

**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. XOCHITLI

RAMIREZ

SOFIA

RAMIREZ

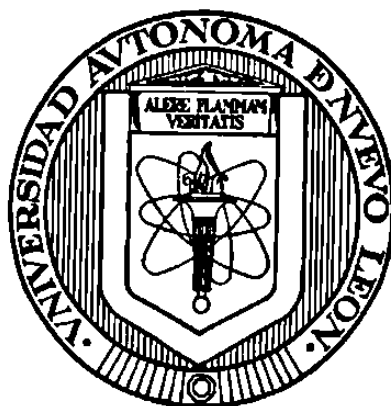
GOMEZ



1080127184

**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.**

**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



**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



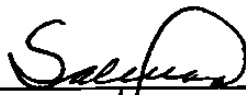
---

**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

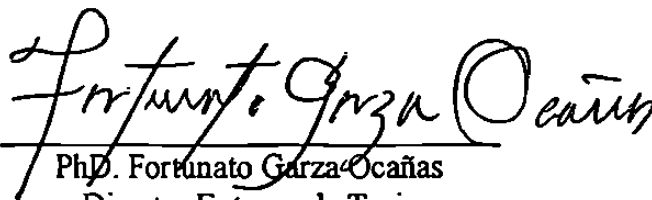
Q.F.B. Xóchitl Sofia Ramírez Gómez

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
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>17</b>
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

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
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 <sub>50</sub> )	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

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
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
 <b>3. RESULTADOS</b>	 38
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

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
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

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
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
<b>4. DISCUSION</b>	86
<b>5. CONCLUSIONES</b>	94
<b>PERSPECTIVAS</b>	95
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	96
<b>APENDICE 1</b>	101

## 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 <sub>50</sub> obtenidos para extractos metanólicos de macromicetos mediante evaluación microscópica y prueba de reducción del MTT.	45
IV. Valores de CT <sub>50</sub> 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 <sub>50</sub> 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

$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	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
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
$\text{CT}_0$	Concentración citotóxica 0%
$\text{CT}_{50}$	Concentración citotóxica 50%
$\text{CT}_{100}$	Concentración citotóxica 100%
DE	Desviación estándar
g	Gramos
hrs	Horas
Ig M	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
$\text{INF-}\gamma$	Interferón- $\gamma$
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
$\text{TNF-}\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
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<sup>1,2</sup>.

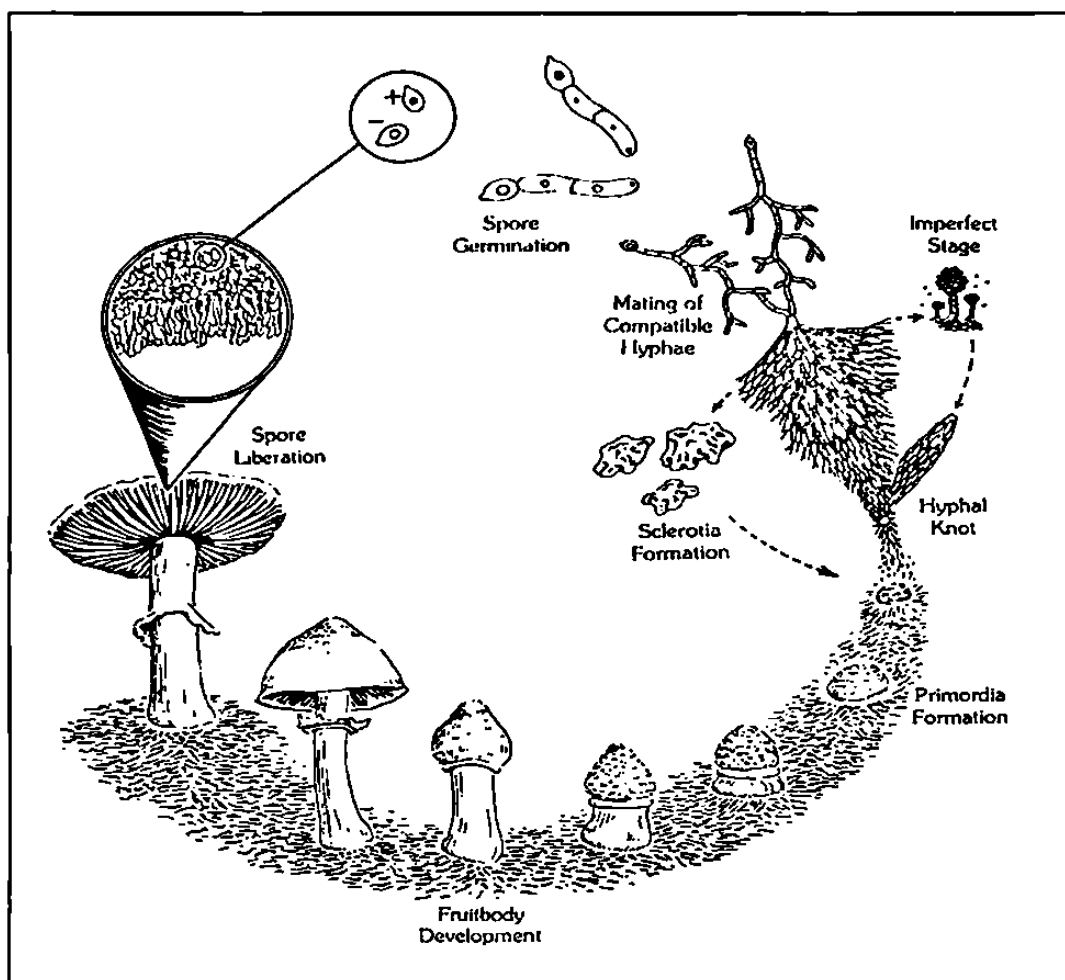
### **Basidiomicetos**

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 crecimiento<sup>1-7</sup> (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 familiares<sup>1-8</sup> (Figura 2).



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

### 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<sup>1,2</sup>.

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 mediterránea<sup>2</sup>.

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<sup>1,2</sup>.

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<sup>9-11</sup>.



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<sup>1,12</sup>. 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 salud<sup>1</sup>. 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*<sup>12-19</sup>.

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<sup>1,2,13,20</sup>.

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<sup>13, 15-21</sup>.

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 Japón<sup>13-15</sup>, poseen efectos potencialmente terapéuticos entre los que se incluyen efectos hipoglucemiantes, hipocolesterolemiantes, antihipertensivos, analgésicos, antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales e inmunomoduladores<sup>22-29</sup>. 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 morbimortalidad 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.

---

---

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*
  - *Lentinus edodes*
  - *Pleurotus ostreatus*
  - *Pholiota nameko*
  - *Poria cocos*
  - *Schizophyllum commune*
  - *Trametes (Coriolus) versicolor*
  - *Tremella fuciformis*
  - *Volvariella volvacea*
- 
- 

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<sup>13,30-33</sup>.

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.<sup>34</sup> 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.<sup>35</sup> 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.<sup>36</sup> 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*.

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 Maitake<sup>13</sup>. 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*<sup>13,37-40</sup>.

### ***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)<sup>37</sup>. La actividad antitumoral de este hongo se demostró en 1969 por Chihara y cols.<sup>41</sup> 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 Bluhm<sup>42</sup>, elucidó la estructura química de este compuesto, utilizando métodos de cristalografía y comprobó que se trataba de un polisacárido  $\beta$ -D-glucano lineal con enlaces (1-3), poco soluble en agua y con un peso molecular entre 950 y 1050 KDa.

En 1978 Chihara<sup>39</sup> observó que la actividad antitumoral de la Lentina se producía por estimulación del sistema inmune, posteriormente en 1987 Chihara y cols.<sup>43</sup> observaron que la Lentina aumentaba la producción de citocinas como IL-1, IL-2, FNT- $\alpha$ , así como la activación de células T, células B, Células NK y macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En 1978 Fujii y cols.<sup>44</sup> 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.<sup>45</sup> 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<sup>46,47</sup>.

### ***Grifola frondosa***

La fracción D extraída de cuerpos fructíferos de *Grifola frondosa* contiene  $\beta$ -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 tumorales<sup>48</sup>. En 1987 Namba y cols.<sup>49-50</sup> 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 NK<sup>51</sup>.

### *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<sup>1,14</sup>. 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, cérvico-uterino, de mama y de pulmón<sup>52,53</sup>.

En 1993 Yang<sup>54</sup> 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<sup>1,13,55</sup>. El PSG es un polisacárido soluble en agua, aislado a partir de extractos acuosos de carpóforos de *Ganoderma lucidum*. En 1985 Sone y cols.<sup>56</sup> 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.<sup>57</sup> 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 $\beta$ , IL-6 TNF- $\alpha$ , y IFN- $\gamma$ , 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<sup>58,59</sup>.

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 inmune<sup>60</sup>.



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.

## **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.

###### **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  $\mu$ m 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  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L y de 100-1000  $\mu$ L (Eppendorff)**

**Pipetas lineales de 25, 10 y 5 mL**

**Pipetas Pasteur desechables (Kimble)**

**Pipeteador automático Pipet-aid (Sigma)**

**Portaobjetos de vidrio 25X75 (Corning)**

**Potenciómetro  $\Phi$ 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

**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

## **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 Norkrans<sup>61</sup>.

#### **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**

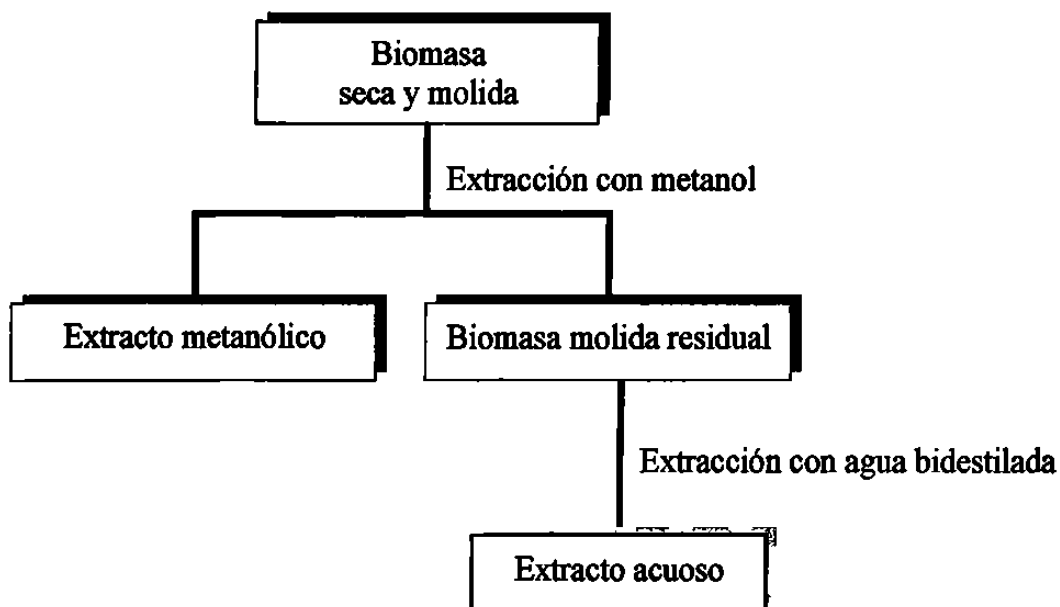
#### **2.2.5.1 Obtención de extractos metanólicos**

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% CO<sub>2</sub> 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 tripano<sup>62</sup>. De esta suspensión celular se tomaron 100  $\mu$ L y se colocaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se determinó la concentración celular. La densidad celular se ajustó a  $2 \times 10^4$  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% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub> 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 CT<sub>100</sub> 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 CT<sub>0</sub>.

#### **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 Mosman<sup>63</sup>.

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  $\lambda$  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 Ekwall<sup>64</sup>.



## **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.<sup>65</sup>

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  $2 \times 10^4$  cel/mL, con los nutrientes ya mencionados y se incubaron a 37 °C en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub> 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 Cunningham<sup>66</sup>.

#### **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  $\mu$ 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  $5 \times 10^6$  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  $\mu$ L de células de bazo ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 cuál 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

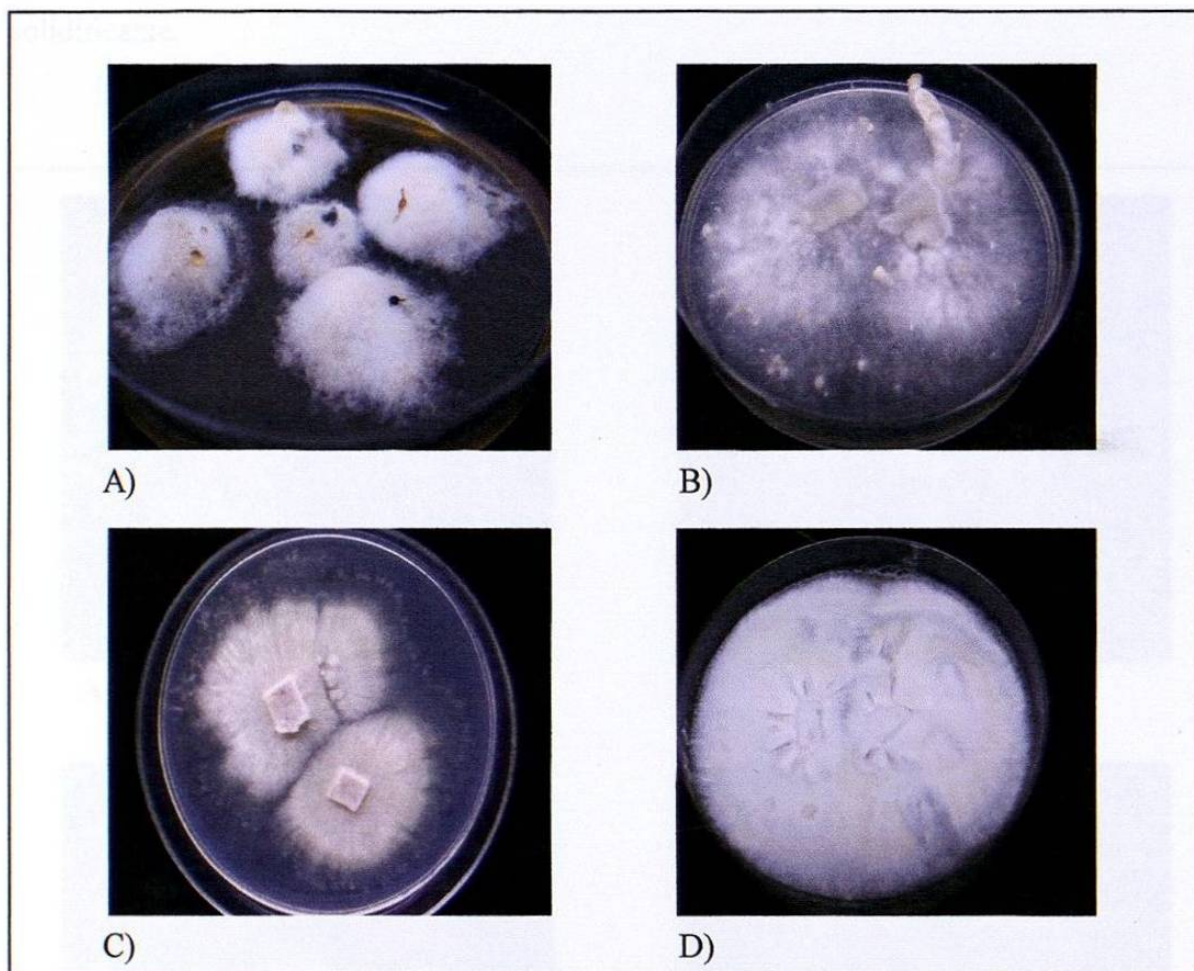
La figura 4 muestra los carpóforos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*. Estos hongos fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares.



**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*.

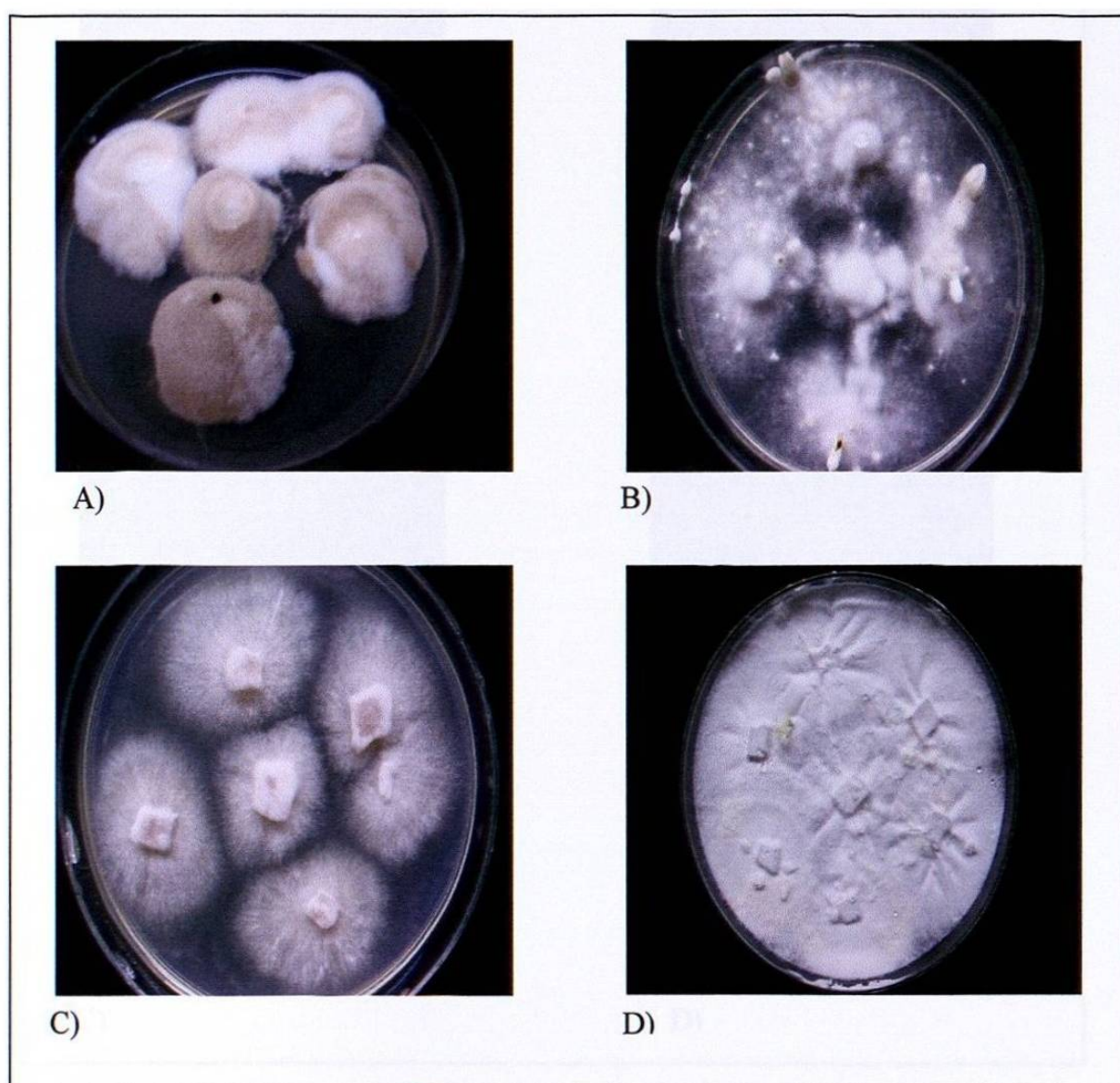
### 3.3 Identificación de Cultivos puros

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

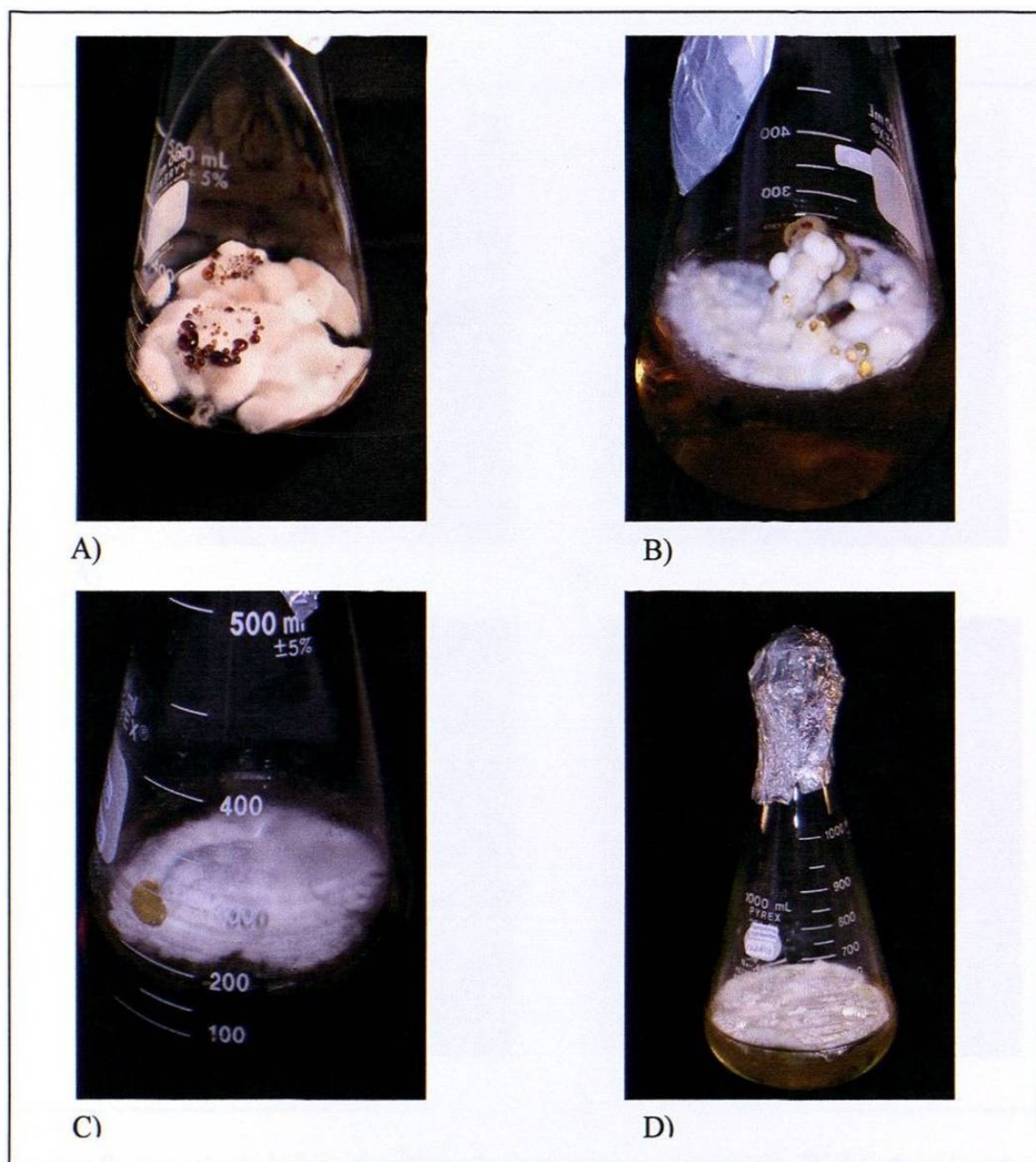
En la figura 6 se muestra el crecimiento miceliar en medio sólido de Melin Norkrans, incubados a 25 °C, durante 3 a 4 semanas. En estos cultivos se utilizó agar como agente solidificante.



**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

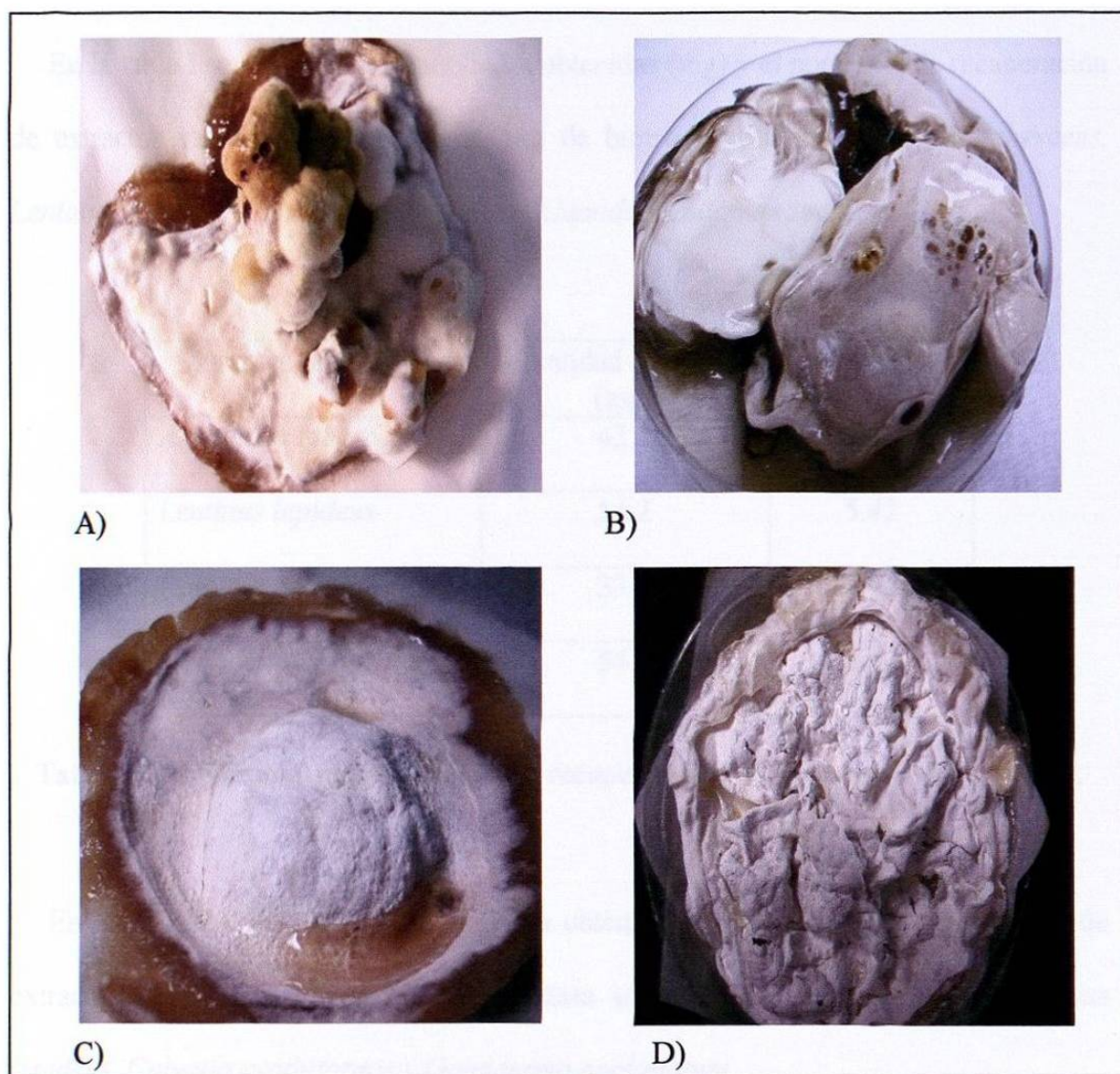
En la figura 7 se muestra el crecimiento miceliar de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en medio líquido de Melin Norkrans e incubados a 25 °C, durante 2 meses.



**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 (CT<sub>50</sub>) 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 CT<sub>50</sub> 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 CT<sub>50</sub> 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 <sub>50</sub> después de 72 hrs de exposición a extractos metanólicos				
CT <sub>50</sub> (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 <sub>50</sub> después de 72 hrs de exposición a extractos acuosos				
CT <sub>50</sub> (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.

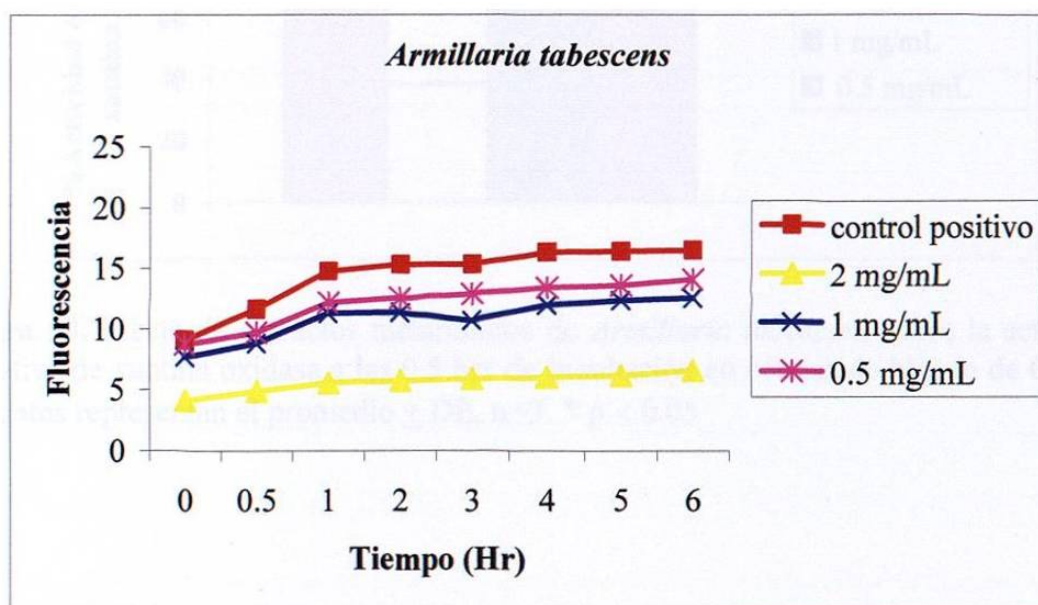


### 3.8 Evaluación de estrés celular oxidativo mediante la prueba del diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

#### 3.8.1 Extractos metanólicos

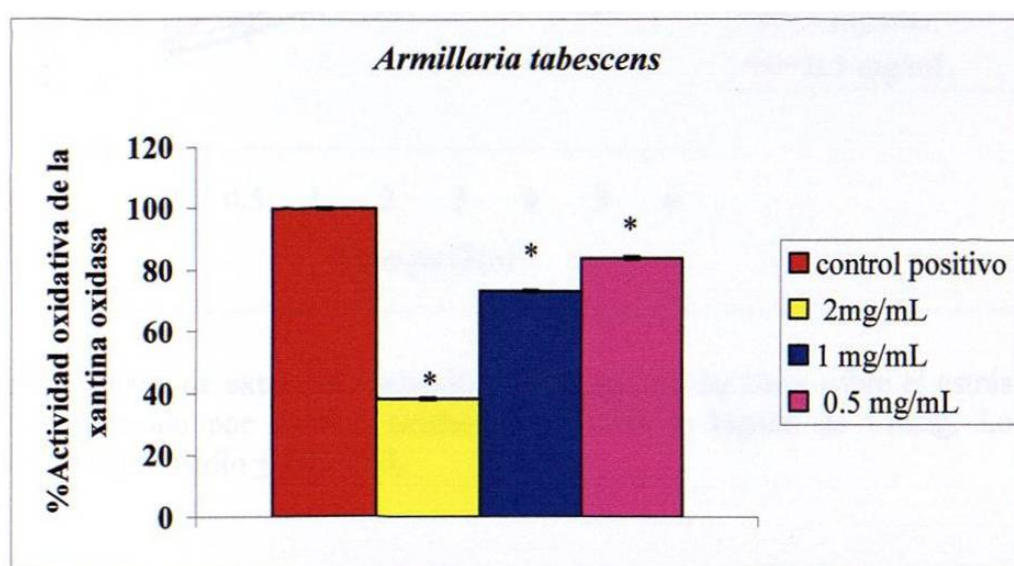
Al evaluar el efecto de los extractos metanólicos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre el estrés celular oxidativo generado por la xantina oxidasa (inductor de radicales libres) se observó que los extractos de las cuatro especies evaluadas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



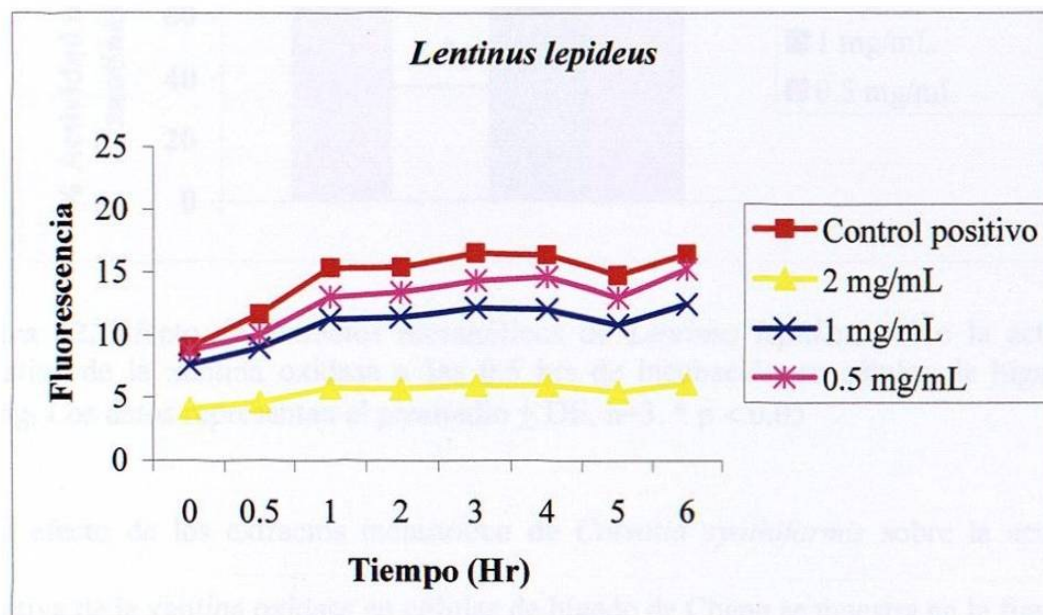
**Figura 9.** Efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ .

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).



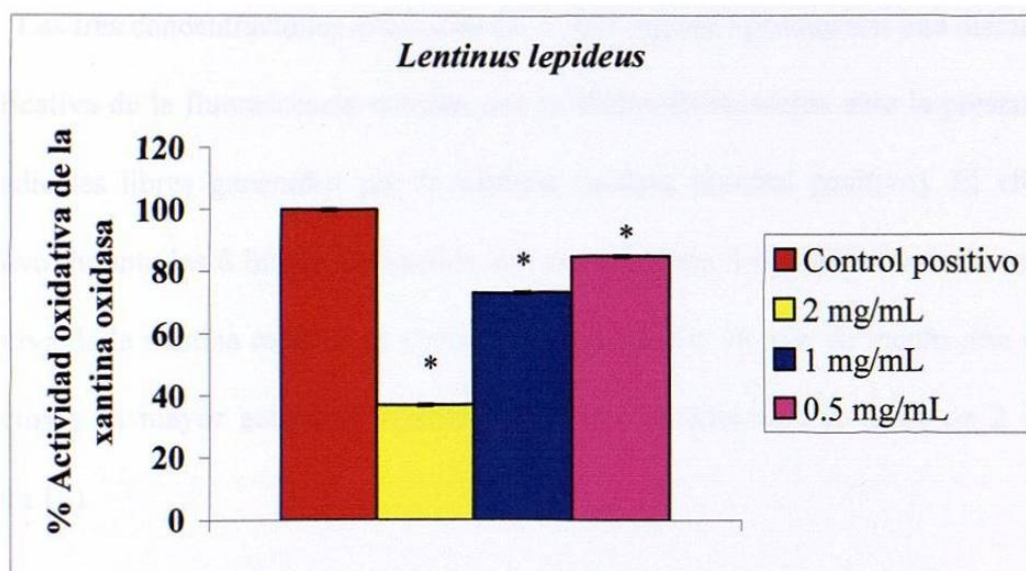
**Figura 10.** Efecto de extractos metanólicos de *Armillaria tabescens* sobre la actividad oxidativa de xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE, n=3. \* p < 0.05

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.



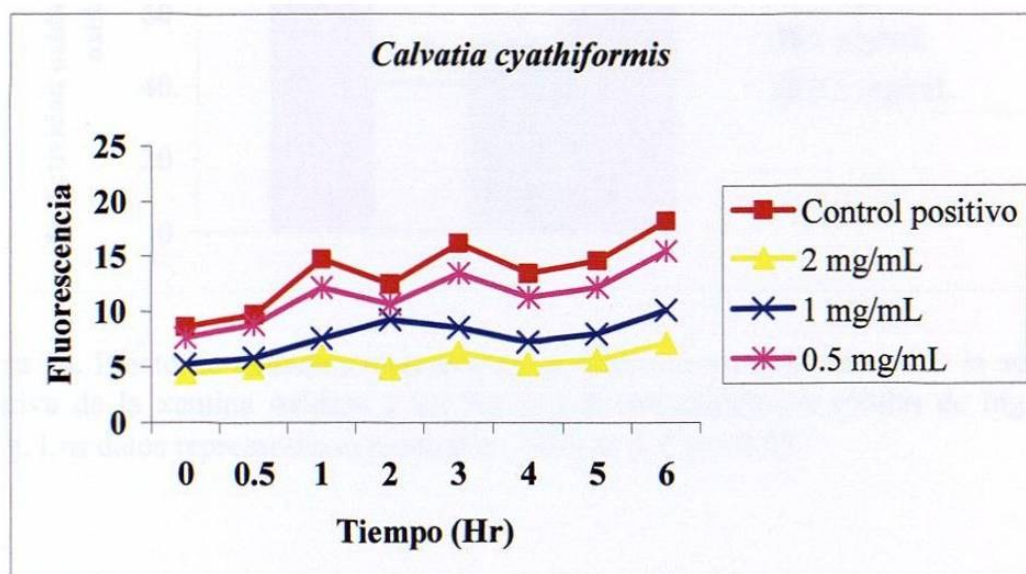
**Figura 11.** Efecto de extractos metanólicos de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ .

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.