



Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México

LOURDES GARZA OCAÑAS*, XÓCHITL S. RAMÍREZ GÓMEZ*, FORTUNATO GARZA OCAÑAS***,
MARIO C. SALINAS CARMONA**, NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES****,
YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS*, OSCAR TORRES ALANÍS*

Desde hace más de 7000 años, los países asiáticos como China, Corea y Japón, han utilizado los macromicetos como base de su medicina tradicional y su alimentación. Uno de los hongos más utilizados por estas culturas han sido el *Lentinus edodes* o Shiitake, el cual es silvestre y comestible, actualmente constituye el segundo hongo comestible más cultivado en el mundo.^{1,3} En estudios realizados con extractos acuosos obtenidos de carpóforos de *Lentinus edodes*, se demostró que éste posee actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* y que dicha actividad está mediada por estimulación del sistema inmune. La lentina es un polisacárido con efecto antitumoral e inmunomodulador aislado de este hongo y actualmente se encuentra en etapa de estudios, en fase clínica.⁴ Otras especies del género *Ganoderma*, *Calvatia* y *Grifola*, al igual que *Lentinus edodes*, han mostrado poseer efectos potencialmente terapéuticos entre los que se incluyen efectos analgésicos, antiinflamatorios, antivirales, hipoglucemiantes, hipocolesterolemiantes, antioxidantes, antitumorales e inmunomoduladores.⁵ De particular interés ha sido la actividad antitumoral que se ha reportado para algunos de ellos, ya que el cáncer ocupa los primeros lugares de morbilidad en el mun-

do; por tal motivo, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con actividad antineoplásica ha ido en aumento.

Recientemente, el estudio de la actividad antitumoral de los hongos se ha convertido en un campo de particular importancia en este contexto. En las últimas décadas, los macromicetos se han postulado como nuevas fuentes naturales de compuestos bioactivos, ya que se han aislado a partir de micelio y cuerpos fructíferos de hongos asiáticos una gran variedad de componentes macromoleculares tales como polisacáridos, glicoproteínas y ácidos nucleicos, los cuales han demostrado poseer actividad antitumoral relacionada con la activación de la respuesta inmune del hospedero.^{6,8} A pesar de que México posee una gran diversidad de macromicetos, la evaluación de la actividad biológica de los mismos constituye, a la fecha, un campo poco explorado. Por lo anterior, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad Autónoma de Nuevo León se inició

* Departamento de Farmacología y Toxicología, FM-UANL

** Departamento de Inmunología, FM-UANL

*** Departamento de Silvicultura, FCF-UANL

**** Departamento de Química Analítica, FM-UANL

una línea de investigación dirigida a la evaluación sistemática de la actividad biológica de las especies de macromicetos que crecen en nuestro país, con la finalidad de seleccionar aquéllos con potencial uso farmacológico para la realización de estudios de aislamiento e identificación de los compuestos activos. En este trabajo se reportan los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de la citotoxicidad selectiva, actividad antioxidante e inmunomoduladora de extractos acuosos de cuatro especies de macromicetos del noreste de México: *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, los cuales se seleccionaron con base en criterios etnofarmacológicos y quimio-taxonómicos.

Materiales y métodos

Recolección e identificación de especímenes

Los carpóforos de *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* se recolectaron en bosques templados de coníferas y de encinos del municipio de Galeana, Nuevo León, en 2001. Los hongos fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares.

Aislamiento

Los cultivos puros se obtuvieron siguiendo los principios técnicos para el aislamiento y propagación de tejidos fúngicos utilizando el medio de Melin Norkrans.⁹

Cultivo in vitro de macromicetos

A partir de las cepas aisladas de *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, se realizaron cultivos en fase sólida y fase líquida, utilizando un medio modificado de Melin Norkrans con y sin agar, respectivamente. Los cultivos en medio líquido se incubaron en matraces de 500 mL a 25°C y se observó el crecimiento miceliar cada 24 horas, durante dos meses.

Obtención de biomasa

Las muestras de la biomasa de cada cepa cultivada se recuperaron por filtración y el material obtenido se lavó varias veces con agua destilada y se liofilizó como método de secado en un liofilizador VirTis Freezemobil 12.

A 1g de biomasa seca y molida de cada hongo se le realizaron tres extracciones con 25 mL de agua bidestilada. Los filtrados obtenidos en cada paso se combinaron y se concentraron hasta sequedad en un liofilizador. Los extractos secos se pesaron y se guardaron a 4°C protegidos de la luz hasta su utilización.

Evaluación de la actividad biológica de macromicetos

Exposición de líneas celulares a extractos de macromicetos y evaluación de citotoxicidad selectiva

Se realizaron cultivos de líneas celulares de origen humano: células de hígado de Chang (benignas) y células de hepatoma, HepG2 (neoplásicas), obtenidas de la American Type Culture Collection (ATTC), utilizando como nutriente medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) (Sigma Chemical Co. E.U.A).

Para la realización de las pruebas de citotoxicidad, las células se sembraron en placas de 96 celdillas (Falcón) a una densidad celular de 2×10^4 células/mL, con los nutrientes ya mencionados, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en un ambiente de 5% CO₂ y 95% aire hasta la formación de monocapa celular.

Las células fueron expuestas a doce concentraciones de cada uno de los extractos (rango de 2 mg/mL a 0.00098 mg/mL) y se incubaron durante 72 horas a 37°C. Se utilizaron tres celdillas de la placa para cada concentración y la evaluación se repitió en tres ocasiones diferentes, en experimentos separados. Los controles sólo fueron expuestos al medio en que se disolvieron los extractos (MEM). Los parámetros para determinar citotoxicidad selectiva fueron adhesión celular a la placa de cultivo, la cual se evaluó mediante revisión microscópica (micro-

copio Axiovert 100) y la prueba espectrofotométrica de reducción del Metiltetrazolio (MTT), de acuerdo al método de Mosmann.¹⁰ La citotoxicidad cincuenta (CT₅₀) se calculó de acuerdo al criterio de Ekwall.¹¹

Evaluación de la actividad antioxidante/prooxidante

Para la evaluación de actividad antioxidante/prooxidante se utilizaron células de hígado de Chang, las cuales fueron sembradas en placas de 96 celdillas (2X10⁴ cel/mL) con los nutrientes ya mencionados, y se incubaron durante 24 horas para la formación de monocapa. El diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) se utilizó como un indicador intracelular de especies reactivas de oxígeno, de acuerdo al método de Bass *et al.*¹² Las células fueron expuestas a los extractos en el mismo rango de dosis utilizado para evaluar citotoxicidad. Se utilizaron tres celdillas de la placa para cada concentración y la evaluación se repitió en tres ocasiones diferentes en experimentos separados. Los controles sólo fueron expuestos al medio en el que se disolvieron los extractos (MEM). Como control positivo se usó la xantina oxidasa. La fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 nm y 530 nm, respectivamente. Las mediciones se realizaron en intervalos de una hora, durante seis horas.

Evaluación del efecto inmunomodulador sobre la producción de anticuerpos IgM

Animales

Se utilizaron 48 ratones, hembras y machos, de la cepa BALB/c (30-35 g de peso). Éstos se mantuvieron bajo condiciones de ciclos de doce horas luz/oscuridad, y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Administración de extractos a ratones BALB/c

Los ratones se separaron en seis grupos de ambos sexos (n=8). Los extractos se administraron a una dosis única de 20 mg/Kg, mediante sonda orogás-

trica, inmediatamente después se inmunizaron vía intraperitoneal (i.p.) con 0.2 mL de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10%. Los grupos control sólo recibieron el solvente (agua destilada), el control negativo se inmunizó con 0.2 mL de solución salina estéril al 0.85% (i.p.) y el control positivo se inmunizó con 0.2 mL de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10% (i.p.). Después de 72 horas de la inmunización, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el bazo. Posteriormente se determinó el número de células formadoras de anticuerpos IgM contra glóbulos rojos de carnero (antígeno timodependiente) mediante la técnica de Jerne modificada por Cunningham.¹³

Análisis estadístico

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

Resultados

Cultivo in vitro de macromicetos

En la figura 1 se muestran los carpóforos de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en su hábitat natural, además del crecimiento micelial *in vitro* de las especies de macromicetos evaluadas.

Determinación de citotoxicidad selectiva

Se evaluaron doce concentraciones (rango de 2 mg/mL a 0.00098 mg/mL) para cada extracto. Los extractos acuosos de las cuatro especies evaluadas no fueron citotóxicos (tabla I).

Evaluación de la actividad antioxidante

Las tres concentraciones de los extractos acuosos de las especies evaluadas (0.5, 1 y 2 mg/mL) produjeron una disminución significativa de la actividad oxidativa de la xantina oxidasa (control positivo). El efecto se mantuvo durante las seis horas de evaluación del experimento (figura 2). La inhibi-

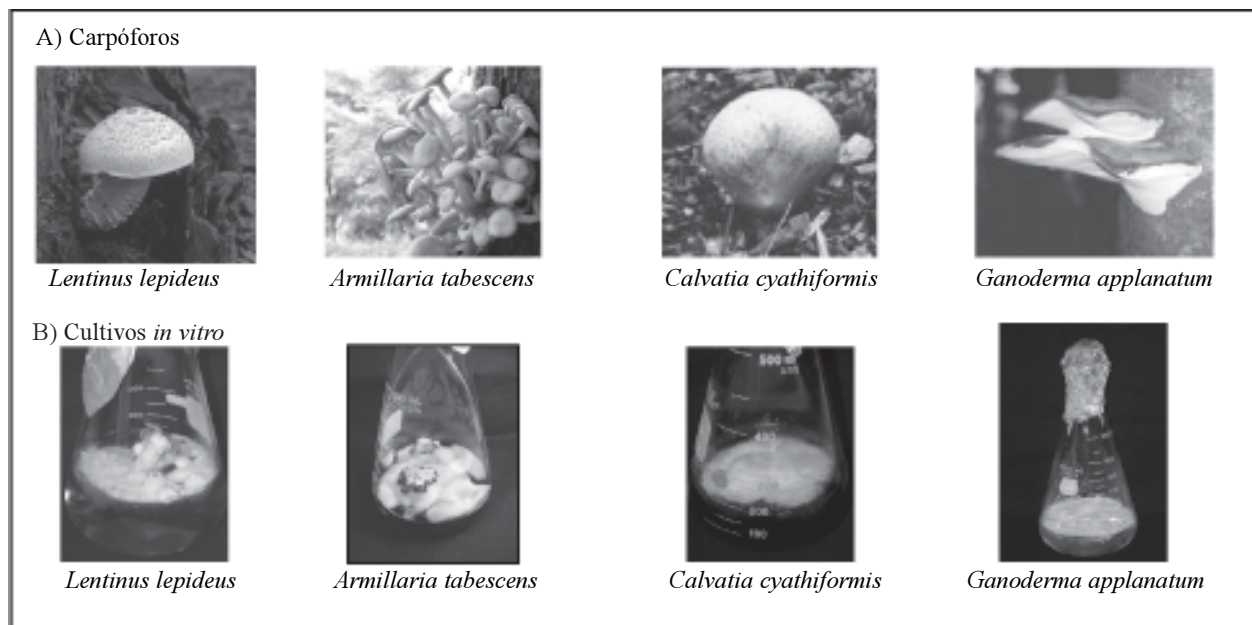


Fig. 1. Aspecto de los carpóforos y de los cultivos de macromicetos en medio líquido de Melin.

ción de la actividad oxidativa se observó a los 30 minutos de incubación con los extractos y la mayor actividad inhibitoria para las cuatro especies ocurrió con la dosis de 2 mg/mL.

Evaluación del efecto inmunomodulador sobre la producción de anticuerpos IgM

En la tabla II se muestra el promedio del número de células formadoras de anticuerpos IgM en ratones hembras y machos, después de la administración de una dosis única de 20 mg/Kg de extractos acuosos de las especies de macromicetos evaluadas. Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus* produjeron un aumento significativo en la respuesta del sistema inmune al incrementar en un 84% el nú-

mero de células formadoras de anticuerpos IgM (CFP-IgM) en bazo de ratones BALB/c. Con los extractos acuosos de *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* no se observó diferencia significativa con el grupo inmunizado con glóbulos rojos de carnero (control positivo). En el control negativo no se observó la formación de CFP.

Discusión

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 con potencial farmacológico. Las especies evaluadas se seleccionaron de acuerdo a criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos, es decir, con base en el uso de estas especies en la medicina tradicional oriental para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo varios tipos de cáncer y con base en antecedentes de la actividad biológica (citotoxicidad selectiva, efecto antioxidante e inmunomodulador) reportada para otras especies del mismo género como *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* y *Calvatia gigantea* que crecen en China y Japón. El aislamien-

Tabla I. Concentración citotóxica cincuenta (CT₅₀) después de 72 horas de exposición a extractos acuosos.

CT ₅₀ (g/mL)				
L nea 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

Valores de CT₅₀ obtenidos para los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis*, y *Ganoderma applanatum* mediante la prueba de reducción del MTT.

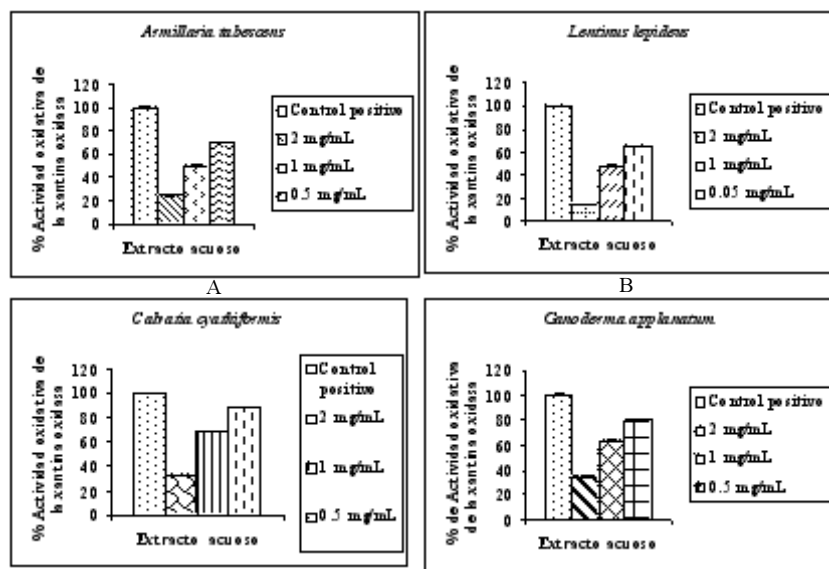


Fig. 2. Efecto de los extractos acuosos: A) *Lentinus lepideus*, B) *Armillaria tabescens*, C) *Calvatia cyathiformis* y D) *Ganoderma applanatum* sobre la actividad oxidativa de la xantina oxidasa, en células de hígado de Chang a diferentes dosis. Los datos representan el promedio \pm la desviación estándar de determinaciones por triplicado. * $p < 0.05$

to 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 cuáles pudieran haber estado presentes en los carpóforos recolectados.

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 establecer su posible selectividad; al respecto se estableció que ninguno de los extractos acuosos de las especies

evaluadas mostró ser citotóxico ya que los valores de CT_{50} obtenidos para todas las especies fueron altos. Estos resultados concuerdan con los de otros autores quienes han reportado 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 mediante la activación de diferentes respuestas del sistema inmune del hospedero.^{14,15} Además, es importante considerar que muchas de estas especies son comestibles y como prototipo de estos hongos está el

Lentinus edodes, el cual tiene actividad antitumoral y es ampliamente utilizado en la alimentación de países asiáticos.^{4,16}

La evaluación de la actividad antioxidante/prooxidante se realizó mediante la medición de la fluorescencia emitida por el metabolito de la DCFDA dentro de la célula.¹² 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 acuosos de las cuatro especies se observó que todos mostraron que tenían 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 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 potencial actividad bloqueadora de radicales libres.^{17,18}

Los resultados de este estudio coinciden con estos reportes, ya que las especies eva-

Tabla II. Efecto de extractos acuosos de macromicetos sobre la respuesta inmune.

Antígeno	CFPXMillón-
Solución salina 0.85% (control negativo)	0
Eritrocitos de carnero 10% (control positivo)	348 \pm 5.7
<i>Lentinus lepideus</i>	643 \pm 57.0*
<i>Armillaria tabescens</i>	362 \pm 9.2
<i>Calvatia cyathiformis</i>	339 \pm 37.0
<i>Ganoderma applanatum</i>	298 \pm 10.6

luadas además de no ser citotóxicas mostraron una actividad antioxidante. En cuanto al efecto inmunomodulador de los extractos acuosos, 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; al respecto se encontró que al administrar los extractos de manera conjunta con la inmunización, *Lentinus lepideus* estimuló la respuesta del sistema inmune, ya que se observó un aumento significativo en el número de células secretoras de anticuerpos IgM con respecto al grupo inmunizado con glóbulos rojos de carneiro (control positivo). En cuanto a este tema, varios autores han reportado que los polisacáridos presentes en extractos acuosos de macromicetos de Japón y China, como la Lentina de *Lentinus edodes*, Calvacina de *Calvatia gigantea* y Grifon de *Grifola frondosa*, ejercen sus efectos antitumorales mediante una estimulación de la respuesta del sistema inmune 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 asesinas naturales, células B y T.¹⁹⁻²³

Los resultados de la actividad antioxidante e inmunomoduladora de *Armillaria tabescens*, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* constituyen el primer reporte de actividad biológica para especies de macromicetos que crecen en México. Estos resultados indican que al igual que lo reportado para macromicetos de países orientales, las especies de macromicetos que crece en nuestro país también contienen compuestos activos, por lo que constituyen una fuente de productos naturales con potencial farmacológico. A la fecha se encuentran en evaluación 20 especies más y se trabaja en el fraccionamiento y caracterización de las sustancias activas presentes en las especies evaluadas.

Conclusiones

Los extractos acuosos obtenidos a partir de micelio de *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* no son citotóxicos y contienen sustancias con actividad

antioxidante. El extracto acuoso de *Lentinus lepideus* tiene, además, compuestos con potencial actividad inmunomoduladora.

Resumen

En este estudio se evaluó la citotoxicidad, el efecto inmunomodulador y antioxidante de extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Ganoderma applanatum*, *Armillaria tabescens* y *Calvatia cyathiformis*. El efecto inmunomodulador se evaluó en ratones BALB/c de acuerdo a la técnica de Cunningham. La citotoxicidad se evaluó en células de hígado de Chang y Hep G2. El efecto antioxidante se determinó mediante la prueba del DCFDA. Todos los extractos produjeron un efecto antioxidante y ninguno de ellos fue citotóxico. *Lentinus lepideus* produjo un incremento significativo de la respuesta inmune.

Palabras clave: Macromicetos, Actividad antitumoral, Actividad antioxidante, Efecto inmunomodulador.

Abstract

In this study the cytotoxicity, immunomodulating, and antioxidant activity of aqueous extracts of Mexican strains of *Lentinus lepideus*, *Ganoderma applanatum*, *Armillaria tabescens*, and *Calvatia cyathiformis* were evaluated. Immunomodulating activity was evaluated in BALB/c mice according to the Cunningham technique. Cytotoxicity was evaluated in Chang liver cells and HepG2 cells. The antioxidant effect was evaluated by the DCFDA probe. All the extracts produced an antioxidant effect and were not cytotoxic. *Lentinus lepideus* produced a significant increase of the immune response.

Keywords: Macromycetes, Antitumor activity, Antioxidant activity, Immunomodulating effect.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por parte de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de los proyectos Paicyt SA 678-02 y SA 968-04.

Referencias

- Hobbs C., Medicinal Mushroom: An Exploration of Tradition, Healing and Culture, Botanica Press, Santa Cruz, 1995.
- Breene W., Nutritional and Medicinal Value of Specially mushrooms, *J. Food Prod.*, 1990, 53:883-894.
- Chang R., Functional Properties of Edible Mushrooms, *Nutr. Rev.* 1996, 54(11 pt 2):S91-3.
- Kenneth J., Shiitake: The Healing Mushroom, Healing Arts Press, Vermont, 1995:13-18.
- Wasser S.P., Weis A.L.; Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective, *Crit. Rev. Immunol.* 1999, 19:65-96.
- Mizuno T., Fractionation and Characterization of Antitumor Polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*, *Agric. Biol. Chem.*, 1986, 50:1679-1688.
- Wasser SP. Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, Nov, 60(3):258-274.
- Shamtsyan M., Kunosova V., Maksimova Y., Goloshchev A., Panchenko A., Simbirtsev A. Petrishchev N., Denisova N., Immunomodulating and Anti-tumor Action of Extracts of Several Mushrooms, *J. Biotechnol.* 2004, Sep 30; 113 (1-3): 77-83.
- Danell E. and Fries N., Methods for Isolation of *Cantharellus* Species and the Synthesis of Ectomycorrhizae with *Picea abies*. *Mycotaxon*, 1990, 38:141-148.
- Mosmann T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65:225.
- Ekwall B. and Johanson A., Preliminary Studies on the Validity of *in vitro* Measurement of Drug Toxicity Using Hela Cells. I, Comparative *in vitro* Cytotoxicity of 27 drugs, *Toxicology Letters*, 1980, 5:199-210.
- Bass D.A, Parce J.W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C., Thomas M., Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils: A Graded Response to Membrane Stimulation, *J. Immunol*, 1983, 130:1910-1918.
- Cunningham A. J. and Szenberg A., Further Improvements in the Plaque Technique for Detecting Single Antibody-Forming Cells, *Immunology*, 1968, 14:599.
- Lucas E. H. et al., Tumor Inhibitors in *Boletus edulis* and Others Holobasidiomycetes, *Antibiot. Chemotherapy*, 1957, 7:1-4.
- Chihara G., Antitumor and Immunological Properties of Polysaccharides from Fungal Origin, *Mushr. Sci.*, 1978, IX (2):797-814.
- 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.
- Liu F., Ooi V. E. and Chang S. T., Free radical Scavenging Activities of Mushroom Polysaccharide Extracts., *Life Sci.*, 1997, 60 (10): 763-71.
- Racchi M., Daglia M., Lanni C., Papetti A., Govono S. and Gazzani G., Antiradical Activity of Water Soluble Components in Common Diet Vegetables., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (5) : 1272-7.
- Chihara G., et al., Antitumor and Metastasis-Inhibitory Activities of Lentinan as an Immunomodulator: An Overview, *Cancer Detect. Prev.*, 1987 (Suppl.), 1:423-443.
- Chihara G., Maeda Y. Y., Hamuro J., Sasaki T. and Fukuoka F., Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *Nature (Lond.)*, 1969, 222:687-688.
- Kidd P., The Use of Mushroom Glucans and Proteoglycans in Cancer Treatment., *Altern. Med. Rev.*, 2000, 5 (1): 4-27.
- Ooi V. E., Liu F., Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes, *Curr. Med. Chem.*, 2000, 7(7):715-29.
- Tani M. et al., In vitro Generation of Activated Natural Killer Cells and Cytotoxic Macrophages with Lentinan, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1992, 42: 623-628.

Recepción: 21 de febrero de 2005

Aceptación: 2 de noviembre de 2005