

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 acuoso 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.

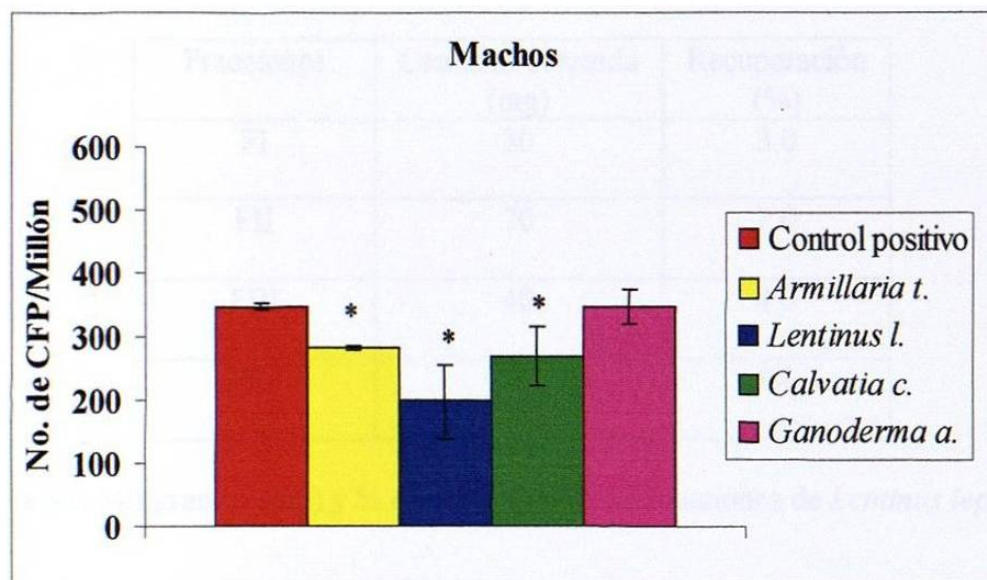


Figura 36. Efecto de los extractos acuosos de macromicetos en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo $n=4$. * $p < 0.05$

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>				
Fracciones				
Línea celular	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).

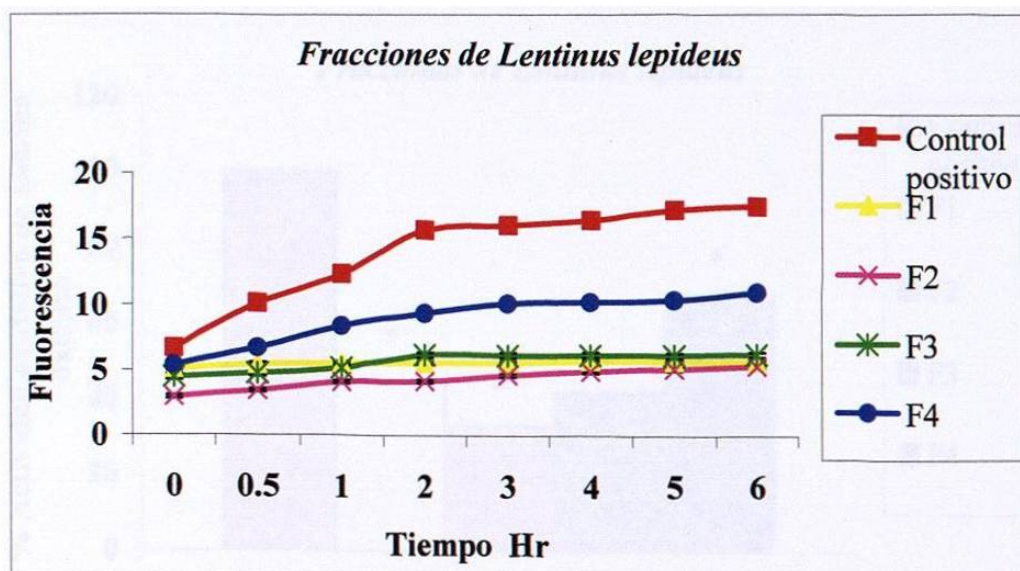


Figura 37. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre el estrés celular oxidativo generado por xantina oxidasa en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm DE, n=3. * $p < 0.05$

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 inicio 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).

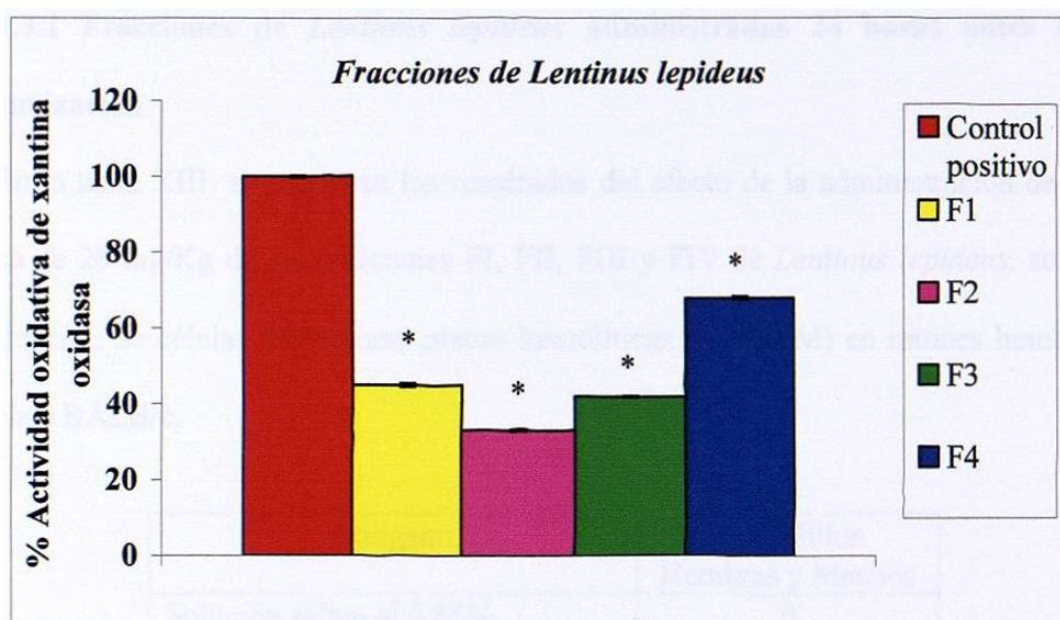


Figura 38. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa a las 0.5 hrs de incubación en células de hígado de Chang. Los datos representan el promedio \pm la DE, n=3. * $p < 0.05$

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.

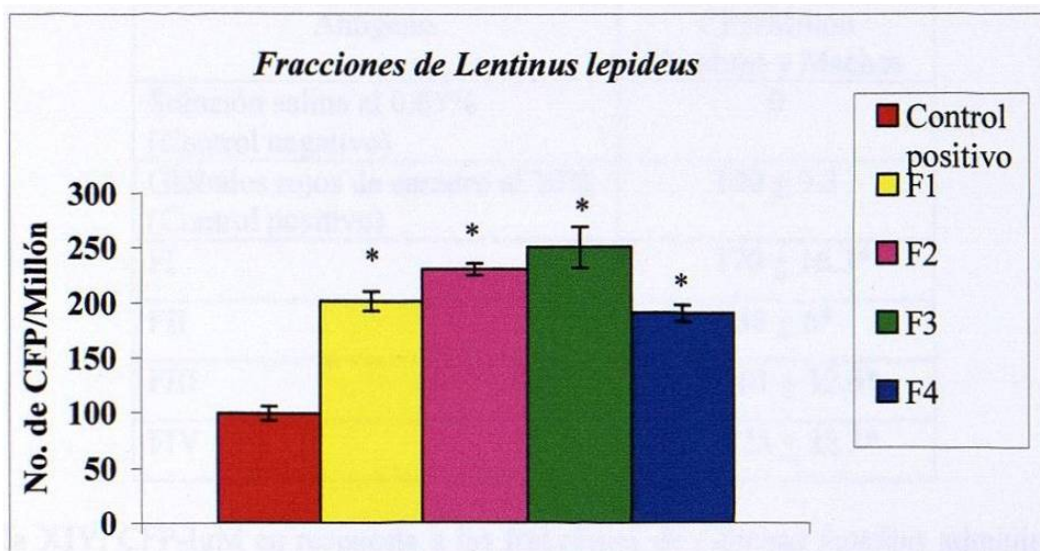


Figura 39. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo n=8. * $p < 0.05$

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.

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 lepeideus* 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 lepeideus* administradas conjuntamente con la inmunización en ratones hembras y machos.

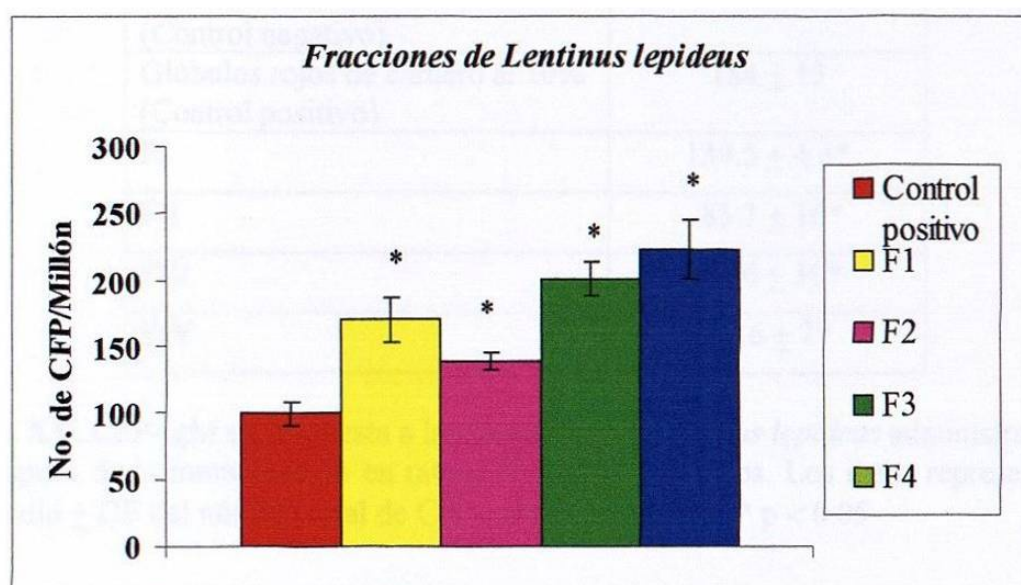


Figura 40. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepeideus* administradas conjuntamente con la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. Los datos representan el promedio ± DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * p 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

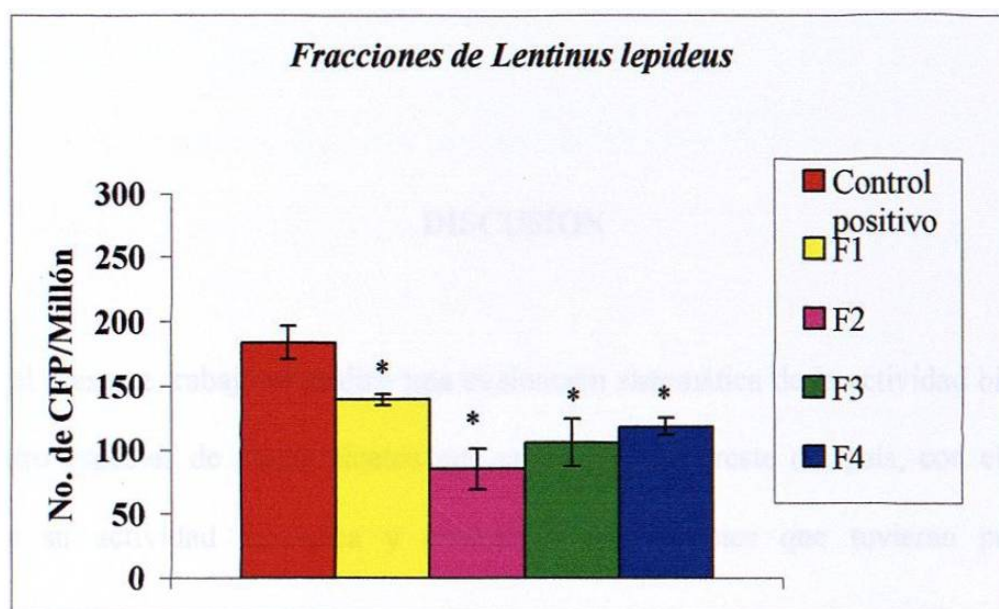


Figura 41. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* administradas 24 hrs después de la inmunización en la producción de células formadoras de placas hemolíticas (CFP-IgM) en ratones hembras y machos BALB/c. Los datos representan el promedio \pm DE del número total de CFP-IgM en bazo. n=8. * $p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

En este esquema de inmunización las cuatro 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 quimiotaxonómicos, 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.

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-Hyperlipois 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 Extracs., *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

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

$$X = 1 \times 10^6 \text{ células}$$

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

400 μL ----- 1×10^6 células

*150 μL ----- X

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

* Volumen colocado en cámara

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

En 1×10^6 células ----- X

$$X = \text{No. de CFP-IgM/Millón}$$

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.



