuosos de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 19.

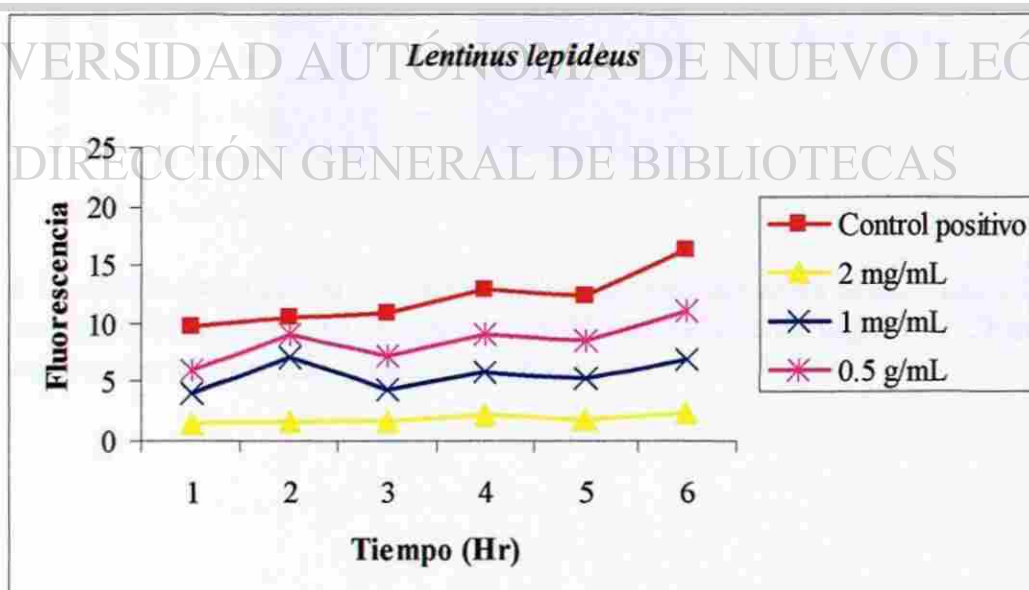


Figura 19. Efecto de extractos acuosos de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (85.6 %) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL (Figura 20).

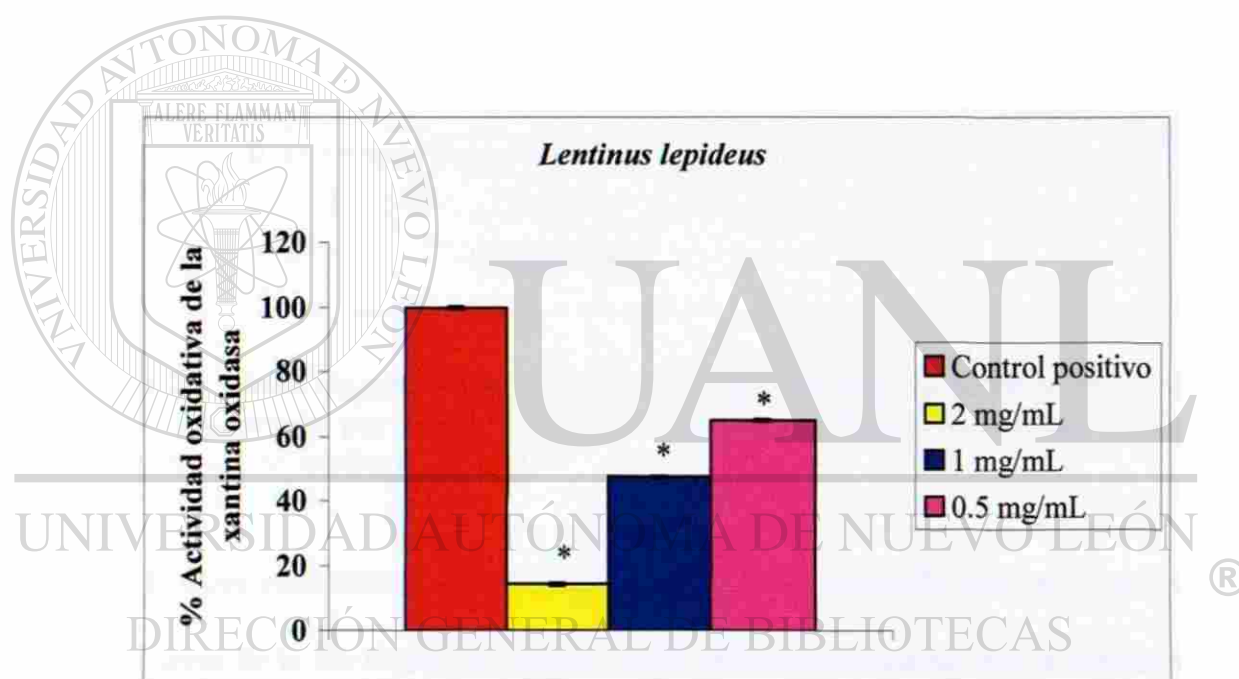


Figura 20. Efecto de extractos acuosos de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$. * $p < 0.05$

El efecto de los extractos acuosos de *Calvatia cyathiformis* sobre la actividad oxidativa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 21.

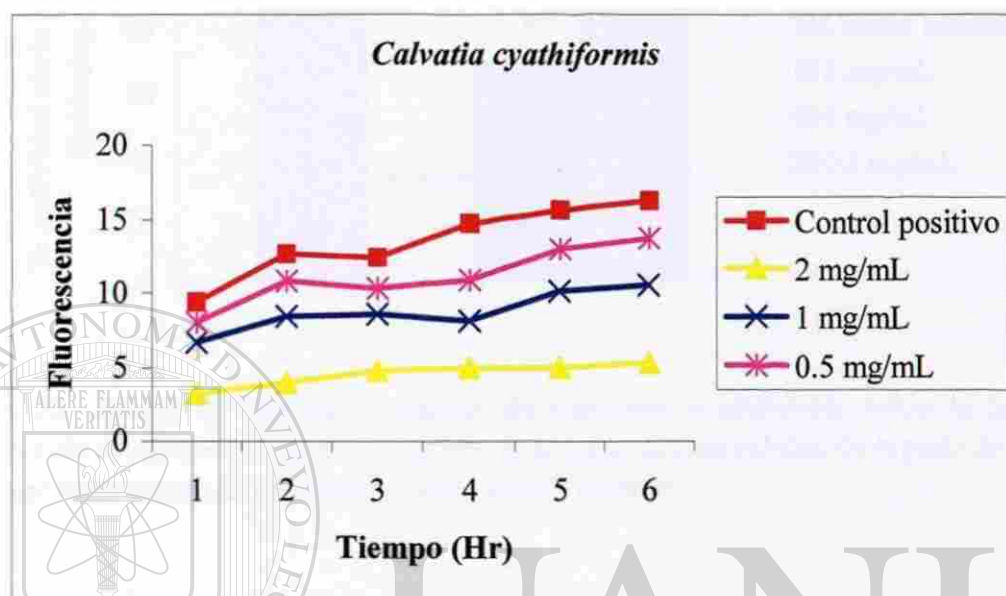


Figura 21. Efecto de extractos acuosos de *Calvatia cyathiformis* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (67.4 %) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL (Figura 22).

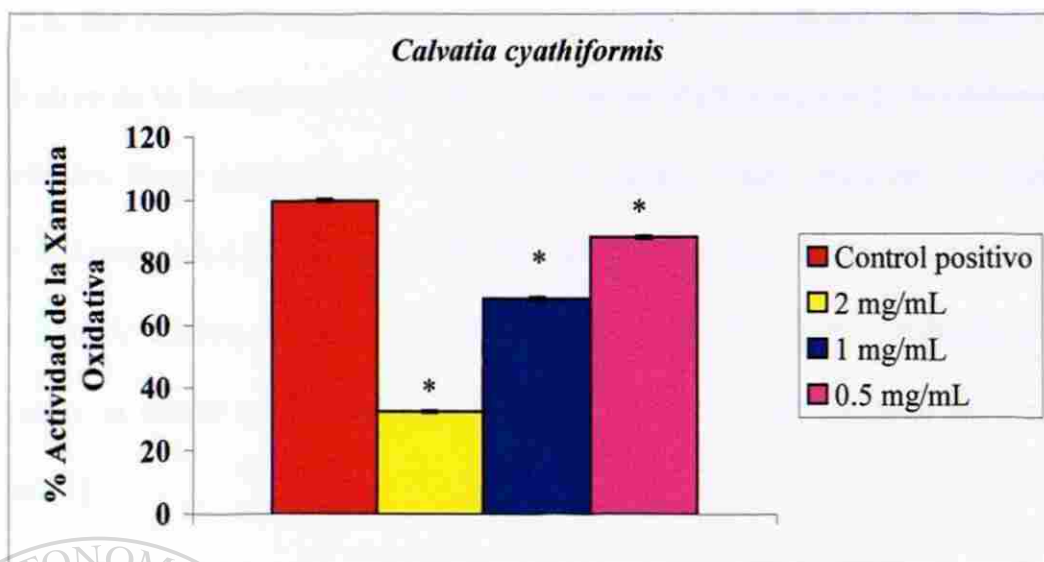


Figura 22. Efecto de extractos acuosos de *Calvatia cyathiformis* sobre la actividad oxidativa de xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$. * $p < 0.05$

El efecto de extractos acuosos de *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa en células de hígado de Chang se muestra en la figura 23.

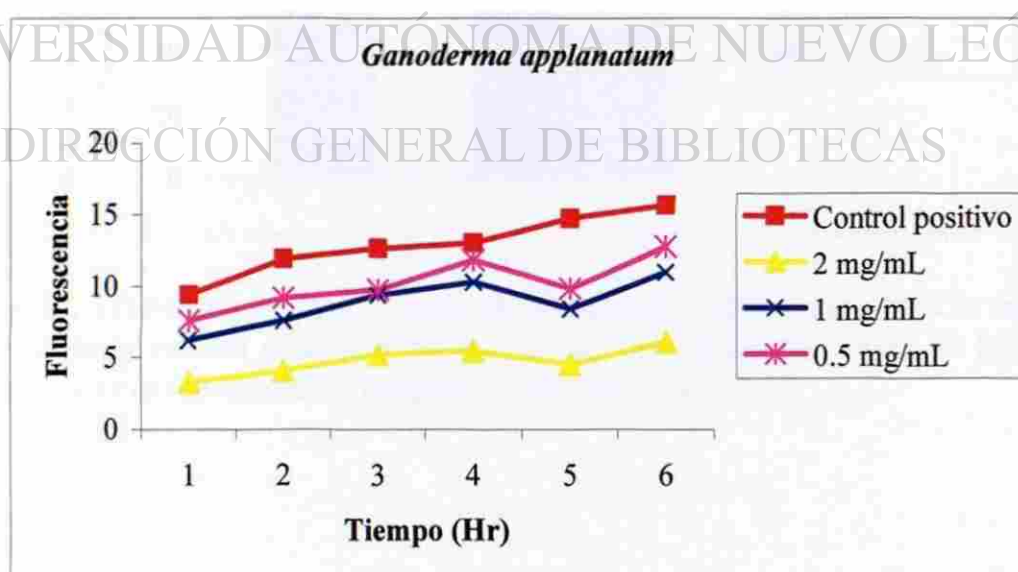


Figura 23. Efecto de extractos acuosos de *Ganoderma applanatum* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, $n=3$.

Las tres concentraciones evaluadas (2, 1, 0.5 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína ante la presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento. La inhibición de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa se observó a partir de los 30 min de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria (64.7 %) ocurrió con la dosis de 2 mg/mL (Figura 24).

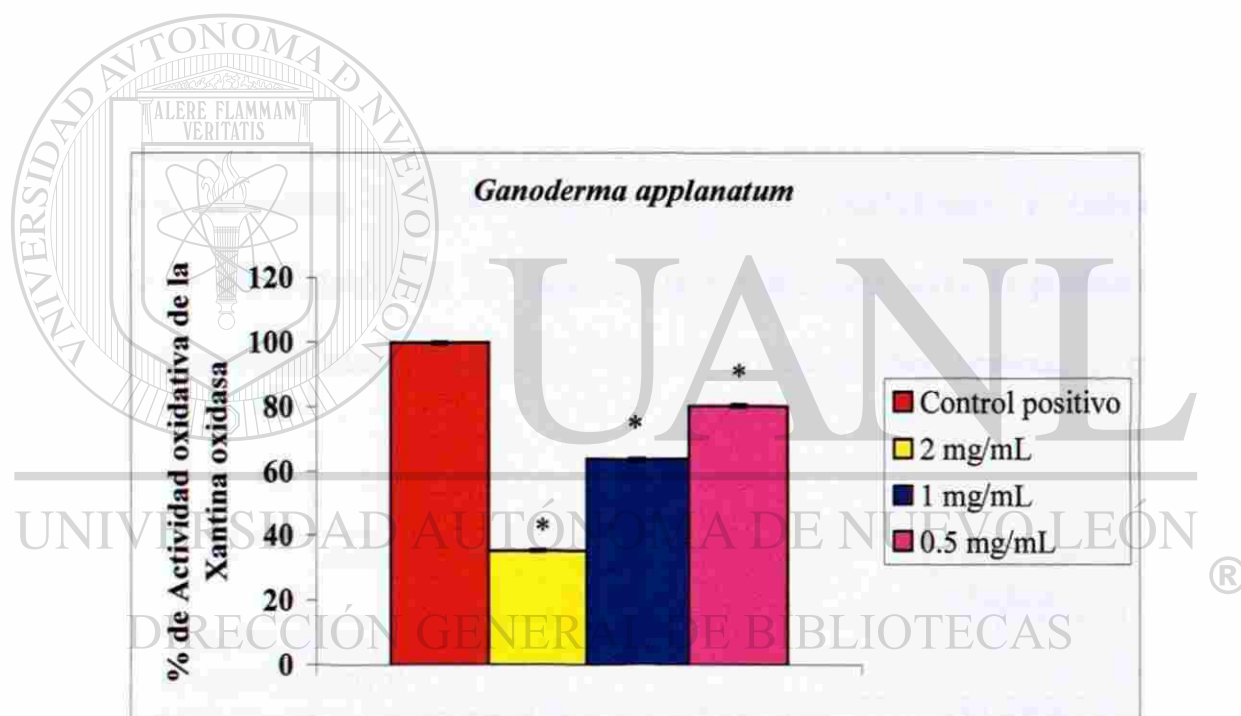


Figura 24. Efecto de extractos acuosos de *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3. * $p < 0.05$

3.9 Evaluación de efecto inmunomodulador

Al evaluar el efecto de los extractos sobre la respuesta del sistema inmune en ratones, se observó una diferencia significativa en el número de células formadoras de placas hemolíticas entre hembras y machos, por tal motivo se reportan los valores de CFP-IgM para hembras y machos por separado, obtenidos con cada uno de los extractos metanólicos evaluados.

3.9.1 Extractos metanólicos administrados 24 horas antes de la inmunización

En la tabla V se muestran los resultados del efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 hrs antes de la inmunización sobre la producción de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c.

Antígeno	CFP/Millón Hembras	CFP/Millón Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	122 ± 9.6	122 ± 9.6
<i>Armillaria tabescens</i>	141.3 ± 21.3	164 ± 4*
<i>Lentinus lepideus</i>	89.3 ± 4*	48 ± 2.6*
<i>Calvatia cyathiformis</i>	57.3 ± 12*	56 ± 8*
<i>Ganoderma applanatum</i>	82.6 ± 37	55 ± 1.3*

Tabla V. CFP-IgM en respuesta a la administración de 20 mg/Kg de extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización. Los datos representan el promedio ± DE del número total de células formadoras de anticuerpos IgM en bazo. n=4. * p < 0.05

En la figura 25 se muestra el efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 25 horas antes de la inmunización en ratones hembras.

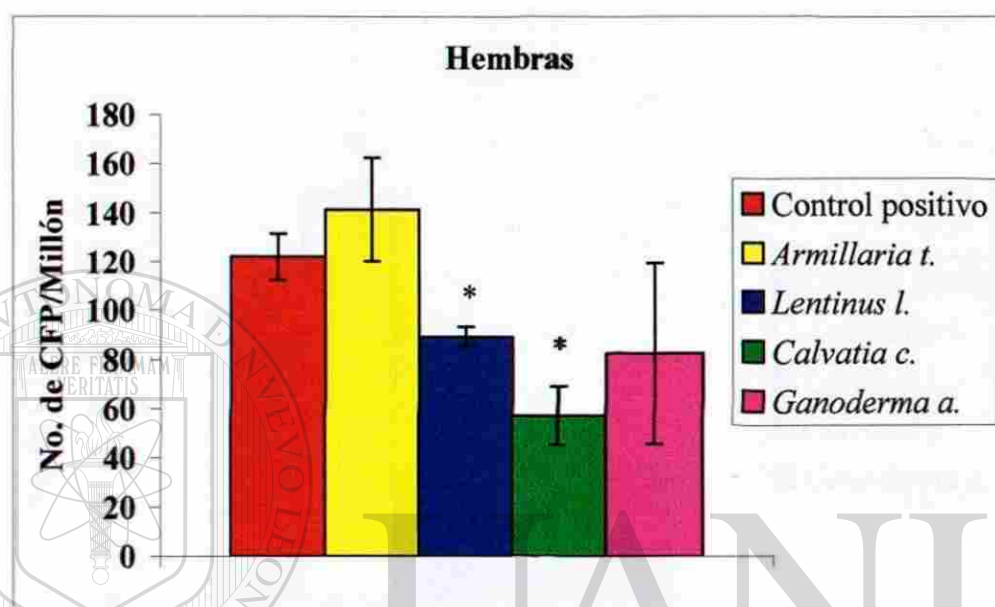


Figura 25. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos sobre la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo, $n = 4$. * $p < 0.05$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Con los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus* y *Calvatia ciathyformis* se observó una inhibición de la respuesta del sistema inmune al disminuir de manera significativa el número de CFP-IgM en un 26 y 53 % respectivamente en relación al control positivo. No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron el extracto metanólico de *Armillaria tabescens* o *Ganoderma applanatum* y el grupo inmunizado con glóbulos rojos de carnero (control positivo). En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

En la figura 26 se muestra el efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 horas antes de la inmunización en ratones Machos.

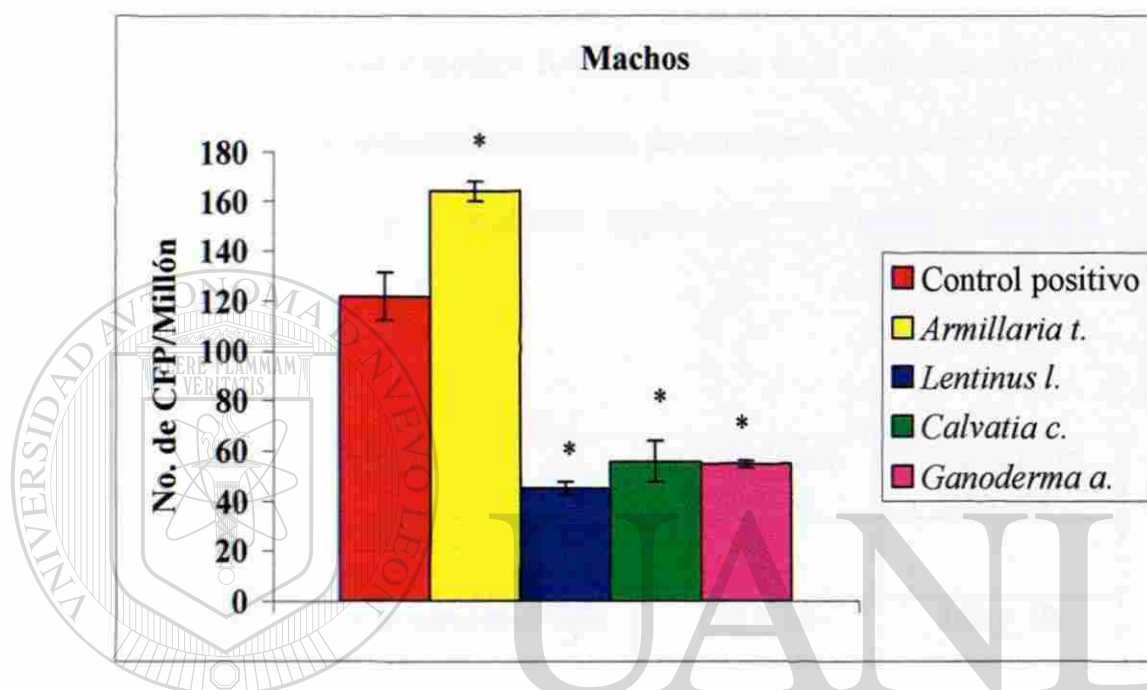


Figura 26. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos sobre la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm la DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

El extracto metanólico de *Armillaria tabescens* produjo un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 34 % el número de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM). En el caso de los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia ciathyformis* y *Ganoderma applanatum* se observó una inhibición de la respuesta del sistema inmune al disminuir de manera significativa el número de CFP-IgM en un 60, 54 y 55 % respectivamente con respecto al control positivo. En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.9.2 Extractos metanólicos administrados de manera conjunta con la inmunización

La tabla VI muestra los promedios de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c después de la administración de una dosis única de 20 mg/Kg de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* de manera conjunta con la inmunización.

Antígeno	CFP/Millón Hembras	CFP/Millón Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	152 ± 18	152 ± 18
<i>Armillaria tabescens</i>	213.3 ± 1.2*	46.6 ± 4*
<i>Lentinus lepideus</i>	181 ± 13*	53 ± 8*
<i>Calvatia cyathiformis</i>	103 ± 14*	41 ± 4*
<i>Ganoderma applanatum</i>	299.9 ± 17*	61 ± 8*

Tabla VI. CFP-IgM en respuesta a extractos metanólicos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo, n=4. * p < 0.05

En la figura 27 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados conjuntamente con la inmunización en ratones hembras.

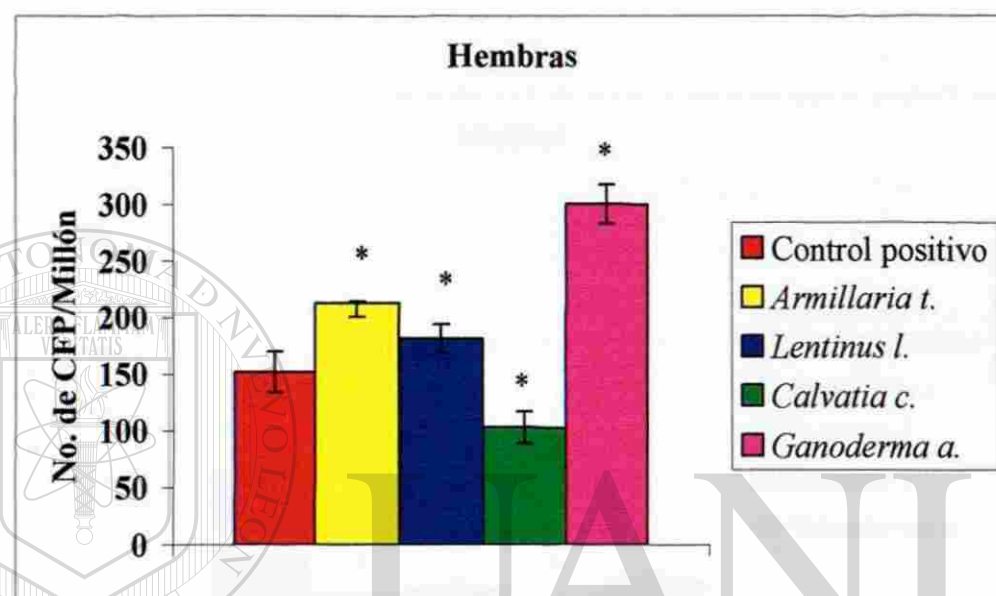


Figura 27. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

Los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens* y *Ganoderma applanatum* produjeron un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 19, 40 y 97 % respectivamente el número de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM). Por otro lado el extracto metanólico de *Calvatia cyathiformis* produjo una disminución de la respuesta del sistema inmune al disminuir de manera significativa el número de CFP-IgM (32 %) con respecto al grupo control positivo. En el control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

En la figura 28 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados conjuntamente con la inmunización en ratones Machos.

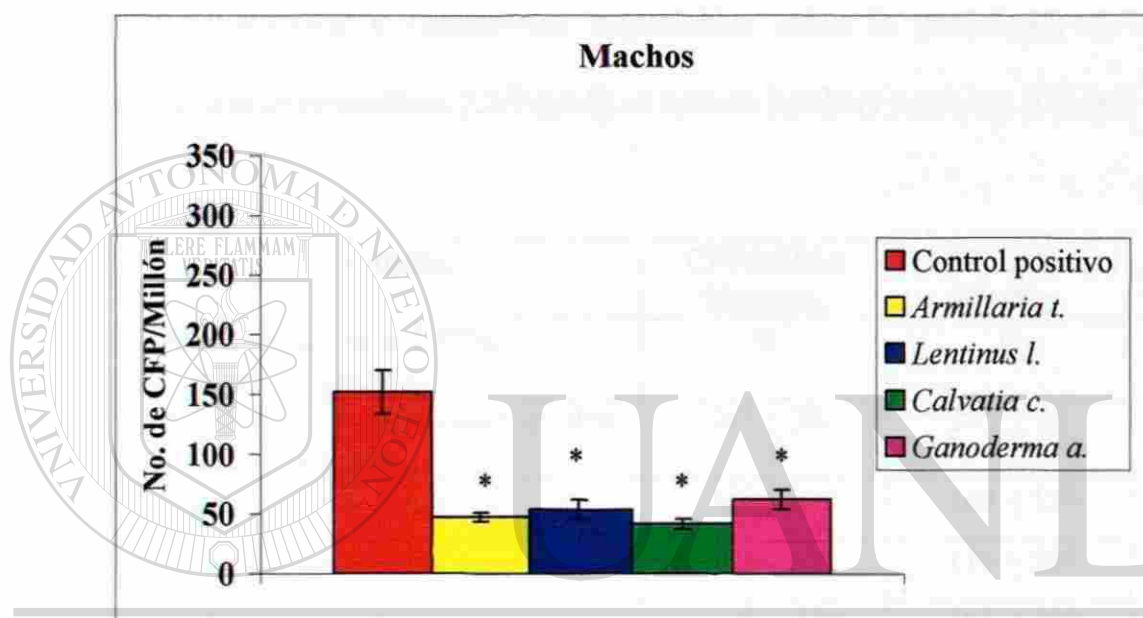


Figura 28. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

Los extractos metanólicos de *Calvatia cyathiformis*, *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus* y *Ganoderma applanatum* produjeron una inhibición en la respuesta del sistema inmune al disminuir de manera significativa respectivamente el número de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en un 73, 69, 65 y 60 % respecto al control positivo. En el control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.9.3 Extractos metanólicos administrados 24 horas después de la inmunización

En la tabla VII se muestran los resultados del efecto de la administración de una dosis única de 20 mg/Kg de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre la producción de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c.

Antígeno	CFP/Millón Hembras	CFP/Millón Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	242 ± 28	242 ± 28
<i>Armillaria tabescens</i>	113 ± 6*	168 ± 13*
<i>Lentinus lepideus</i>	321 ± 9*	116 ± 36*
<i>Calvatia cyathiformis</i>	178 ± 34*	161 ± 20*
<i>Ganoderma applanatum</i>	160 ± 32*	130 ± 8*

Tabla VII. CFP-IgM en respuesta a extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=4. * p < 0.05

En la figura 29 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 hrs después de la inmunización en ratones hembras.

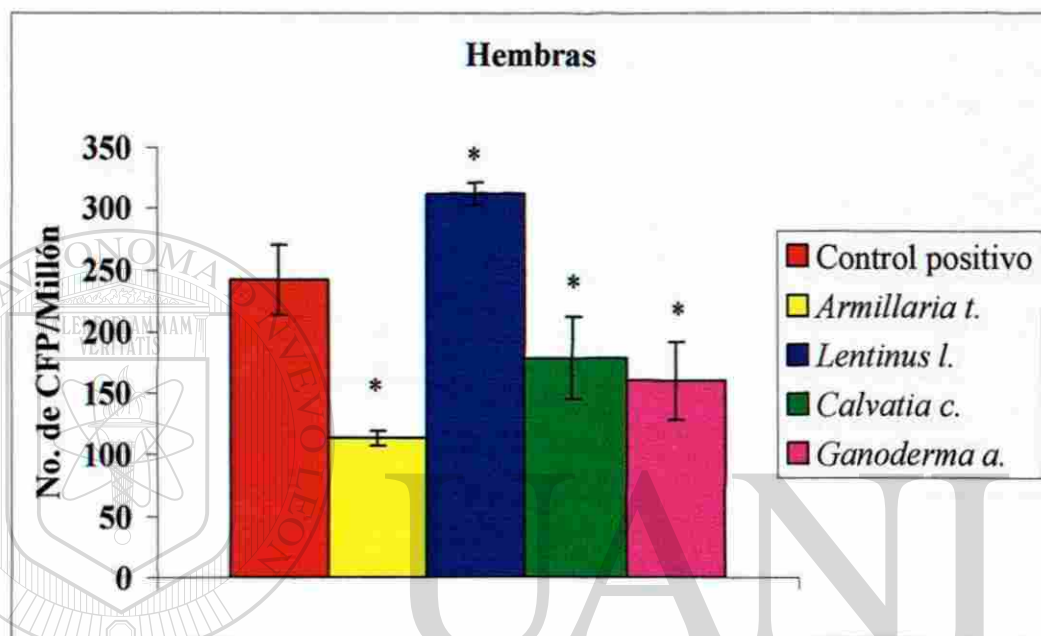


Figura 29. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

El extracto metanólico de *Lentinus lepideus*, produjo un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 33 % el número de CFP-IgM, en cambio los extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Ganoderma applanatum* y *Calvatia cyathiformis* produjeron una inhibición de la respuesta del sistema inmune al disminuir de manera significativa el número de CFP-IgM en un 53, 34 y 26 % respectivamente, con respecto al control positivo. En el control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

En la figura 30 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 hrs después de la inmunización en ratones Machos.

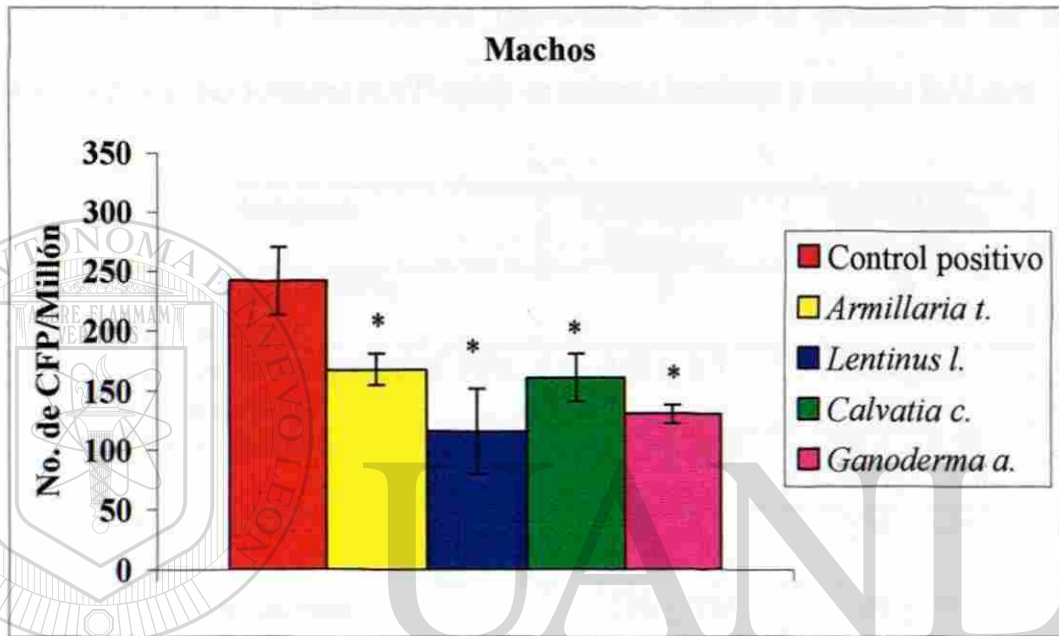


Figura 30. Efecto de los extractos metanólicos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

Los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Ganoderma applanatum*, *Calvatia cyathiformis* y *Armillaria tabescens* produjeron una disminución significativa en la respuesta del sistema inmune al disminuir en un 52, 46, 33 y 30 % respectivamente el número de CFP-IgM con respecto al control positivo. En el control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.9.4 Extractos acuosos administrados 24 horas antes de la inmunización

En la tabla VIII se muestran los resultados del efecto de la administración de la dosis única de 20 mg/Kg de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre la producción de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c.

Antígeno	CFP/Millón Hembras	CFP/Millón Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	348 ± 5.7	348 ± 5.7
<i>Armillaria tabescens</i>	332 ± 14.6	86.6 ± 9.3*
<i>Lentinus lepideus</i>	342 ± 41	218 ± 16*
<i>Calvatia cyathiformis</i>	129 ± 23*	69 ± 3*
<i>Ganoderma applanatum</i>	102 ± 22*	89 ± 6*

Tabla VIII. CFP-IgM en respuesta a extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización. Los datos representan el promedio ± la desviación estándar del número total de CFP-IgM en bazo. n=4. * p < 0.05

En la figura 31 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 horas antes de la inmunización en ratones hembras.

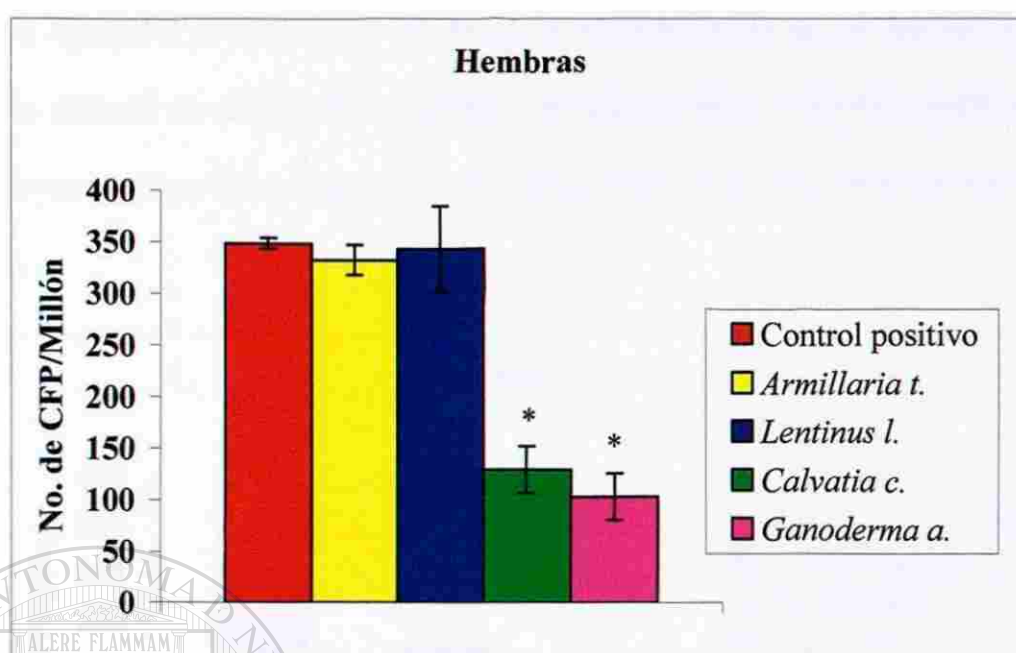


Figura 31. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

Los extracto acuosos de *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* produjeron

una inhibición significativa en la respuesta del sistema inmune al disminuir en un 62 y 70 % respectivamente el número de células CFP-IgM en relación al control. No se observó una diferencia significativa entre los grupos que recibieron el extracto acuoso de *Armillaria tabescens* o *Lentinus lepideus* y el grupo inmunizado con glóbulos rojos de carnero (control positivo). En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

En la figura 32 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 horas antes de la inmunización en ratones Machos.

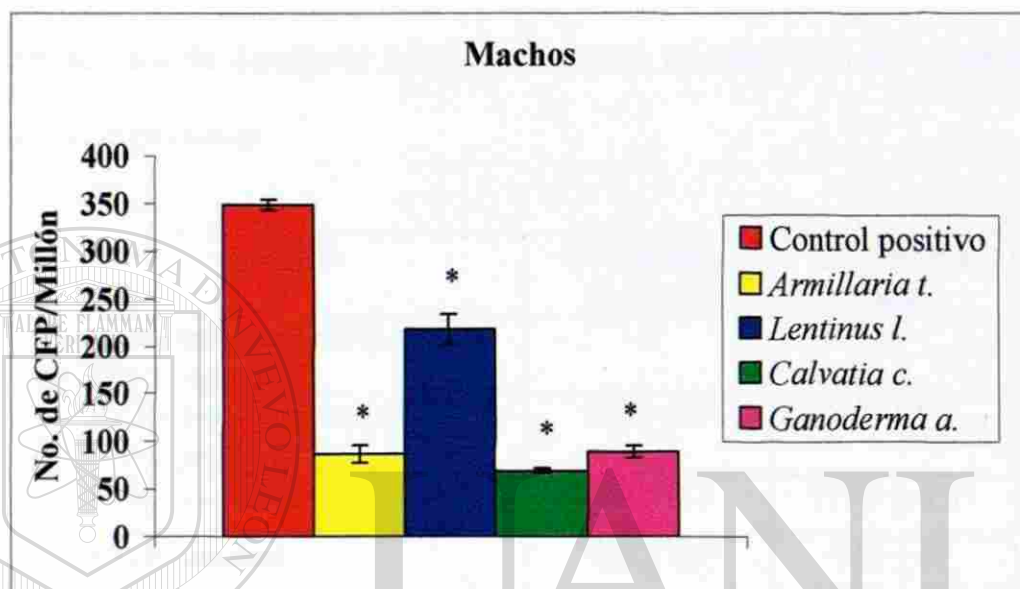


Figura 32. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs antes de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Ganoderma applanatum* y *Calvatia cyathiformis* produjeron una disminución significativa en la respuesta del sistema inmune al disminuir en un 37, 74, 75 y 80 % el número CFP-IgM respectivamente en relación al control positivo. En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.9.5 Extractos acuosos administrados de manera conjunta con la inmunización

La tabla IX muestra del promedio del número de CFP-IgM en ratones hembras y machos BALB/c, después de la administración de una dosis única de 20 mg/Kg de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

Antígeno	CFP/Millón Hembras	CFP/Millón Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	348 ± 5.7	348 ± 5.7
<i>Armillaria tabescens</i>	357 ± 1.3	171.9 ± 5.3*
<i>Lentinus lepideus</i>	765 ± 18*	369 ± 6*
<i>Calvatia cyathiformis</i>	483 ± 25*	274 ± 18*
<i>Ganoderma applanatum</i>	229 ± 5.3*	210 ± 13

Tabla IX. CFP-IgM en respuesta a extractos acuosos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización. Los datos representan el promedio ± la desviación estándar del número total de CFP-IgM en bazo. n=4. * p < 0.05

En la figura 33 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados conjuntamente con la inmunización en ratones hembras.

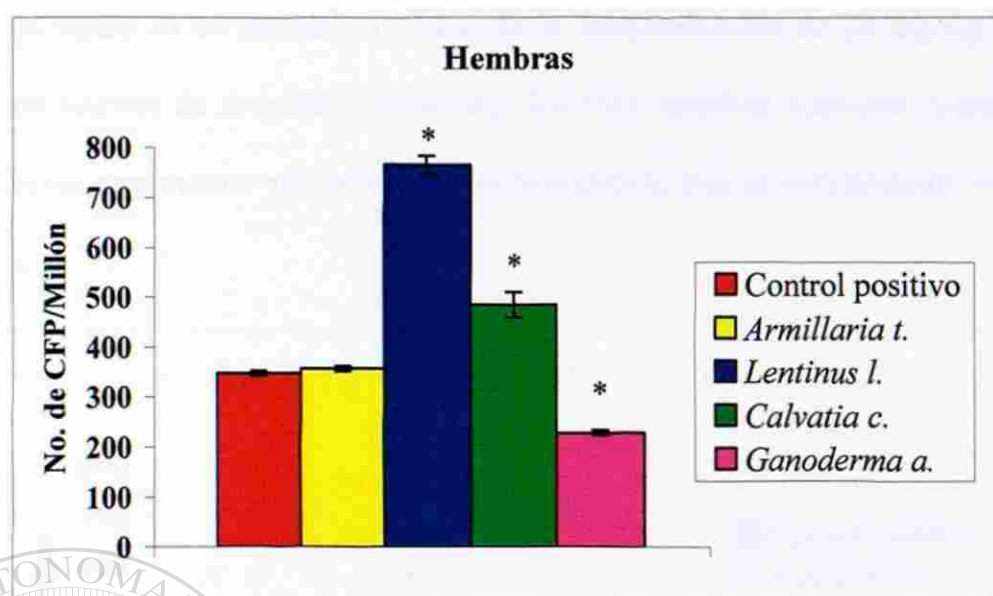


Figura 33. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus* y *Calvatia cyathiformis* produjeron un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 139 y 31

% respectivamente el número de CFP-IgM. Por otro lado los extractos acuosos de *Ganoderma applanatum* produjeron una inhibición de la respuesta del sistema inmune al disminuir de manera significativa el número de CFP-IgM (30%). No se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió el extracto acuoso de *Armillaria tabescens* y el grupo inmunizado con glóbulos rojos de carnero (control positivo). En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

En la figura 34 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados conjuntamente con la inmunización en ratones Machos.

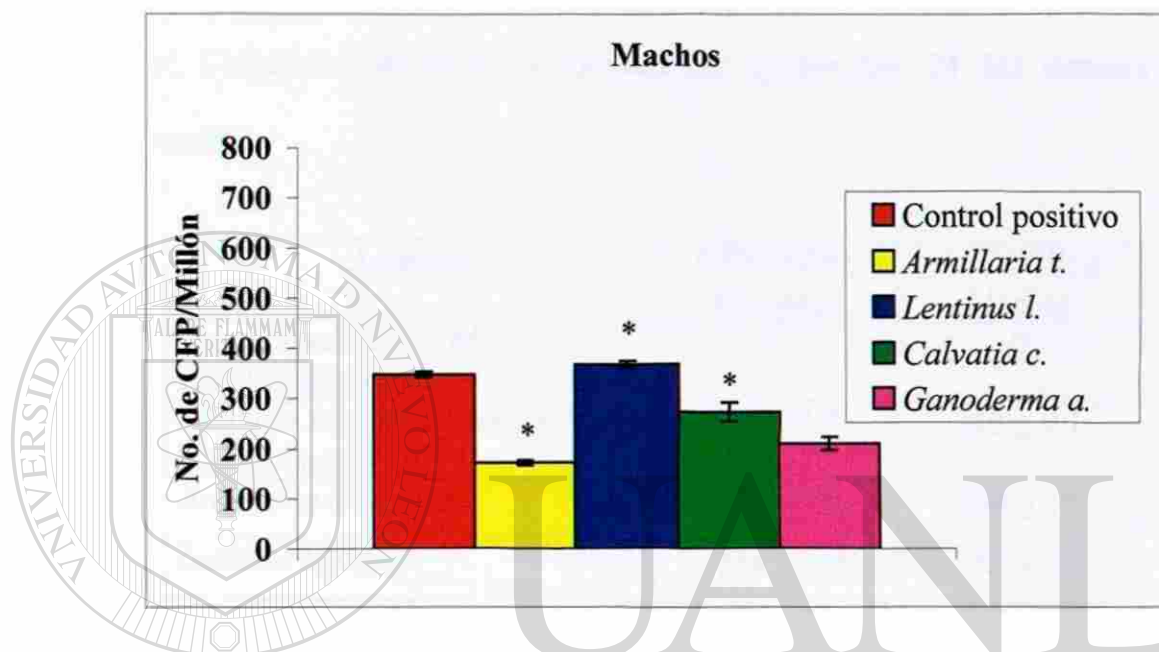


Figura 34. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos administrados conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Ganoderma applanatum* y *Calvatia cyathiformis* produjeron una inhibición significativa en la respuesta del sistema inmune al disminuir en un 51, 39 y 21 % respectivamente el número de CFP-IgM. No se observó diferencia significativa entre el grupo que recibió el extracto acuoso de *Lentinus lepideus* y el grupo inmunizado con glóbulos rojos de carnero (control positivo). En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.9.6 Extractos acuosos administrados 24 horas después de la inmunización

La tabla X muestra el promedio del número de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c después de la administración de una dosis única de 20 mg/Kg de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* 24 hrs después de la inmunización.

Antígeno	CFP/Millón Hembras	CFP/Millón Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0	0
Glóbulos rojos de camero al 10% (Control positivo)	348 ± 5.7	348 ± 5.7
<i>Armillaria tabescens</i>	382 ± 17	284 ± 4*
<i>Lentinus lepideus</i>	544 ± 16*	197 ± 58*
<i>Calvatia cyathiformis</i>	393 ± 70	269 ± 67*
<i>Ganoderma applanatum</i>	501 ± 40*	346 ± 26

Tabla X. Promedio de CFP-IgM en respuesta a extractos acuosos de macromicetos administrados 24 hrs después de la inmunización. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=4. * p < 0.05

En la figura 35 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 hrs después de la inmunización en ratones hembras.

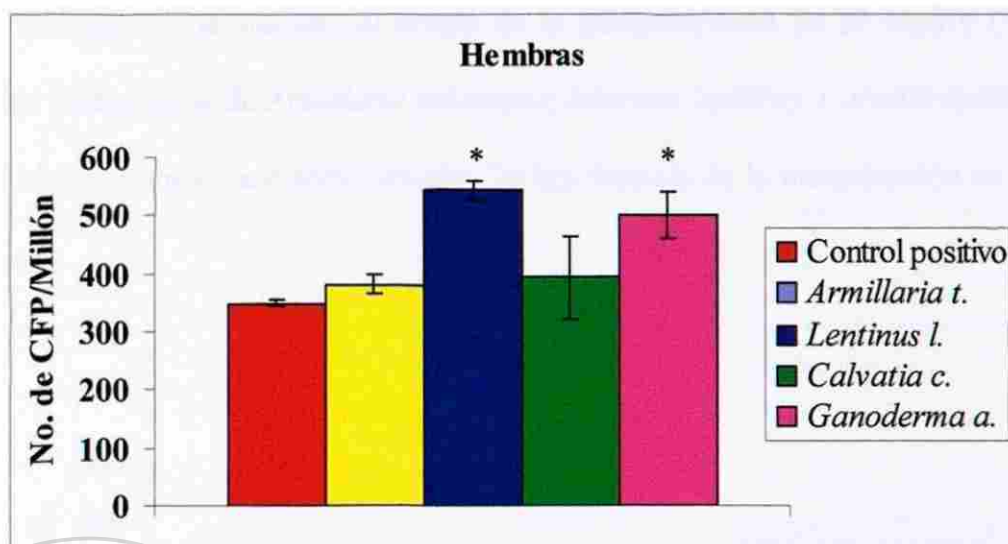


Figura 35. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus* y *Ganoderma applanatum* produjeron un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 52 y 32 %

respectivamente el número de CFP-IgM. No se observó diferencia significativa entre los grupos que recibieron el extracto acuosos de *Armillaria tabescens* o *Calvatia cyathiformis* y el grupo inmunizado con glóbulos rojos de carnero (control positivo). En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

En la figura 36 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* administrados 24 hrs después de la inmunización en ratones Machos.

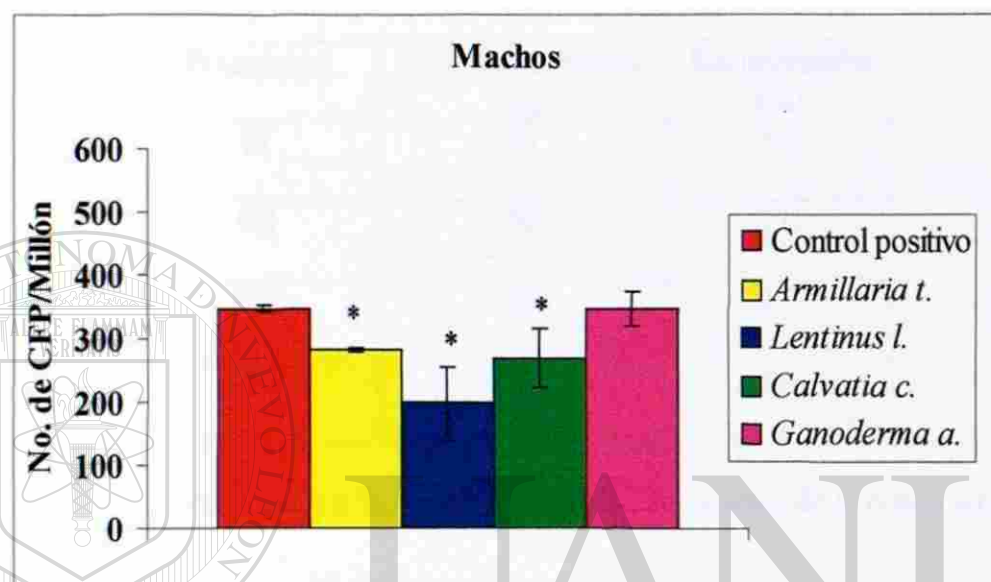


Figura 36. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Armillaria tabescens* produjeron una inhibición significativa en la respuesta del sistema inmune al disminuir en un 56, 46, 22 y 18 % respectivamente el número de células CFP-IgM, en cambio con el extracto acuoso de *Ganoderma applanatum* no se observó diferencia significativa con respecto al control positivo. En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.10 Fraccionamiento inicial biodirigido de *Lentinus lepideus*

Se obtuvieron cuatro fracciones a partir de 1 g de biomasa de *Lentinus lepideus*, las cuales se etiquetaron como FI, FII, FIII y FIV. Las cantidades obtenidas y el porcentaje de recuperación de cada una de las fracciones se muestra en la tabla XI.

Fracciones	Cantidad obtenida (mg)	Recuperación (%)
FI	30	3.0
FII	70	7.0
FIII	40	4.0
FIV	80	8.0

Tabla XI. Miligramos (mg) y % de recuperación de fracciones de *Lentinus lepideus*.

3.11 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas de *Lentinus lepideus*

3.11.1 Evaluación de citotoxicidad selectiva mediante revisión microscópica y prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio (MTT)

Después de la exposición de las células de hígado de Chang (células benignas) y Hep G2 (células tumorales) a las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*, se determinó que la CT_{50} de las fracciones FI y FII obtenidas por evaluación microscópica y con la prueba de reducción del MTT fue de 500 $\mu\text{g/mL}$ para las células normales y tumorales.

En el caso de las fracciones FIII y FIV la CT_{50} fue de 700 $\mu\text{g/mL}$ para ambos tipos celulares. La comparación de los resultados obtenidos entre las dos líneas celulares mostró que ninguna de las fracciones obtenidas de *Lentinus lepideus* fue citotóxica ya que no hubo diferencia significativa entre las CT_{50} obtenidas en las células de origen benigno y tumoral (tabla XII).

CT_{50} ($\mu\text{g/mL}$) después de 72 hrs de exposición a las fracciones de <i>Lentinus lepideus</i>				
Línea celular	Fracciones			
	FI	FII	FIII	FIV
Chang liver	500	500	700	700
Hep G2	500	500	700	700

Tabla XII. Valores de CT_{50} obtenidos en células de hígado de Chang y Hep G2 mediante revisión microscópica y prueba de reducción del MTT, para fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*.

3.11.2 Evaluación de estrés oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

Al evaluar el efecto de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas de extractos de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa (inductor de radicales libres), se observó que las cuatro fracciones evaluadas inhibieron la actividad oxidativa de esta enzima. La mayor actividad antioxidante con las cuatro fracciones se observó a la dosis de 2 mg/mL (Figura 37).

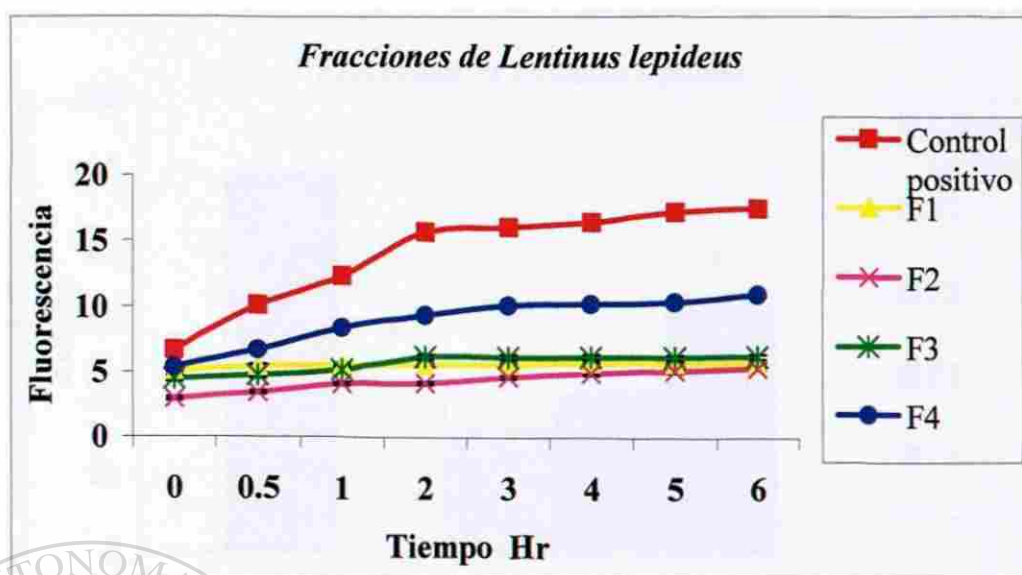


Figura 37. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3. * $p < 0.05$

Las cuatro fracciones de *Lentinus lepideus* disminuyeron la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína en presencia de los radicales libres generados por la xantina oxidasa en un 56, 67, 58 y 32 % respectivamente. El efecto inició a los 30 min de exposición de las células de hígado de Chang a las fracciones y el efecto se mantuvo durante las 6 hrs de evaluación del experimento (Figura 38).

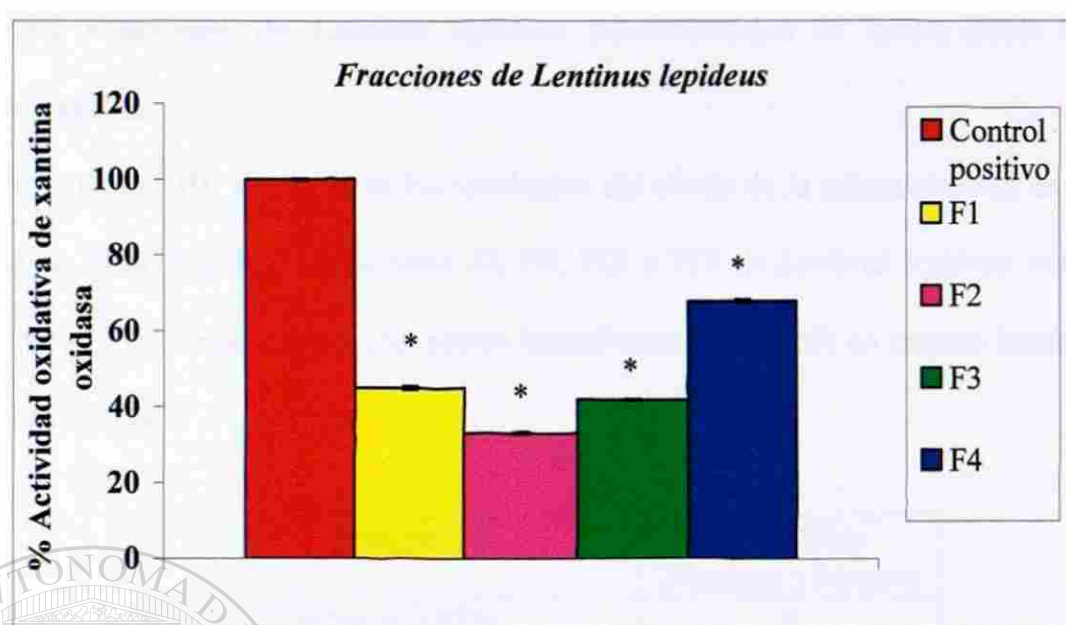


Figura 38. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm la DE, n=3. * $p < 0.05$

3.11.3 Evaluación de efecto inmunomodulador

Al evaluar el efecto de las fracciones sobre la respuesta del sistema inmune no se observó diferencia significativa en el número de células formadoras de placas hemolíticas obtenidas con el grupo de hembras y machos, por lo anterior los valores de CFP-IgM obtenidos para cada fracción se reportan como el promedio de CFP-IgM obtenidos para ambos grupos.

3.11.3.1 Fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 horas antes de la inmunización

En la tabla XIII se muestran los resultados del efecto de la administración de dosis única de 20 mg/Kg de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*, sobre la producción de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c.

Antígeno	CFP/Millón Hembras y Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	120 ± 6.3
FI	221.1 ± 8.7*
FII	250 ± 5.3*
FIII	270 ± 18.6*
FIV	210 ± 7.4*

Tabla XIII. CFP-IgM en respuesta a las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 hrs antes de la inmunización en ratones hembras y machos. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * p < 0.05

En la figura 36 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus* administradas 24 horas antes de la inmunización en ratones hembras y machos.

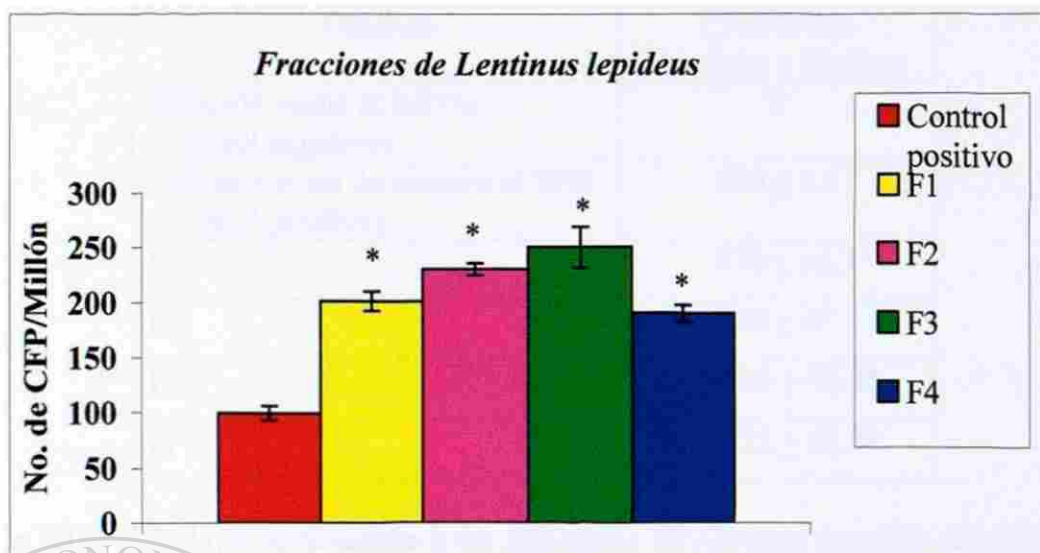


Figura 39. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=8$. * $p < 0.05$

Las cuatro fracciones de *Lentinus lepideus* produjeron un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 84, 108, 125, y 75 % respectivamente

el número de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) con respecto al control positivo. En el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.11.3.2 Fracciones *Lentinus lepideus* administradas conjuntamente con la inmunización

En la tabla XIV se muestran los resultados del efecto de la administración de la dosis única de 20 mg/Kg (v.o.) de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*, sobre la producción de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c.

Antígeno	CFP/Millón Hembras y Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	100 ± 9.3
FI	170 ± 16.3*
FII	138 ± 6*
FIII	201 ± 12.8*
FIV	223 ± 22.3*

Tabla XIV. CFP-IgM en respuesta a las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas conjuntamente con la inmunización en ratones hembras y machos. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * p < 0.05

En la figura 40 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus* administradas conjuntamente con la inmunización en ratones hembras y machos.

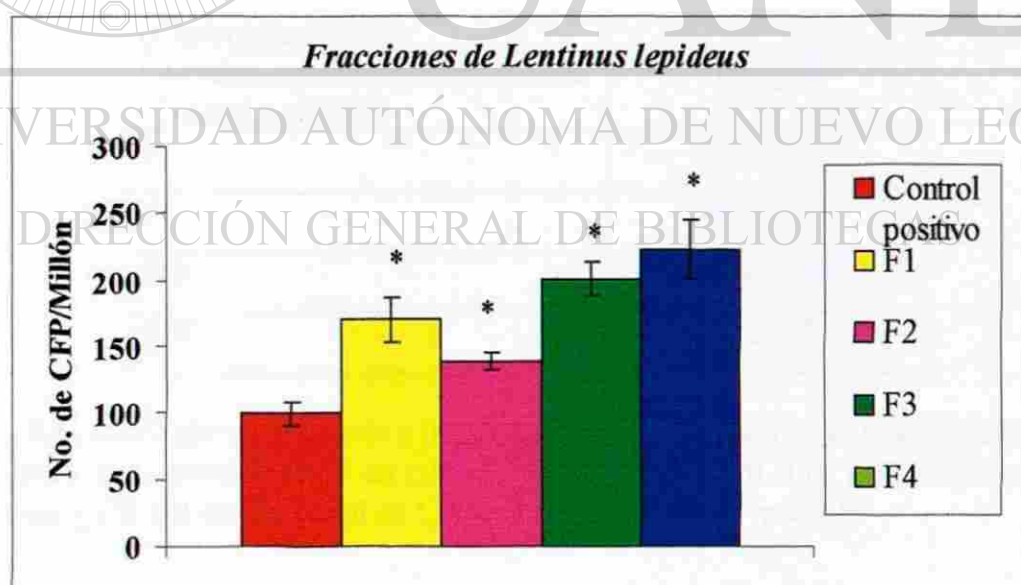


Figura 40. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * p < 0.05

Las cuatro fracciones produjeron un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 70, 38, 101 y 123 % respectivamente el número de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) con respecto al control positivo. En el control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

3.11.3.3 Fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 horas después de la inmunización

En la tabla XIV se muestran los resultados del efecto de la administración de la dosis única de 20 mg/Kg (v.o.) de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*, sobre la producción de células formadoras placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c.

Antígeno	CFP/Millón Hembras y Machos
Solución salina al 0.85% (Control negativo)	0
Glóbulos rojos de carnero al 10% (Control positivo)	184 ± 13
FI	139.5 ± 4.3*
FII	85.3 ± 16*
FIII	106 ± 19*
FIV	118.6 ± 7*

Tabla XV. CFP-IgM en respuesta a las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 hr después de la inmunización en ratones hembras y machos. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * p < 0.05

En la figura 41 se muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg (v.o.) de F1, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus* administradas 24 horas después de la inmunización en ratones hembras y machos.

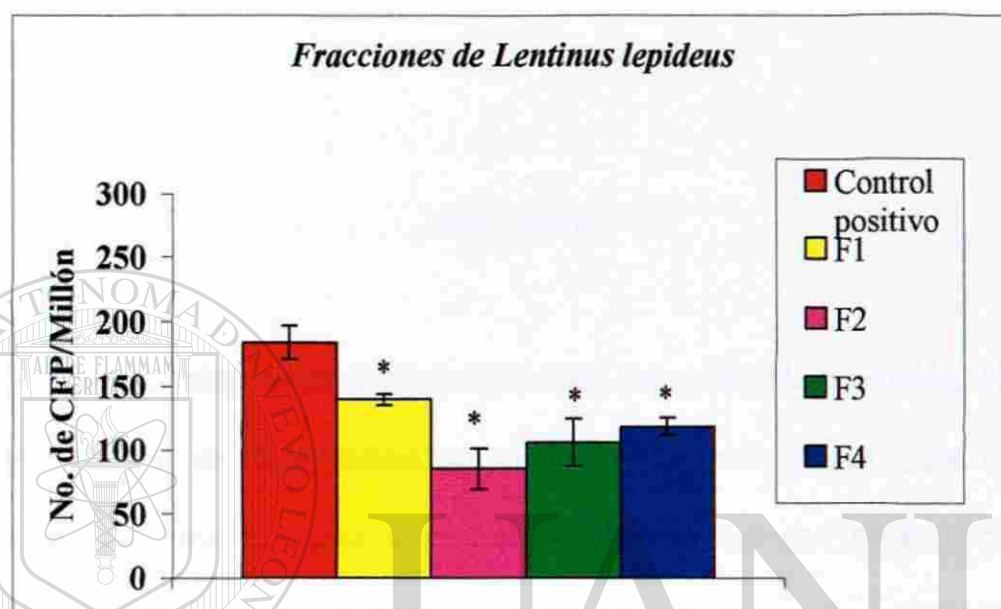


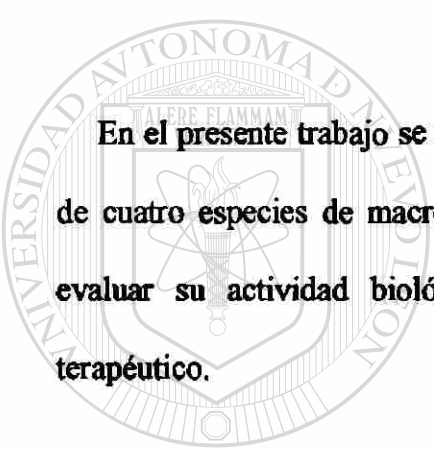
Figura 41. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * p < 0.05.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En este esquema de inmunización las cuatro Las fracciones produjeron una disminución significativa en la respuesta del sistema inmune al disminuir en un 24, 54, 43 y 36 % respectivamente el número de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) con respecto al control positivo, en el grupo control negativo no se observó la formación de CFP-IgM.

CAPITULO 4

DISCUSION



En el presente trabajo se realizó una evaluación sistemática de la actividad biológica de cuatro especies de macromicetos que crecen en el noreste del país, con el fin de evaluar su actividad biológica y detectar a las especies que tuvieran potencial terapéutico.

Las especies evaluadas en este trabajo se seleccionaron de acuerdo a criterios etnofarmacológicos y quimiotaconómicos, es decir, en base al uso de estas especies en la medicina tradicional oriental para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades incluyendo varios tipos de cáncer, así como, en base a antecedentes de la actividad biológica (antitumoral, antioxidante e inmunomoduladora) reportada para otras especies del mismo género como *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* y *Calvatia gigantea* que crecen en China y Japón⁶⁷⁻⁶⁹.

El aislamiento de cultivos puros a partir de carpóforos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* permitió eliminar los contaminantes presentes en los carpóforos y de esta manera tener la certeza de que la actividad biológica encontrada corresponde a compuestos bioactivos presentes en estos macromicetos y no a compuestos o metabolitos producidos por microorganismos como, bacterias y hongos, los cuales pudieran haber estado presentes en los carpóforos recolectados.

En relación al cultivo *in vitro* de macromicetos, esta documentado que puede existir diferencia en cuanto los requerimientos de nutrientes (sustrato), pH y temperatura entre especies de macromicetos del mismo género. Sin embargo en el caso particular de las especies aisladas en este estudio, se observó que todas crecieron en el medio de Melin Norkrans, el cual se utilizó para realizar el aislamiento de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*³. Asimismo se utilizaron los mismos requerimientos de sustrato, condiciones de pH y temperatura para el crecimiento *in vitro* de estas cuatro especies y la respuesta de crecimiento fue similar en todos los casos.

La evaluación de la citotoxicidad se realizó en células hepáticas humanas de origen benigno y tumoral con el propósito de poder comparar la toxicidad en ambos tipos celulares y así poder establecer si existía citotoxicidad selectiva; al respecto se estableció que ninguna de las especies evaluadas mostró ser citotóxica ya que los valores de CT_{50} obtenidos para cada extracto así como para cada una de las fracciones de *Lentinus lepideus* con cada tipo celular, fueron altas. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Mizuno, Maeda y Chihara, quienes reportaron que la actividad antitumoral de extractos de hongos asiáticos como *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor* y *Grifola frondosa* no se debe a efectos tóxicos directos sobre las células cancerosas, sino que ejercen su actividad antitumoral mediante la activación de diferentes respuestas del sistema inmune del hospedero⁷⁰⁻⁷⁵; lo anterior podría explicar el por qué estos extractos no son tóxicos para la célula. Actualmente, los compuestos aislados de cuerpos fructíferos (Lentina) y de micelio (LEM) de este hongo se encuentran en estudios fase clínica⁷⁶. Por otro lado, los polisacáridos y proteoglucanos antitumorales obtenidos de hongos medicinales, como: Lentina y LEM de *Lentinus edodes*, PSK y PSP de *Coriolus versicolor* y Sonifilan de *Schizophyllum commune*, han sido utilizados como coadyuvantes en la quimioterapia y radioterapia, en pacientes con cáncer gástrico, de colon, de mama y pulmón, debido a su potencial actividad antitumoral y a su baja toxicidad hacia las células normales y por consiguiente han presentado muy pocos efectos adversos en estos pacientes⁷⁷⁻⁸².

Por otro lado, llama la atención que en estudios de toxicidad preclínica de polisacáridos antitumorales de macromicetos, el PSK2, el cual es un polisacárido antitumoral aislado de micelio de *Lentinus edodes*, tuvo una DL₅₀ de 12500 mg/Kg vía en ratones (v.o.) y en estudios realizados con el polisacárido PS-G obtenido de *Ganoderma lucidum* administrado v.o. a una dosis de 5000 mg/Kg durante 30 días consecutivos en diferentes especies animales, no se pudo establecer la DL₅₀ para este compuesto ya que a esta dosis no hubo mortalidad animal y no se presentaron cambios en cuanto al peso y comportamiento de los animales; además, al realizar la autopsia así como el estudio histopatológico, no se detectaron manifestaciones de toxicidad en ninguna de las especies animales estudiadas⁸³⁻⁸⁴.

En relación a la evaluación de la producción de estrés celular oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) en células de hígado de

Chang se realizó mediante la evaluación de la cantidad de la fluorescencia emitida por el metabolito desacetilado de la DCFDA dentro de la célula. Este metabolito (diclorofluoreceína) fluoresce en presencia de radicales libres, por lo que la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de radicales libres presentes en la célula. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para detectar el efecto de compuestos químicos en el balance prooxidante/antioxidante de la célula. Al evaluar el efecto de los extractos metanólicos y acuosos de las cuatro especies evaluadas, así como las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Letinus lepideus* se observó que todos mostraron tener un efecto antioxidante al inhibir el estrés oxidativo inducido por la xantina oxidasa en células de hígado de Chang.

Lo anterior sugiere que las sustancias activas presentes en estos extractos tienen la capacidad de bloquear o atrapar los radicales libres inducidos por la xantina, o bien pudieran estar actuando inhibiendo la actividad oxidativa de dicha enzima. Al respecto varios autores han reportado que la mayoría de los polisacáridos extraídos de basidiomicetos pueden ser considerados como candidatos no tóxicos con actividad bloqueadora de radicales libres⁸⁵⁻⁸⁷. Los resultados de este estudio coinciden con estos reportes, ya que las especies evaluadas además de no ser citotóxicas mostraron tener actividad antioxidante. Por otro lado todas las fracciones de *Lentinus lepideus* mostraron tener efecto antioxidante, al respecto es importante señalar que se esperaba que dicha actividad se presentara sólo en una de las cuatro fracciones. En este contexto, Mizuno y Maeda han reportado que todas las fracciones obtenidas mediante precipitación fraccionada a partir de extractos de *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum* y *Lentinus edodes*, han mostrado poseer actividad antioxidante y que cada fracción contiene diferentes tipos de polisacáridos con actividad antioxidante⁸⁸⁻⁹⁰, probablemente esta es la explicación del porque cuatro fracciones de *Lentinus lepideus* mostraron ser antioxidantes. Por otro lado se ha postulado que estos polisacáridos pueden actuar como sustancias quimiopreventivas, ya que se ha comprobado que estos compuestos al atrapar los radicales libres que se generan diariamente en el organismo como resultado de la exposición de sustancias cancerígenas, radiación ultravioleta, así como los radicales libres generados de manera natural en las reacciones químicas del metabolismo pueden prevenir la aparición de enfermedades crónico degenerativas incluyendo el cáncer⁹¹.

En relación al estudio del efecto inmunomodulador de estos extractos se evaluó la respuesta del sistema inmune del ratón BALB/c mediante la técnica de Jerne modificada por Cunningham, la cual permite la visualización de pequeñas cantidades de anticuerpos líticos liberados por un solo linfocito sensibilizado. Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto inmunomodulador de extractos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* indican que tanto los extractos metanólicos y acuosos de estas especies, así como las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus* contienen sustancias activas que participan modulando la respuesta del sistema inmune y además se observó que esta modulación puede ser estimuladora o supresora dependiendo del tiempo de la administración de los extractos. Al respecto existen reportes acerca de estudios realizados con polisacáridos aislados de algunas especies de macromicetos, como son la Calvacina de *Calvatia gigantea*, Grifon de *Grifola frondosa*, así como, Lentina de *Lentinus edodes*, los cuales tienen efecto modulador sobre la respuesta del sistema inmune, y se ha observado que esta modulación puede ser estimuladora y/o supresora y que dicho comportamiento depende de varios factores como son la vía de administración del polisacárido, la dosis, así como el tiempo y la frecuencia de administración⁹². Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Por otro lado se observó una diferencia entre machos y hembras en la respuesta a los extractos acuosos y metanólicos de las cuatro especies evaluadas, al respecto se observó que el número de CFP-IgM para hembras fue mayor que las CFP-IgM de machos.

Sin embargo al evaluar el efecto de las fracciones de *Lentinus* no se repitió este fenómeno, es decir, no se observó diferencia significativa entre la cantidad de ICFP-IgM entre machos y hembras lo cual hace pensar que probablemente estas diferencias se deben a sustancias presentes en los extractos crudos y no a las sustancias presentes en las fracciones. Además se ha reportado el efecto que tienen las hormonas sobre la respuesta del sistema inmune, en relación a este punto los estrógenos tienen un papel muy importante en la estimulación de la respuesta inmune ya que se ha reportado que las respuestas inmunológicas son mayores en las hembras que en los machos⁹³. Por lo tanto, se podría pensar que los extractos acuosos y metanólicos crudos, contienen sustancias que modulan la respuesta del sistema inmune y que dicha regulación puede estar influenciada por los estrógenos. En cambio los resultados obtenidos para las fracciones de *Lentinus lepideus* el efecto estimulador de la respuesta inmune ocurrió tanto en el esquema de administración de 24 horas antes de la inmunización como en el esquema de administración conjunta con la inmunización. Por lo anterior y específicamente en el caso de *Lentinus lepideus* proponemos que las sustancias activas presentes en las fracciones I, II, III, IV tienen efecto inmunoestimulante. Al respecto varios autores han reportado que los polisacáridos presentes en extractos acuosos de macromicetos de Japón y China como *Lentinus edodes* y *Ganoderma lucidum* al ser administrados en ratones con tumores implantados como el sarcoma S180 son los responsables de la actividad antitumoral y que estos extractos ejercen sus efectos antitumorales mediante

una estimulación de la respuesta del sistema inmune y no por un efecto tóxico *per se* sobre las células cancerosas, ya que se ha observado que la regresión completa de los tumores está relacionada con un aumento en la producción de citocinas como IL-1, IL-2, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), así como la activación de macrófagos, células natural killer (NK), células B y T⁹⁴⁻⁹⁸.

Los resultados de la actividad antioxidante e inmunomoduladora de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, así como, las fracciones obtenidas de *Lentinus lepideus*, constituyen el primer reporte de actividad biológica de macromicetos del noreste de México. Por lo cual, se sugiere que las especies de macromicetos que crecen en nuestro país, al igual que lo reportado para especies de países orientales también pueden ser fuentes de productos naturales con potencial terapéutico.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos y metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum* y *Lentinus lepideus* no fueron citotóxicos.
2. Los extractos acuosos y metanólicos de todas las especies evaluadas son antioxidantes.
3. Los extractos acuosos y metanólicos de las especies de macromicetos estudiadas son inmunomoduladores.
4. *Lentinus lepideus* resultó ser la especie con mayor actividad antioxidante e inmunomoduladora.
5. Las cuatro fracciones obtenidas a partir de *Lentinus lepideus* tienen compuestos con actividad antioxidante e inmunomoduladora.

PERSPECTIVAS

1. Aislar, purificar y caracterizar los principios activos de *Lentinus lepideus*.
2. Establecer los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en la modulación del sistema inmune.
3. Realizar el fraccionamiento de *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*
4. Continuar con la evaluación de la actividad biológica de otras especies de macromicetos de México.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFIA

1. Hobbs C., *Medicinal Mushroom: An Exploration of Tradition, Healing and Culture*, Botánica Press, Santa Cruz, 1995
2. Dickinson C. and Lucas J., *The Encyclopedia of Mushrooms*, Crescent Books, New York 1982
3. Seymour J., *Los Hongos*, ediciones Castell, Barcelona 1981
4. Stamets P., *Growing Gourmet and Medical Mushrooms*, Ten Speed Press, Berkeley CA, 2000
5. Stamets P., and Chilton J.S., *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home.*, Agarikon Press, Olympia Washington, 1983
6. Chang S.T. and Miles P.G., *Edible Mushrooms and Their Cultivation*. CRC Press, Boca Raton, 1989
7. Chang S.T., *Cultivated Mushrooms*. In: *Handbook of Applied Mycology*, Marcel Dekker, New York, 1991
8. Miles P.G. and Chang S.T., *Mushroom Biology: Concise Basics and Current Development*, World Scientific, Singapore, 1997
9. Samorini G., *New Data on the Ethnomycology of Psychoactive Mushrooms*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2001, 3: 257-278
10. Wasson, R.G., *The Hallucinogenic Fungi of Mexico: An Inquiry Into The Origins of The Religious Idea Among Primitive People*. *Bot. Mus. Leaflet, Harv. Univ.* 20: 25
11. Wasson R.G., *The Wondrous Mushroom: Mycolatry to Mesoamerica*. McGraw-Hill, New York, 1978
12. Yang Q. and Jong S.C., *Medicinal Mushrooms in China*, *Mushroom Science*. XII (part 1):631-643
13. Wasser S.P. and Weis A.L., *Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: a Modern Perspective*. *Crit Rev Immunol.* 1999;19:65-96
14. Wasser S.P. and Weis A. L., *Medicinal Mushrooms. Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum* [Curtis:Fr.] P. Karst)*. Nevo, E., Ed., Peledfus Publ. Co., Haifa, 1997a, 39
15. Wasser S.P. and Weis A.L., *Medicinal Mushroom. *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake Mushroom)*. Nevo, E., Ed., Peledfus Publ. Co., Haifa, 1997b, 96
16. Breene W., *Nutritional and Medicinal Value of Specialty Mushrooms*, *J. Food Prod.*, 1990, 53 : 883-894
17. Mizuno T., Sakai T. and Chihara G., *Health Foods and Medicinal Usage of Mushrooms*. *Food, Review International*, 1995, 11: 69-81.10
18. Chang R., *Functional Properties of Edible Mushrooms*, *Nutr. Rev.*, 1996, 54 (11 pt2): S91-3.
19. Ikekawa T., *Enokitake, *Flammulina velutipes*: Antitumor Activity of Extracts and Polysaccharides*, *Food Rev., Inter.*, 1995a,11, 1: 203-206
20. Mizuno T., *Food Function and Medicinal Effects of Mushroom Fungi*, *Food a. Food Inged. J. Jpn.*, 1993, N15: 55-70

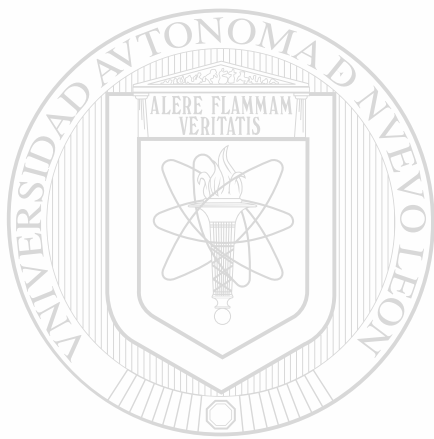
21. Chang S.T. and Buswell J.A., Mushroom Nutraceuticals, *World Journal of Microbial Biotechnology*, 1996,12, 473-476
22. Shiao MS. Lee KR, Lin LJ and Wang CT., Natural Products and Biological Activities of the Chinese Medical Fungus, *Ganoderma lucidum*. In: CT Ho. T. Osawa. MT Huang and RT Rosen (eds) Food Phytochemicals for Cancer Prevention II: Teas, Spices, and Herbs, pp 342-354, *American Chemical Society*, Washington DC (1994)
23. Jong S.C., Birmingham J.M. and Pai S.H., Immunomodulatory Substances of Fungal Origin. *Journal of Immunology and Immunopharmacology*, 1991, 3: 115-122
24. Adachi K. et al., Blood Pressure-Lowering Activity Present in the Fruit Body of *Grifola frondosa* (Maitake), *Chem. Parm. Bull.*, 36:1000-1006
25. Gunde C.N., and Cimerman A., Pleurotus Fruiting Bodies Contain the Inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase-Lovastatin. *Exp. Mycol.*, 1991, 19: 1-6
26. Kubo K, Aoki H., Nanba H., Anti-Diabetic Activity Present in the Fruit Body of *Grifola frondosa* (maitake) *I. Biol Pharm Bull* 1994, 17:1106-1110
27. Kubo K., Nanba H., Anti-Hyperlipoisis Effect of Maitake Fruit Body (*Grifola frondosa*) *I. Biol. Pharm Bull* 1997, 20:781-785
28. Bose S.R., Campestri the Antibiotic of *Psilliota campestris*, *Nature*, 1955, 175: 468
29. Mizuno T., Antitumor Mushrooms: *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei*, Gendai-shorin, Tokyo, 1997, 188
30. Bensky D. and Gamble A., 1993. *Chinese Materia Medica*. 2nd Ed., Eastland Press, Seattle.
31. Mizuno T., Bioactive Biomolecules of Mushroom: Food Function and Medicinal Effect of Mushrooms Fungi, *Food Rev. Intern*, 1995a,11, 1: 7-21
32. Kidd P., The Use of Mushroom glucans and Proteoglycans in Cancer Treatment., *Altern. Med. Rev.*, 2000, 5(1): 4-27
33. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., Arai Y., and Fukuoka F., Antitumor Polysaccharides Deriver Chemically From Natural Glucan (pachyman), *Nature (Lond)*., 1970a, 225: 943-944
34. Lucas E.H. et al., Tumor Inhibitors in *Boletus edulis* and Others Holobasidiomycetes, *Antibiot. Chemoterapy*, 1957, 7: 1-4
35. Lucas E. H. et al., Production of Oncostatic Principles *in vivo* and *in vitro* by Species of Genus *Calvatia*, *Antibiot. Annu.*, 1958-1959:493-496,1959
36. Ikekawa T., et al., Antitumor Activity of Aqueous Extracts of Edible Mushrooms, *Cancer Res.*, 1969, 29: 734-735
37. Kenneth J., Shiitake: The Healing Mushroom, Healing Arts Press, Vermont, 1995
38. Hishida I., Namba H., Kuroda H., Anti-tumor Action of Fruit Body of Edible Mushrooms Orally Administred Extract from Fruit Body of *Grifola frondosa* (maitake). *Chem Pharm Bull*, 1988, 36:1819-1827
39. Chihara G., Antitumor and Immunological Properties of Polysaccharides from Fungal Origin, *Mushr. Sci.*, 1978, IX(2):797-814

40. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y. Y., Arai Y. and Fukuoka F., Fractionation and Purification of the Polysaccharides from Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), *Cancer Res.*, 1970 b, 30:2776-2781
41. Chiara G. Maeda Y. Y Hamuro J., Sasaski T and Fukuoka, F., Inhibition of Mouse sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (berk) Sing, *Nature* (Lond) 222, 687-688, 1969
42. Bluhm T., Sarko A., The Triple Helical Structure of Lentinan, a Linear β -(1-3)-D- Glucan. *Can J Chem.*, 1977, 55:293-299
43. Chihara G., et al., Antitumor and Metastasis-Inhibitory Activities of Lentinan as an Immunomodulator: An overview, *Cancer Detect. Prev.*, 1987 (Suppl.), 1:423-443
44. Fujii T., et al., Isolation and Characterization of a New Antitumor Polysaccharide, KS-2, Extracted from Culture Mycelia of *Lentinus edodes*, *J. Antibiot.*, 1978, 31:1079-1090
45. Lin Y. et al., A Double-Blind Treatment of 72 Cases of Chronic Hepatitis With Lentinan Injection, *N. Drugs Clin. Remedies.*, 1987,6:362-363
46. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y., et al., Antitumor and Metastasis Inhibitory Activities of Lentinan as an Immunomodulator. *Cancer Detect Prev* 1987; (Suppl1):423-43
47. Taguchi T., Clinical Efficacy of Lentinan on Patients With Stomach Cancer: end-Point Result of Four Year follow-up Survey. *Cancer Detect Prev* 1987; (Suppl1): 333-49
48. Kodama N., Komuta K., and Namba H., Effect of D-Fraction, a Polysaccharide from *Grifola frondosa* on Tumor Growth Involve Activation of NK Cells, *Biol Pharm Bull*, 2002 25(12):1647-1650
49. Namba H., Antitumor Activity of Orally Administered D-Fraction from Maitake Mushroom (*Grifola frondosa*) *J. Naturopathic Med.* 1993, 17,1:10-15
50. Adachi K, Namba H, Kuroda H., Potentiation of Host Mediated Antitumor Activity in Mice by beta-Glucan Obtained from *Grifola frondosa* (maitake) *Chem Pharm Bull*, 1987, 35:262-270
51. Kodama N., Komuta K. and Namba H., Can maitake MD-Fraction Aid Cancer Patients?, *Alternative Medicine Review*, 2002, 7, 3:236-239
52. Mizushima Y. Yuhki N., Hosokawa, M., and Kobayashi H., Diminution of Cyclophosphamide-Induced Suppression of Anti-tumor Immunity by an Immunomodulator PS-K and Combined Therapeutic Effects of PS-K and Cyclophosphamide on Transplanted Tumor in Rats. *Cancer Res.*, 1982, 42, 5176-5180
53. Tsukagoshi S., et al., Krestin (PSK), *Cancer Treat. Rev.*, 11, 131-155, 1984
54. Yang QY, Jong SC Zhou, JX, Chen RT, Xu LZ and Xu B. Anti-tumor and immunomodulating Activities of Polysaccharides-Peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. In: Q.Y. Yang and C.Y. Kwok (eds), 1993 *PSP International Symposium* pp. 109-119, Fundan University Press, Shanghai 1993
55. Lee SS, Wei Y. H. Chen C. F. Wang SY, Chen KY., Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. *J. Chin Med* 1995; 6: 1-12

56. Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E. and Misaki A. Structures and Antitumor Activities of Polysaccharides Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Micelyum of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.*, 1985,49: 2641-2653
57. Mizuno T. et al., Fractionation Structural Featres, and Antitumor Activity of Water-Soluble Polysaccharide, from Reishi: the Fruit Body of *Ganoderma lucidum*, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1984, 58:871-880
58. Diplock, A.T. and Charleux, J.L. Functional Food Science and Defense Against Reactive Oxidative Species. *British Journal of Nutrition* 80 Suppl., 1998, 577-612
59. Shieh Y. H., et al., Evaluation of The Hepatic and Renal-Protective Effects of *Ganoderma lucidum* in mice., *Am J. Chin. Med.*, 2001, 29(3-4):501-7
60. Mori K., Toyomatsu T., Namba H., Kuroda H., Anti-tumor Action of Fruit Body of Edible Mushrooms Orally Administred in Mice. *Mushroom Sci* 1987, XII:653-660
61. Danell E. and Fries N., Methods for Isolation of *Cantharellus* Species and The Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon*, 1990 (38): 141-148
62. Tolnai S., A Method for Viable Cell Count I V J. Evans and M.M. Vicent (Eds), Tissue Culture Association Manual, Tissue Culture Association, Rockville MD. 1975: 37
63. Mosmann T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Aplication to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65:225.
64. Ekwall B. and Johanson A., Preliminary Studies on the Validity of *in vitro* Measurement of Drug Toxicity Using Hela Cells. 1, Comparative *in vitro* Cytotoxicity of 27 drugs, *Toxicology Letters*,1980, 5:199-210
65. Bass D.A, Parce J. W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C., Thomas M., Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophilis: A Graded Response to Membrane Stimulation. *J. Immunol.*, 1983, 130:1910-1918
66. Cunningham A. J. and Szenberg A., Further Improvements in the Plaque Technique for Detecting Single Antibody-Forming Cells. *Immunology*,1968, 14:599.
67. Ikekawa T., Uehara N., Maeda Y., Nankinishi M, Fukuoka F., Antitumor Activity of Aqueous Extract of Edible Mushrooms. *Cancer Res.*, 1969, 29: 734-5
68. Furusawa E., Chou SC, Furusawa S., Hirazami A., and Dang Y, Anti-tumor Activity of *Ganoderma lucidum*, and Edible Mushroom, on Intraperitoneally Implanted Lewis Lung Carcinoma in Synergic mice. *Phytother. Res.*, 1992, 6, 300-304
69. Mizuno M, Anti-tumor Polysaccharides from Mushrooms During Storage. *Biofactors*, 2000; 12 (1-4):275-81
70. Susuki C. et al., Killing Activity of Experimental Tumor Cells Given to Macrophage by New Antitumor Immunopotentiator KS-2. *Jpn. J. Bact.*, 1978,33:78
71. Liu F., Ooi V.E. and Chang S.T., Free radical Scavenging Activities of Mushroom Polysaccharide Extracts., *Life Sci.*, 1997, 60(10): 763-71
72. Jeng L. M., Hsiu C. L. and Chin C. C., Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms, *J. Agric. Food Chem.*,2002, 50:6072-6077

73. Mau J. L. and Chao G. R., Antioxidant Properties of Methanolic Extracts from Several Ear Mushrooms, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49,(11):5461-5466
74. Miya T and Nishijima M., Studies on Fungal Polysaccharides, XXVII Structural Examination of a Water-Soluble, Anti-tumor Polysaccharide of *Ganoderma lucidum*, *Chem Pharm. Bull.*, 1981 29: 3611-3616
75. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., Arai Y. and Fukuoka F., Fractionation and Purification of the Polysaccharides from Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), *Cancer Res.*, 1970 b, 30:2776-2781
76. Eisen H. *Inmunología : Introducción a los Principios Moleculares y Celulares de las Respuestas Inmunitarias*, Ed. Salvat, 1979
77. Ooi V. E., Liu F., Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes, *Curr. Med. Chem.*, 2000, 7(7):715-29
78. Tani M. et al., *In vitro* Generation of Activated Natural Killer Cells and Cytotoxic Macrophages with Lentinan, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 42, 623-627
79. Arinaga S et al., Enhanced Induction of Lymphokine-Activated Killer After Lentinan Administration in Patients With Gastric Carcinoma., *Int. J. Immunopharmacol.*, 14, 535-539, 1992 a
80. Chihara G., Immunopharmacology of Lentinan, a Polysaccharide Isolated from *Lentinus edodes*: Its Application as a Host Defence Potentiator., *Int. J. Oriental Med.*, 17, 55-77, 1992
81. Hamuro J., Chihara G., Lentinan, a T-cell Oriented Immunopotentiator: Its Experimental and Clinical Applications and Possible Mechanism of Immune Modulation In: Fenichel RL, Chirigos MA, eds. *Immune Modulation Agents and their Mechanisms*. New York: Marcel Dekker, 1985: 409-36
82. Maeda Y.Y. and Chihara G. Lentinan, a New Immunoaccelerator of Cell Mediated Responses, *Nature (Lond)*.,1971, 222, 634
83. Maeda Y. Y., Antitumor Polysaccharides and Host Defence Against Cancer, in *Host Defence Against Cancer and Its Potentiation*, Mizuno D., Chihara G., Fukuoka F., Yamamoto T. and Yamamura Y., Eds., University of Tokyo Press, Tokyo, 1975: 181-197

APENDICE 1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APENDICE 1

PREPARACION DE ANTIGENO TIMODEPENDIENTE (TD)

Glóbulos Rojos de Carnero

Después de 4 días de haber sido extraídos los eritrocitos, se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85% y fueron resuspendidos al 10% en la misma solución. Estos eritrocitos se utilizaron como antígeno testigo TD (Knothe, 1979)

TRATAMIENTO DE LOS SUEROS ANTES DE USARSE COMO FUENTE DE COMPLEMENTO

La muestra de sangre de cobayo, se recogió en un tubo de vidrio que fue colocado en frío (4 °C) para evitar la inactivación de las proteínas del complemento. Se dejó retraer el coágulo durante 15 min a 4 °C y se centrifugó a 3000 rpm, a 4 °C durante 5 min. El suero se recuperó con pipeta Pasteur y se mantuvo a 4°C. Con el objeto de remover cualquier anticuerpo natural que se pudiera encontrar en el suero, éste se adsorbió con las células rojas que iban a ser empleadas en el sistema indicador. La adsorción se realizó de la siguiente manera:

En un tubo de ensayo se colocó un volumen de eritrocitos igual a $1/3 - 1/2$ del volumen del suero que iba a ser adsorto. Estos eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina al 0.85%. Después de la última lavada se descartó toda la solución salina y se agregó el suero fuente de complemento. Se incubó la muestra a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min (a esta temperatura no se activa el complemento y las IgM se fijan perfectamente a su antígeno específico). Posteriormente la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el suero se recuperó con pipeta Pasteur y se colocó en otro tubo que fue mantenido a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso inmediato.

PREPARACION DE SISTEMA INDICADOR

Se preparó un sistema indicador (SI) con los siguientes componentes:

— 0.5 mL de eritrocitos de carnero al 10% en solución salina

— 0.5 mL de suero de cobayo adsorto en eritrocitos de carnero

— 2.0 mL de medio RPMI 5% STF

TRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS PARA LA CONSTRUCCION DE CAMARAS DE CUNNINGHAM

Los Portaobjetos, se colocaron en canastillas metálicas para portaobjetos y se sumergieron en un recipiente con agua bidestilada y se sometieron a ebullición. Posteriormente se les cambió el agua bidestilada con extrán y se sometieron nuevamente ebullición durante 20 min. Se sacaron las canastillas con los portaobjetos y se enjuagaron con agua corriente hasta que quedaron libres de espuma. Enseguida se colocaron nuevamente en el recipiente con agua bidestilada y se sometieron a ebullición. Posteriormente las canastillas con portaobjetos fueron retiradas del recipiente y se les dejó secar por evaporación. Después se sumergieron en un recipiente que contenía alcohol-acetona v/v y se dejaron ahí durante 20 min. Para desengrasarlos. Después de este tiempo se sacaron de la mezcla desengrasante y se dejaron secar durante 15 min.

Estos portaobjetos limpios y desengrasados, se utilizaron en la construcción de cámaras de Cunningham.

CONSTRUCCION DE CAMARAS DE CUNNINGHAM

Los portaobjetos limpios y desengrasados se colocaron en hilera sobre una superficie plana y fueron alineados sobre un borde recto. Enseguida se colocó sobre ambos bordes longitudinales una cinta biadherente de aproximadamente 6mm de ancho.

Posteriormente se retiró la capa protectora de la cinta y se colocó otra hilera de portaobjetos sobre la primera y fueron aplanados por ambos bordes longitudinales con un rodillo manual. La hilera de portaobjetos se dobló individualmente para separar una cámara de otra. El volumen de la cámara está dado por el espacio que se forma entre porta y porta por el grosor de la cinta (aproximadamente 150 – 200 μL).

CALCULOS PARA LA DETERMINACION DE CFP-IgM

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

CFP-IgM

En 1000 μL están contenidas ----- 5×10^6 células

En 200 μL ----- X

X = 1×10^6 células

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

200 μL de células + 200 μL de SI = 400 μL

400 μL ----- 1×10^6 células

*150 μL ----- X

X = 0.375×10^6 células

* Volumen colocado en cámara

En 0.375×10^6 células ----- No. de CFP que se contaron

En 1×10^6 células ----- X

X = No. de CFP-IgM/Millón

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Xóchitl Sofía Ramírez Gómez

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con

Especialidad en Farmacología y Toxicología

Título de la Tesis: Evaluación de Citotoxicidad Selectiva, Estrés Oxidativo y Efecto Inmunomodulador de Extractos de Macromicetos del Noreste de México.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología

Biografía:

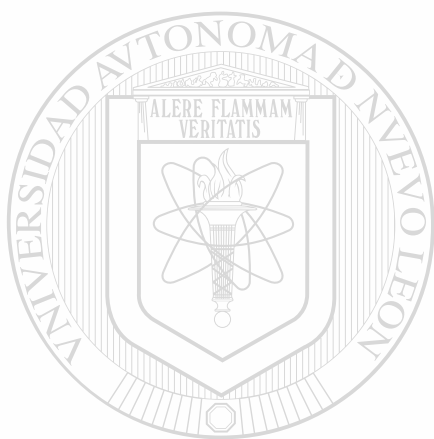
Datos personales: Lugar y fecha de nacimiento: Celaya, Guanajuato, México, el 18 de Septiembre de 1975. Estado civil: soltera.

Escolaridad: Técnico Laboratorista Clínico por el CBTis 198 plantel Celaya en 1993. Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guanajuato en 1999. Diplomado en Farmacia Comunitaria y Asistencial por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2003.

Experiencia Profesional: Participación como maestro de Química y Física de 1998 al 2000 en la Preparatoria Oficial de la Universidad de Guanajuato. Participación como Farmacéutico en el programa de Farmacia Hospitalaria de Agosto de 1999 a Septiembre del 2000 en el Hospital General de Guanajuato. Presentación de trabajos de investigación en Congresos Nacionales:

- Sinergismo del efecto hipoglucémico de la morfina y de la insulina. XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 1999.
- Estructura tridimensional de las encefalinas DSLET y DPDPE, su relación con receptores opiodes. XVIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 2000
- Evaluación de toxicidad selectiva hacia células de hepatoma y actividad antioxidante in vitro de extractos de macromicetos del noreste de México. VIII Congreso Nacional de Micología, Toluca Mex. 2003.
- Evaluación de citotoxicidad selectiva, actividad antioxidante e inmunomoduladora de macromicetos del noreste de México. XXI Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 2003.
- Evaluación de la actividad biológica in vitro de macromicetos del noreste de México. XXVII Congreso Nacional de Farmacología, Villahermosa Tabasco, Marzo 2004.
- Evaluación de la actividad biológica de extractos de *Lentinus lepideus* del noreste de México. XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Monterrey N.L., Octubre 2004.

Distinciones: Reconocimiento al mejor estudiante del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología por la Facultad de Medicina de la UANL durante el ciclo 2001-2002. Reconocimiento al mejor estudiante de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo durante el ciclo 1997-1998.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



