

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS**

**BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS  
HUMANOS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS  
DE *Ganoderma lucidum* CULTIVADO EN  
BAGAZO DE MAGUEY TEQUILERO**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**PRESENTA  
MA. CONCEPCIÓN LÓPEZ LOMELI**

**DIRECTOR: M.en C. EDUARDO VÁZQUEZ VALLS  
ASESOR: M.en C. CONRRADO SOTO VELAZCO  
ZAPOPAN, JALISCO, 1999.**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. MARIA CONCEPCION LOPEZ LOMELI  
PRESENTE.**

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "PROLIFERACION IN VITRO DE LINFOCITOS HUMANOS EN PRESENCIA DE EXTRACTOS DE *Ganoderma lucidum* CULTIVADO EN BAGAZO DE Maguey Tequilero", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al M.C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS y como asesor al M.C. CONRADO SOTO VELAZCO.

**ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"  
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JUNIO 15 DE 1999**

  
**DR. ARTURO OROZCO BAROCIO  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COMITÉ DE  
TITULACIÓN



  
**M. EN C. MARTHA GEORGINA OROZCO MEDINA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. M.C. EDUARDO VAZQUEZ VALLS.- Director del Trabajo.  
c.c.p. M.C. CONRADO SOTO VELAZCO.- Asesor del Trabajo.  
c.c.p. Expediente del alumno

AOB/MGOM/bacg\*

C. D. - C. ARTURO OROZCO BAROCIO.  
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN  
 DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
 P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:

**MA. CONCEPCIÓN LÓPEZ LOMELÍ** con el título :  
**PROLIFERACION *IN VITRO* DE LINFOCITOS HUMANOS EN PRESENCIA DE LOS EXTRACTOS DE**  
***Ganoderma lucidum* CULTIVADO EN BAGAZO DE MAGUEY TEQUILERO**, consideramos que ha quedado  
 concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión y en su caso  
 programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.


Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos  
 la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE.  
 LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO A 15 DE 1999.

EL DIRECTOR DE TESIS.

  
 M en C EDUARDO VÁZQUEZ VALLS.  
 NOMBRE Y FIRMA

EL ASESOR

  
 M en C CONRADO SOTO VELÁZCO  
 NOMBRE Y FIRMA.

SINODALES.

1.- C. D. C. ARTURO OROZCO BAROCIO.  
 NOMBRE COMPLETO

  
 FIRMA.

2.- D en C GALINA ZAITSEVA PETROVNA  
 NOMBRE COMPLETO

  
 FIRMA.

3.- BIOL. MARIA LUISA PITA LÓPEZ  
 NOMBRE COMPLETO

  
 FIRMA.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO DE INMUNODEFICIENCIAS Y  
RETROVIRUS HUMANOS DEL CENTRO DE  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE, IMSS.

TESISTA MA CONCEPCIÓN LÓPEZ LOMELÍ

DIRECTOR DE TESIS M en C EDUARDO VÁZQUEZ VALLS

ASESOR M en C CONRADO SOTO VELÁZCO

# AGRADECIMIENTOS

A ti mamá por estar a mi lado, quererme y apoyarme para que siga mi camino.

A Dora, Paty, Lily, Miriam, Marco y Lety por estar aquí y sobre todo por ser ellos.

Al Dr. Eduardo Vázquez Valls por brindarme la oportunidad de crecer y por la paciencia que me tuvo para hacer este trabajo.

A la Dra Blanca M. Torres y Katy por su amistad y ayuda.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Martha, Paco y Julio por la ayuda recibida.

A todas y cada una de las personas que dieron algo de si.

# INDICE

<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>41</b>

Los hongos han sido considerados a lo largo de la historia como dañinos para la mayoría de los organismos, sin embargo, su utilidad ha sobrepasado en mucho sus efectos patógenos. Tradicionalmente los hongos se utilizan para la producción de metabolitos, tales como el ácido cítrico y antibióticos como la penicilina, además de su gran importancia como fuente de nutrientes en la alimentación. Los efectos terapéuticos de los hongos han sido considerados en el pasado sin fundamento científico, aunque, existen evidencias que nuestros antecesores conservaban cultivos de hongos terapéuticamente activos, esos cultivos eran luego utilizados para tratar heridas infectadas por bacterias e incluso curaban infecciones superficiales(1).

Por ejemplo, el hongo *Penicillium* se utilizó para tratar infecciones por Lord Lyster a finales del siglo XIX; esta terapia con hongos tuvo éxito por los facultativos ingleses hasta el inicio de la era de los antibióticos. Sin embargo, no existe forma de conocer si estas preparaciones contenían penicilina o cualquiera otro antibiótico de los que actualmente se utilizan; tal vez su eficacia derivó de la presencia de metabolitos de origen fúngico con actividad antibacteriana, como la patulina, pero es demasiado tóxica para ser utilizada como medicamento (1).

Las preparaciones crudas de cepas productoras de penicilina de *P. notatum* se utilizaron ampliamente a principios de los años 40 para tratar heridas infectadas; en aquel momento, la penicilina ya había sido aislada pero no existía en cantidades suficientes y se administraba sin estar purificada (1).

Desde que la penicilina se introdujo como el primer antibiótico, se han utilizado otros metabolitos producidos por hongos, los cuales además son capaces de producir alcaloides o derivados de ergot que se indican para incrementar las contracciones del útero durante el parto, además de ser agentes antitumorales e inmunorreguladores; otro ejemplo es el caso de la ciclosporina que tiene un efecto inmunosupresor y actúa impidiendo tanto la inmunidad mediada por anticuerpos como la celular, su principal actividad parece ser sobre las células T, particularmente en los linfocitos T cooperadores. Este fármaco se usa con gran éxito en los trasplantes de médula ósea, hígado y páncreas (2).

Los metabolitos fúngicos, como la fumarilina de *Aspergillus fumigatus*, muestra actividad antitumoral inhibiendo el sarcoma-180, transplantado a ratones y, las trihidroxtetralonas producidas por *Penicillium diverticulum*, que son citotóxicas para el sarcoma de Yoshida. En 1969 investigadores japoneses notaron marcada actividad antitumoral de un compuesto polisacárido de *Lentinus edodes*, llamado lentinan, siendo este uno de los polisacáridos antitumorales más estudiados. Los



datos más recientes indican que alrededor de 220 sustancias antitumorales y 42 antivirales son producidos por hongos (1,2).

Una de las familias de hongos que por milenios se ha utilizado en la medicina tradicional de algunas regiones de oriente son los Poliporaceos. Estos históricamente fueron considerados en las culturas de las regiones del Amazonas y del norte de Euroasia con un poder curativo y con un sentido místico. En la edad media fueron prescritos como remedio para la tuberculosis y portadores de poderes sobrenaturales (2).

En la costa noreste del Pacífico de América se encontraron grabados indígenas, en los que se describe algunos hongos utilizados por chamanes para el tratamiento de inflamaciones. Una de las especies pertenecientes a esta familia es el hongo *Poliporus betulinus*, el cual se ha utilizado para tratar heridas y quemaduras, además de ser ingerido como té para remediar la fatiga. En países de América del Sur y México, los hongos generalmente se han utilizado por sus efectos alucinógenos como portadores de poderes maravillosos y como manjares de los dioses (2).

El hongo *Ganoderma lucidum* ha tenido una extensa mención en la medicina tradicional, debido a que se ha utilizado para la cura del cáncer, hipertensión, insomnio, bronquitis, enfermedades del corazón, síndrome de fatiga crónica e impotencia sexual, por esto ha sido llamado el "hongo de la Inmortalidad" (2).

En Japón es llamado Reishi o Mannentake; en China y Corea es llamado Ling-Zhi, donde se aprovecha como un agente estimulante, asociado con la realeza, recuperación, longevidad, poder sexual y felicidad. En el libro de Medicina Shen Nung Pen Tsao Ching (206 a C Dinastía Oriental Han), se describe a este hongo por sus propiedades medicinales y su utilización como tónico (2).

De la familia de los Poliporaceos, la cual pertenece a la clase de los Basidiomicetes, se desprende el género *Ganoderma* que fue propuesto taxonómicamente por Karsten en 1881, con solo una especie, *Ganoderma lucidum*; en 1889 la definición de este género fue amplificado por Patouillard, quién dividió el género *Ganoderma* en dos partes: *Ganoderma* y *Amauroderma*, que comprenden 48 especies. Donk en 1933, aumentó el grupo de subfamilias en la clasificación Ganodermatoideae y posteriormente en 1948, propuso la familia Ganodermataceae que subsecuentemente en 1964, reconoce dos géneros: *Ganoderma* y *Amauroderma*, en el primer género fue incluida la subfamilia Polyporoide.

Finalmente Julich 1981, propone el orden Ganodermatales, el cual incluye a dos

familias: Ganodermataceae (*Ganoderma*, *Amauroderma* y *Humphereya*) y Haddowiaceaceae (*Haddowia*) (3).

Los hongos pertenecientes al género *Ganoderma* tiene basidiocarpos estipitados, con himenóforo tubular, con esporas de color café, elipsoides, equinuladas y truncadas en un extremo cuando maduran. La superficie del esporóforo tienen a menudo una apariencia barnizada. La clasificación actual sitúa a la especie *Ganoderma lucidum* como miembro del Género de *Ganoderma*, familia Ganodermataceae, orden Aphyllophorales, clase Holobasidiomycetidae, Subclase Hymenomycetes, Subdivisión Basidiomycotina (3,4).

*Ganoderma lucidum* tiene las siguientes características:

Basidiocarpos anuales; estípites cilíndricos, que pueden crecer lateralmente con una longitud de 19 cm y de 2-4 cm de diámetro, con un terminado brillante como laca, blando o duro; esporas ovaladas que se dispersan por debajo, pilas uniformes, disidiamos o suborbicular de 12 x 20 x 2 mm; una superficie amarillenta oscuro o rojizo oscuro, del centro al margen el color gradualmente llega a ser claro; el carpóforo tiene trincheras concéntricas redondas y rayadas; su contexto blanco, cerca de 1 cm de espesor, túbulos claros o castaños de alrededor de 1 cm de longitud, su margen es agudo y embotado, mide de de 5-20 cm diámetro de la superficie (3,4,5).

*Ganoderma lucidum* es cosmopolita desde el Amazonas hasta regiones de Norteamérica y de Asia, frecuentemente se encuentran en regiones subtropicales. Son anuales, crecen en una amplia variedad de madera, típicamente viven en arboles muertos , aunque especialmente se encuentran en arboles de maple, roble, magnolias, sauce y del ciruelo oriental. Se establecen en el tronco, generalmente en la región cercana a la interface del suelo y ocasionalmente se encuentran en las raíces del árbol, ocurren de mayo a noviembre (3,4,5).

De *G. lucidum* se han obtenido diferentes extractos tanto del cuerpo fructífero como del micelio utilizando una variedad de métodos de extracción, para posteriormente resuspenderlos en solventes como agua, etanol y acetona para ser utilizados experimentalmente (6,7,8,9,10).

Se observó que los extractos inhiben la hipertensión arterial, reacciones de hemaglutinación y la trombosis, además de poseer una actividad fagocítica y antitumoral sobre el sarcoma 180 y de Erich (9, 10,11).

De los extractos se han obtenido sustancias con actividad biológica como: glucanos, proteínas, triterpenos, ácidos ganodéricos, ergosterol, uracil, polinucleótidos y ácido poliamino con actividad antialérgica e hipotensiva (12,13,14).

Los ácidos ganodéricos inhiben la liberación de histamina en células pluripotentes de rata *in vivo*, además de tener una actividad citostática *in vitro* contra el hepatoma de células tipificadoras homocigotas. Los glucanos tienen una actividad inhibitoria sobre el sarcoma 180 de ratón y los triterpenos inhiben la actividad de la enzima angiotensina convertasa (15,16,17,18).

De los extractos de *G. lucidum* se ha obtenido una proteína inmunomoduladora llamada Ling Zhi-8 (LZ-8), la cual es sintetizada en el micelio y esta compuesta por 110 aminoácidos, además se considera semejante a la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. En ensayos de hemaglutinación con sangre humana y de oveja, los sitios de unión por LZ-8 son selectivos en la superficie de los glóbulos rojos de oveja, pero el mecanismo exacto de hemaglutinación por LZ-8 aún se desconoce, además esta proteína posee una actividad mitogénica sobre esplenocitos de ratón y en leucocitos de sangre periférica de humano, por la estimulación para la producción de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 2 (IL-2); en adición a esta clase de proteínas inmunomoduladoras que pueden modificar la respuesta biológica *in vivo* e *in vitro*, también se ha sugerido la activación de linfocitos por LZ-8 por diferentes mecanismos, como la expresión de receptores y regulación de inmunoglobulinas, además que altera la anafilaxis en ratones, la acción de inmunosupresión de LZ-8, no opera por interferencia de la unión del antígeno al complejo inmunoglobulina-fragmento cristalizante (IgE-Fc) durante la subsecuente exposición (6,7).

Las evidencias de que LZ-8 suprime la producción de anticuerpos, se estudio por la reacción de Arthus, en la cual LZ-8 disminuye en los ratones la reacción positiva de 90 a 40 %, se sugiere que *in vivo* LZ-8 reduce la producción de anticuerpos pero esto no se sabe completamente (6,7,19).

Los mecanismos de acción de LZ-8 en la producción de anticuerpos estan mediados por dos tipos de receptores Fc: uno, en la superficie celular de los basófilos y células cebadas con una alta afinidad por IgE; otro, sobre la superficie celular de linfocitos T y B con una alta afinidad. La afinidad del receptor Fc con los linfocitos T es muy importante para la regulación selectiva de la producción de IgE por secreción de dos factores de unión de IgE: potenciación y la actividad supresora de la producción de IgE. El mecanismo para la prevención de anafilaxis en ratones CFW por LZ-8 está mediado por la regulación de las células T, de la IgE y por la producción de una alta glucosilación de IgE unida al factor de producción. El mecanismo preciso de LZ-8 en la prevención del sistema de anafilaxis, aún debe confirmarse (6,7).

Para el tratamiento de la diabetes autoinmune en ratón también se ha utilizado la LZ-8, sin embargo, el mecanismo preciso de esta proteína *in vivo* aún se desconoce, aunque se sugiere una probable activación de macrófagos probablemente por la producción *in vitro* de linfocinas (6,8,19,20,21).

Las proteínas inmunomoduladoras fúngicas o FIPS son mitogénicas *in vitro* para los linfocitos de sangre periférica de humano y para los esplenocitos de ratón, por el incremento de la producción de IL-2, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (19).

Se ha reportado que el *Ganoderma lucidum* en forma de extracto crudo, previene el efecto del aumento en el suero de las transaminasas glutámica oxaloacética (GOT) y glutámico pirúvica (GPT) en ratas expuestas a tetracloruro de carbono. Por otra parte, se sugiere que *Ganoderma lucidum* tiene una actividad antihepatotóxica, al disminuir los niveles de GOT y de GPT, muestra una actividad curativa y protectora sobre los hepatocitos, los extractos crudos contienen sustancias con efecto antioxidante, que son capaces de recoger radicales superóxido e hidróxilo (21).

### Cultivo de *Ganoderma lucidum*

La dificultad de recolectar y obtener las cantidades abundantes de este hongo, hicieron necesario la implementación de cultivarlo en medios artificiales. Para esto se hizo posible que se designaran lugares en donde la temperatura, humedad y ventilación fueran las adecuadas.

#### Método tradicional.

En Japón y en China el hongo se inocula en troncos que se ponen en el fondo de la tierra a poca profundidad, en un lugar sombreado simulando su localización natural; su fructificación se da alrededor de 6 meses a dos años y se cosechan de 4 a 5 años después del primer brote, este es el método natural (3).

#### Cultivo de ciclos rápidos.

Es una combinación de variables para lograr que el cuerpo fructífero se forme, al poner el inóculo en una mezcla de aserrín obtenido del bosque, incubado en bolsas de polietileno que conservan la humedad y permitiendo el intercambio de gases por medio de filtros. La concentración de dióxido de carbono en el ambiente controla la formación del cuerpo fructífero, llevándose a cabo la colonización en un tiempo aproximado de 14-21 días a 24°C, después de cuarenta días de la inoculación, aparece un cuerpo fructífero de color amarillo dorado y en forma triangular.(3)



Para su utilización en forma experimental la inoculación del hongo se hace en botellas de cultivo con un medio de caldo de dextrosa papa y de agar con agua, por 7 días de 28-30°C. En algunos casos más, se cultiva con extracto de maltosa, extracto de levaduras, sales y D-glucosa (6,7,8,9,10).

Debido a que *Ganoderma lucidum* tiene sustancias activas con propiedad mitogénica, se quiere probar si al ser cultivado en bagazo de maguey tequilero, los extractos acuosos, lixiviados y crudos de este, conservan el efecto proliferativo sobre los linfocitos humanos y si existen diferencias entre las distintas cepas a estudiar.

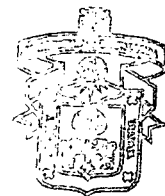
**OBJETIVO GENERAL.**

1. Evaluar el efecto de los extractos de *Ganoderma lucidum* cultivado en bagazo de maguey tequilero sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos humanos

**OBJETIVO PARTICULAR.**

1. Comparar la proliferación *in vitro* de linfocitos humanos con extractos obtenidos de cepas cultivadas en bagazo de maguey tequilero (cepas IBUG76 e IBUG77) o con aserrín de encino (cepa T).
2. Cuantificar la proliferación *in vitro* de linfocitos humanos en presencia de extractos acuosos, crudos y lixiviados de las cepas IBUG-76, IBUG77 y T, en las concentraciones de 100,150 y 200  $\mu$ l

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Los extractos acuosos, crudos y lixiviados de *Ganoderma lucidum* cultivado en bagazo de maguey tequilero (cepa IBUG76 e IBUG77) preservan la misma actividad mitogénica sobre linfocitos humanos que los extractos acuosos, crudos y lixiviados obtenidos del hongo cultivado en aserrín de encino (cepa T).

**CRITERIOS DE  
INCLUSIÓN Y  
EXCLUSIÓN.**

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS DONADORES.**

- Donación voluntaria de 30 ml de sangre periférica.
- Hombres ó mujeres de 18 a 45 años de edad
- Clínicamente sanos
- Sin ningún tipo de tratamiento médico en los dos últimos meses.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DEL EXPERIMENTO.**

- Muestra biológica insuficiente (sangre periférica)
- Cultivos contaminados durante la fase experimental

## OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Los extractos de *Ganoderma lucidum* se obtuvieron de dos cepas diferentes: la cepa IBUG-77 proviene de Estados Unidos, la cual que fue donada por el ingeniero Guillermo Márquez de la empresa Hongos la Montaña; la cepa IBUG-76 fué obtenida de material silvestre recolectado en el Estado de Jalisco. Todas se encuentran preservadas en el cepario de hongos del Departamento de Botánica y Zoología de la Universidad de Guadalajara. La inoculación de las cepas se llevo a cabo en un substrato de bagazo de maguey tequilero suplementado con cascarilla de algodón o cascara de cacahuete en una proporción de 3 a 1 con base al peso húmedo del bagazo, 450 gr del substrato fué hidratado hasta alcanzar 70 % de humedad y se depositó en bolsas de polipropileno, que posteriormente se esterilizaron a 121°C durante 45 minutos. Del mismo modo la cepa IBUG-77 se inoculó en aserrín de encino siguiendo el mismo procedimiento que con el bagazo. El material inoculado se selló herméticamente y se incubó a 24°C en completa obscuridad, posteriormente se llevaron a condiciones de fructificación con una humedad relativa de 75 al 80 % con una ventilación y luz controlada. Los carpóforos obtenidos de la cepa IBUG-77 cultivados en aserrín se consideraron como la cepa T.

La obtención de los extractos se realizó por tres métodos, en los cuales se utilizó 5 gr de carpóforo seco y molido de las 3 cepas en 100 ml del solvente; los extractos

acuosos (A) se obtuvieron a temperatura ambiente con agitaciones durante 60 minutos; los extractos lixiviados (L) se obtuvieron con agua a 80-85°C, tanto los extractos acuosos y lixiviados se concentraron a 1 gr de su volumen original con ayuda de un rotavapor. Los extractos crudos (C) se obtuvieron con un tratamiento de cloroformo-metanol 9:1 para resuspenderlos en etanol absoluto a 1/5 del volumen original. Posteriormente fueron filtrados para su esterilización; cada uno de los extractos se prepararon a una concentración inicial del 5%, de ellos se tomaron diferentes volúmenes para cada uno de los cultivos, obteniéndose así una mayor o menor concentración final en cada cultivo. Los extractos para este trabajo fueron donados por el M en C Conrado Soto Velázco y el Dr. Jaime Álvarez de la Cuadra del Departamento de Botánica y Zoología de la Universidad de Guadalajara.



## **DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Se obtuvo en tubos con heparina 30 ml de sangre periférica de 18 individuos masculinos y femeninos con edades de 18 a 45 años, de los cuales se formaron 3 grupos de 6 individuos cada uno.

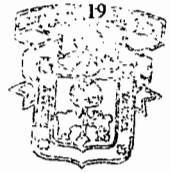
De las muestras obtenidas se obtuvieron linfocitos, por gradiente de densidad, que posteriormente se cultivaron a 37°C por 72 horas con una humedad relativa del 95% en ausencia (controles) o en presencia de los extractos acuosos, crudos o lixiviados en las concentraciones de 100, 150 y 20  $\mu$ l de cada cepa. Finalmente se hizo la cuantificación espectrofotométrica de la proliferación con MTT.

## **SEPARACIÓN CELULAR.**

Dentro de una campana de flujo laminar en tubos estériles de fondo plano se colocaron 5 ml de sangre y se les adicionaron 4ml de PBS (amortiguador de fosfatos), se homogeneizaron y posteriormente con una pipeta pasteur se les colocó sobre ficoll/hypaque en tubos cónicos de propileno; después se centrifugaron por 30 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente.

Se extrajeron los linfocitos y se colocaron en tubos de ensayo donde se le realizaron dos lavados con PBS por 10 minutos a 1500 rpm a una temperatura de 4°C.

El sobrenadante se desechó y al botón de células se le adicionó un mililitro de RPMI 1640, se homogeneizó y los tubos se colocaron en hielo; después se tomaron 100  $\mu$ l, los cuales fueron adicionados a un tubo de ensayo que contenía 900  $\mu$ l de PBS,



para contar la cantidad de células encontradas en un mililitro.

El conteo celular se llevó a cabo mediante la utilización de la cámara de Neubauer, donde se contaron los cuatro cuadrantes externos y se calculó la cantidad de células obtenidas por la siguiente fórmula: la cantidad de células contadas se dividieron entre cuatro, se multiplicaron por el factor de la cámara (10000) y por la dilución.

## **VIABILIDAD CELULAR**

La viabilidad de las células se midió con azul tripano, para ello se tomaron 10  $\mu$ l de los linfocitos obtenidos del mismo tubo de donde se hizo el conteo celular y se coloca en un portaobjetos, se les adicionó 10  $\mu$ l de azul tripano, se homogeneizaron y después de un minuto se les colocó el cubreobjetos. Posteriormente se observó al microscopio y se contaron cien células, de las cuales las teñidas de azul son las que están muertas y sirven para calcular el porcentaje de viabilidad. El porcentaje recomendado para la utilización de las células para cultivo es del 100% de viabilidad.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Obtención de 30 ml de sangre periférica de  
18 individuos sanos 18-45 años de edad.



Separación de linfocitos  
por gradiente de densidad.



Cultivos  
variables de los cultivos.



Cuantificación  
espectrofotométrica de la  
proliferación de linfocitos.

## SEPARACIÓN DE CÉLULAS

5 ml de sangre total con 4 ml de PBS  
sobre 3ml de Ficoll/hypaque.



Centrifugación a 1500 rpm 30 min. t° ambiente



Extracción de células



Lavado con RPMI, 1500 rpm 10 min. 4°C



1ml de RPMI y dejar en hielo



100  $\mu$  l se colocan en 900  $\mu$  l de RPMI



Conteo Celular  
en cámara de Neubauer



Estimación de la cantidad  
de células.



Viabilidad



Dilución 1:1 con azul  
tripano



Contar 100 células y  
sacar porcentaje.  
de viabilidad

## **CULTIVO CELULAR.**

En tubos cónicos de 15 ml se agregaron 5 ml de RPMI 1640 filtrado con filtros milipore (sigma No. de catálogo R-6504), pH de 7.2 y 500  $\mu$ l de suero fetal bovino (sigma No. de catálogo F-4135) con 200  $\mu$ l de fitohemaglutinina con una concentración final de 5  $\mu$ g por cultivo (GIBCO No. de catálogo 10576-015), dos millones de células y el extracto correspondiente.

Las células se cultivaron por 72 horas a 37°C con una humedad del 95% en una estufa marca VIP CO<sub>2</sub> INCUBATOR 417 Lab-line Instruments, Inc.

## **CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS.**

El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (No de catálogo SIGMA M2128), es una sal de tetrazolium que se desarrolló para la cuantificación colorimétrica de células vivas de mamíferos, por la unión del anillo de terazolium a la mitocondria activa y por lo tanto solo ocurre en aquellas que estan vivas (23,24)

Por cada mililitro de PBS se disuelve 5 mg de MTT, posteriormente se filtra. A cada tubo de cultivo después de su incubación, se le adicionaron 500  $\mu$ l de MTT y fueron incubados por 4 horas a 37°C, al término del período de incubación los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente por 10 minutos a 1500 rpm, se desechó el

sobrenadante y a cada tubo se le adicionó 1 ml de ácido isopropanol (0.040 N HCl), se agitó hasta homogeneizar y se leyó a 570 nm, en un espectrofotómetro marca Metrolab 330. Las lecturas se hicieron dentro de la primera hora después de haberle adicionado el ácido isopropanol.

# CULTIVO CELULAR

2 millones de linfocitos

5 ml de RPMI 1640

500  $\mu$ l de suero fetal bovino

200  $\mu$ l de fitohemaglutinina

## VARIABLES EN LOS CULTIVOS

GRUPO 1

n 6

EXTRACTOS

DE LA CEPA T

1.-RPMI

2.-SIN EXTRACTO

3.-AGUA 100,150 Y 200  $\mu$ l.

4.-ETANOL 100,150 Y 200  $\mu$ l.

5.-EXTRACTO ACUOSO 100,150 Y 200  $\mu$ l

6.-EXTRACTO CRUDO 100, 150 Y 200  $\mu$ l

7.-EXTRACTO LIXIVIADO 100,150 Y 200  $\mu$ l

8.-RPMI Y CÉLULAS

GRUPO 2

n 6

EXTRACTOS

DE LA CEPA IBUG76.

1.-RPMI

2.-SIN EXTRACTO

3.-AGUA 100,150 Y 200  $\mu$ l.

4.-ETANOL 100,150 Y 200  $\mu$ l.

5.-EXTRACTO ACUOSO 100,150 Y 200  $\mu$ l

6.-EXTRACTO CRUDO 100, 150 Y 200  $\mu$ l

7.-EXTRACTO LIXIVIADO 100,150 Y 200  $\mu$ l

8.-RPMI Y CÉLULAS

GRUPO 3

n 6

EXTRACTOS

DE LA CEPA IBUG77

1.-RPMI

2.-SIN EXTRACTO

3.-AGUA 100,150 Y 200  $\mu$ l.

4.-ETANOL 100,150 Y 200  $\mu$ l.

5.-EXTRACTO ACUOSO 100,150 Y 200  $\mu$ l

6.-EXTRACTO CRUDO 100, 150 Y 200  $\mu$ l

7.-EXTRACTO LIXIVIADO 100,150 Y 200  $\mu$ l

8.-RPMI Y CÉLULAS



37° C, 72 hrs, 95 % de humedad

# CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS

500  $\mu$ l de MTT



Incubar por 4 hrs a 37°C



Centrifugación a 1500 rpm por 10min  
a temperatura ambiente.



Agregar 1 ml de ácido isopropanol



leer en espectrofotómetro

a 570 nm.



## **ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL**

Todo el material utilizado en el laboratorio para esta tesis se esterilizó en autoclave de vapor, con excepción de los tubos cónicos que se esterilizaron en autoclave de gas. El RPMI y el MTT fueron esterilizados por filtros marca Millipore ( No. de catálogo HAWP 02500, tipo del filtro HA, tamaño del poro 0.45  $\mu$ m). La filtración y preparación de los cultivos se realizaron en una campana de flujo laminar vertical marca VECO.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis de los resultados se obtuvieron medidas descriptivas de tendencia central (Media) y de dispersión (error estándar, varianza y desviación estándar), así como porcentajes de proliferación. Para establecer la significancia estadística de los hallazgos se utilizaron las pruebas de ANOVA y T de Student, estableciéndose un intervalo de confianza de 95% de certeza con un 5% de error.

Para concentrar los datos se utilizó un ordenador pentium de 200 mhz y los programas estadísticos Microsoft Excel, Epistat y Slide Write.

Las figuras 1, 2 y 3 muestran que todos los grupos tienen una diferencia significativa por la prueba T de Student con los controles con y sin mitógeno. Los extractos acuosos de la cepa IBUG-76 tienen aparentemente un mayor efecto linfoproliferativo en concentraciones de 100 y 150  $\mu\text{l}$ , sin embargo, no son estadísticamente diferentes con la concentración de 200  $\mu\text{l}$  ni con los extractos acuosos de las cepas T e IBUG-77. Entre la cepa T y La cepa IBUG-77 tampoco existen diferencias significativas tanto entre las concentraciones como en los porcentajes de proliferación.

Las figuras 4, 5 y 6 muestran que los extractos crudos de la cepa IBUG-76 tienen la máxima proliferación en las concentraciones de 100, 150 y 200  $\mu\text{l}$ , además, estas son altamente significativas al compararse con los extractos de las cepas T e IBUG-77, principalmente en las concentraciones de 150 y 200  $\mu\text{l}$ . Por otra parte, la cepa IBUG-76 a concentraciones de 150 y 200  $\mu\text{l}$  muestra una diferencia significativa en relación a los controles, efecto no observado en estas mismas concentraciones con la cepa T, cuya proliferación es equiparable a la de los controles con etanol y fitohemaglutinina, es decir, sin mayor efecto linfoproliferativo.

En las figuras 7,8 y 9 se aprecia que no existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto lixiviado y el porcentaje de proliferación de las distintas cepas, aunque la cepa T a concentraciones de 100, 150 y 200  $\mu\text{l}$  duplicó su

porcentaje de proliferación en comparación con el obtenido con los extractos crudos.

En las figuras 10,11 y 12 se observa que los extractos acuosos y lixiviados de la cepa T muestran una diferencia estadísticamente significativa contra los controles  $p < 0.001$ , y que en cualquiera de sus concentraciones los extractos crudos tienen una proliferación menor. En el caso de los extractos acuosos y lixiviados a las concentraciones de 150 y 200  $\mu\text{l}$  estas son estadísticamente similares, tanto en su porcentaje de proliferación como altamente diferentes al compararse con los extractos crudos.

Las figuras 13,14 y 15 muestran que los controles y los cultivos con extractos de la cepa IBUG-76 tienen diferencias significativas. Además que en cualquiera de las concentraciones utilizadas y método de extracción no existen diferencias significativas entre ellos, aunque en la concentración de 100  $\mu\text{l}$ , el extracto lixiviado tiene una pequeña disminución en su porcentaje de proliferación.

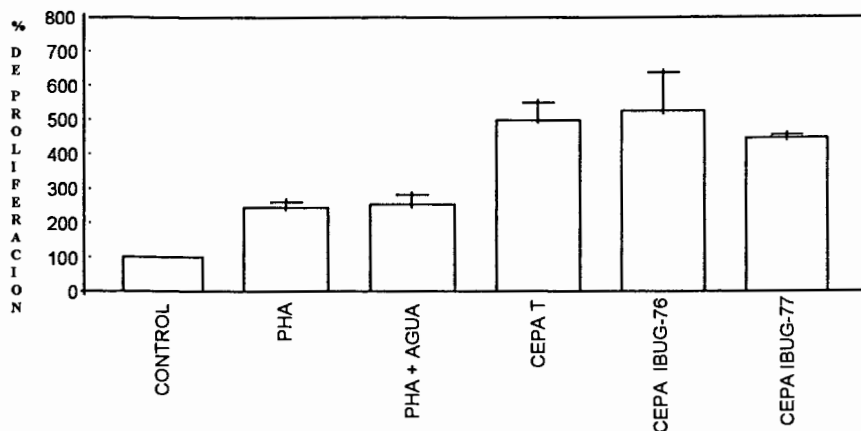
En las figuras 16,17 y 18 se observa que los controles en comparación con los cultivos que contienen extractos acuoso, crudo y lixiviado de la cepa IBUG-77 tienen diferencias significativas. Además, en todas sus concentraciones, el extracto crudo presenta una menor proliferación y, los extractos acuosos y lixiviados tienen

un efecto linfoproliferativo similar.

Las figuras 19,20 y 21 muestran en general los tipos de extracto y sus concentraciones, además de sus controles. En ellas se observa claramente que la cepa IBUG-76 fue la que tuvo los porcentajes de proliferación más altos y homogéneos en todas sus concentraciones.

FIGURA 1

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 100  $\mu$ l.



PHA vs T  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

PHA vs Cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

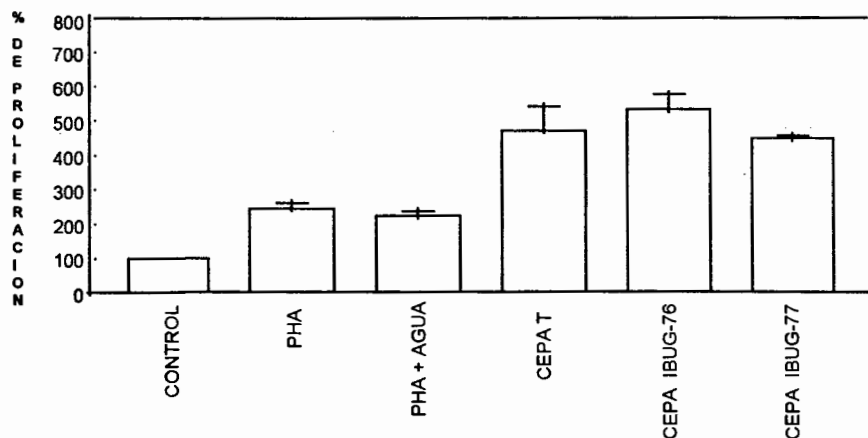
Agua vs Cepa T  $p \leq 0.005$

Agua vs Cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa IBUG-76  $p \leq 0.005$

FIGURA 2

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 150  $\mu$ l



PHA vs Cepa IBUG-76  $p \leq 0.001$

PHA vs Cepa T  $p \leq 0.005$

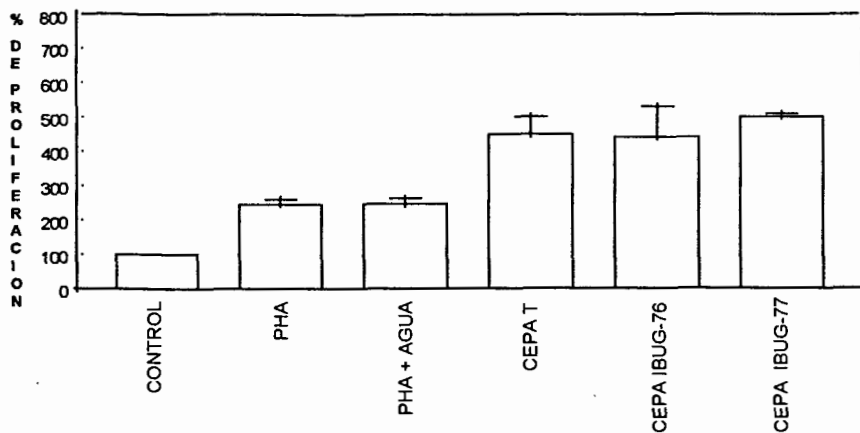
PHA vs Cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa T  $p \leq 0.05$

Agua vs Cepa IBUG-76  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

**FIGURA 3**  
**PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 200 $\mu$ l.**



PHA vs Cepa T  $p \leq 0.001$

PHA vs Cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa T  $p \leq 0.001$

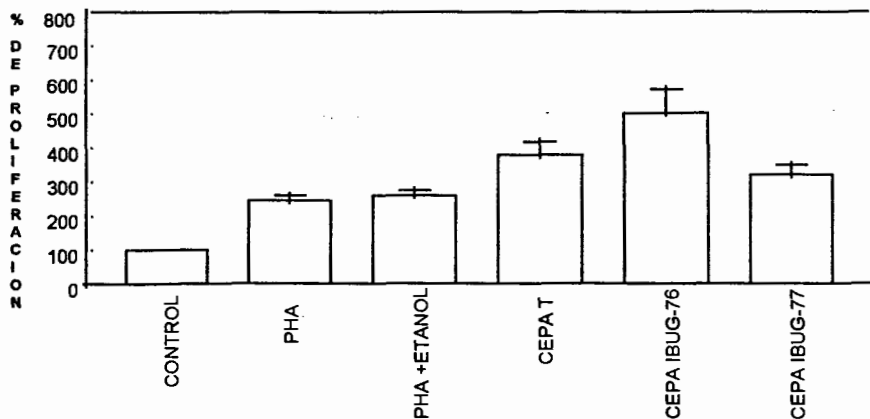
Aguavs cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

PHA vs Cepa  $p \leq 0.005$

PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

Agua vs Cepa IBUG-76  $p \leq 0.005$

**FIGURA 4**  
**PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 100  $\mu$ l.**



PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

PHA vs T  $p \leq 0.05$

PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.05$

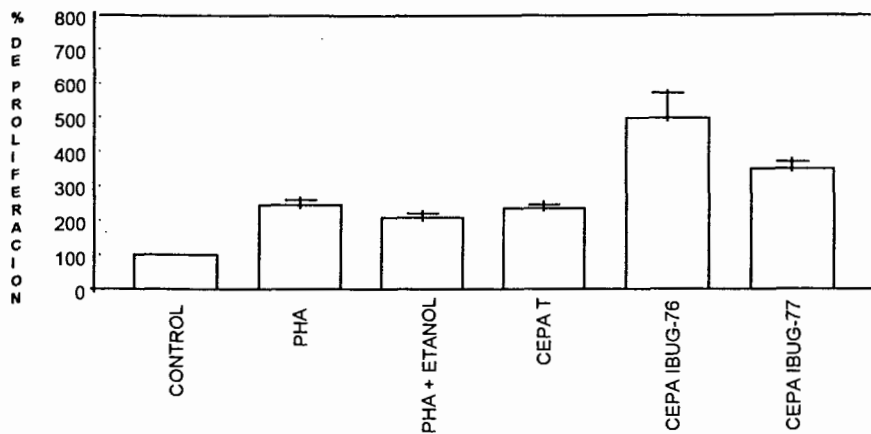
Etanol vs T  $p \leq 0.05$

Etanol vs IBUG-76  $p \leq 0.05$

T vs IBUG76  $p \leq 0.005$

FIGURA 5

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 150  $\mu$ l.



PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.001$

T vs IBUG-76  $p \leq 0.001$

T vs IBUG-77  $p \leq 0.001$ .

PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

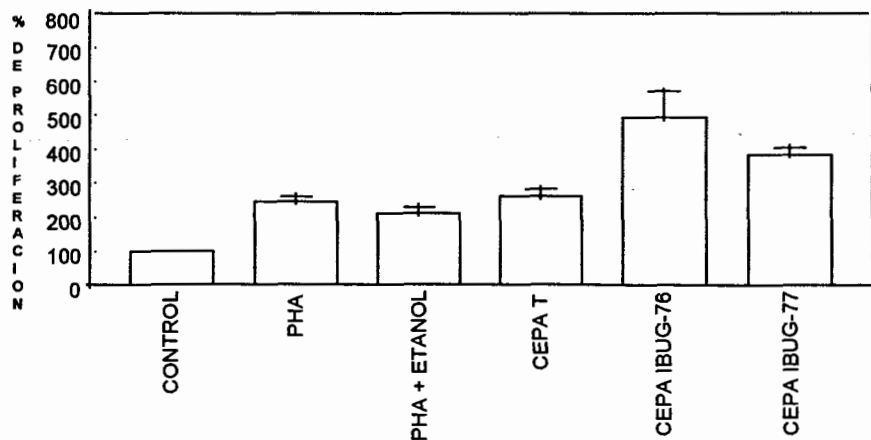
Etanol vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

IBUG-76 vs IBUG-77  $p \leq 0.005$ .

PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.05$

FIGURA 6

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 200  $\mu$ l.



Etanol vs IBUG-77  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.005$

Etanol vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

T vs IBUG-77  $p \leq 0.005$

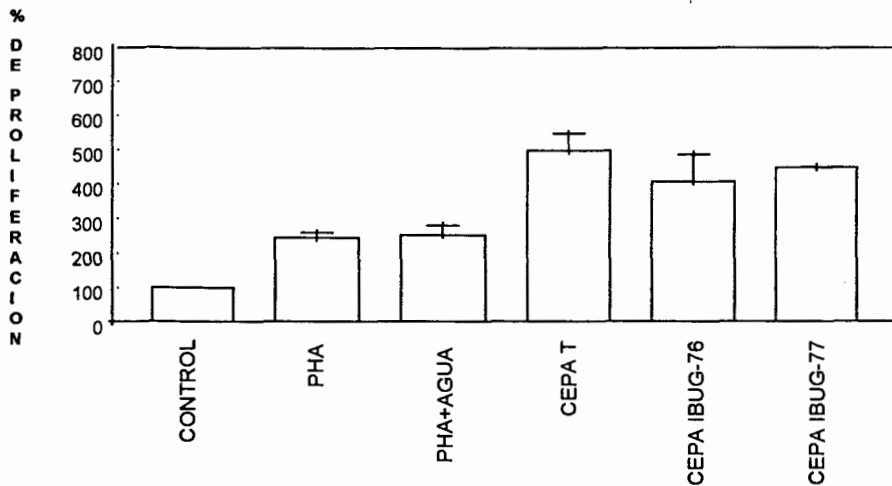
PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.05$

T vs IBUG-76  $p \leq 0.05$

IBUG76 vs IBUG77  $p \leq 0.01$

FIGURA 7

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS LIXIVIADOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 100  $\mu$ l.



PHA vs Cepa T  $p \leq 0.001$

PHA vs Cepa IBUG-76  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.001$

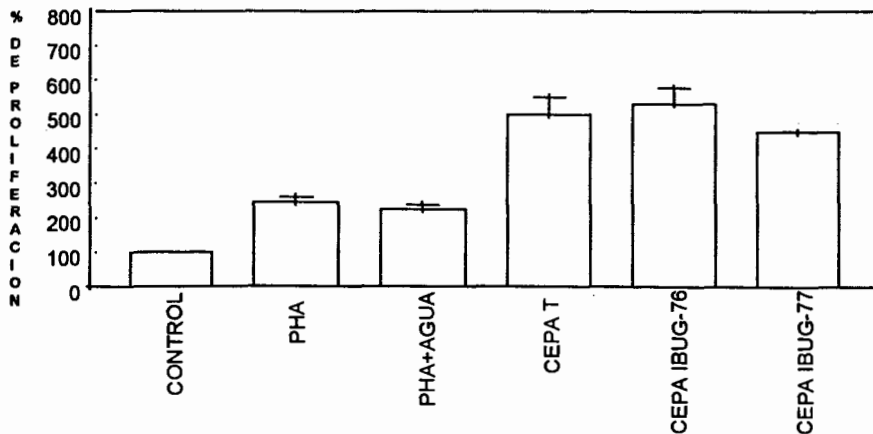
Agua vs Cepa IBUG-77  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa T  $p \leq 0.005$

Agua vs Cepa IBUG-76  $p \leq 0.005$

FIGURA 8

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS LIXIVIADOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 150  $\mu$ l.



PHA vs Cepa T  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa T  $p \leq 0.001$

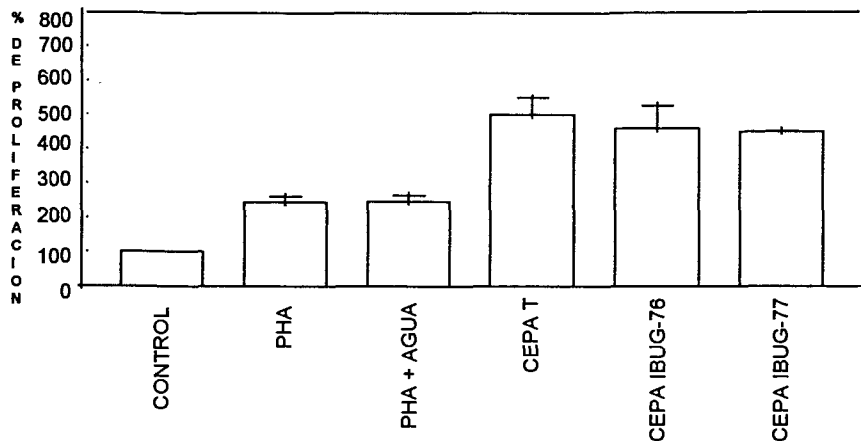
Agua vs IBUG-76  $p \leq 0.001$

Agua vs IBUG-77  $p \leq 0.001$



FIGURA 9

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS LIXIVIADOS DE LAS CEPAS T, IBUG-76 e IBUG-77 A UNA CONCENTRACION DE 200  $\mu$ l.



PHA vs Cepa T  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-76  $p \leq 0.001$

PHA vs IBUG-77  $p \leq 0.001$

Agua vs Cepa T  $p \leq 0.001$

Agua vs IBUG-76  $p \leq 0.001$

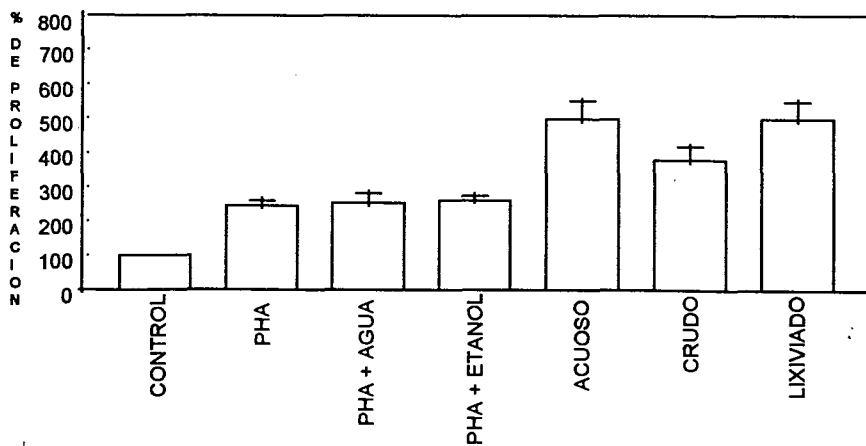
Agua vs IBUG-77  $p \leq 0.001$

PHAs vs IBUG-76  $p \leq 0.005$

Etanol vs IBUG-76  $p \leq 0.05$

FIGURA 10

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA T A UNA CONCENTRACION DE 100  $\mu$ l



PHA vs Acuoso  $p < 0.001$

PHA vs Crudo  $p < 0.005$

Agua vs Acuoso  $p < 0.005$

Agua vs Lixiviado  $p < 0.005$

Etanol vs Acuoso  $p < 0.005$

Etanol vs Lixiviado  $p < 0.005$

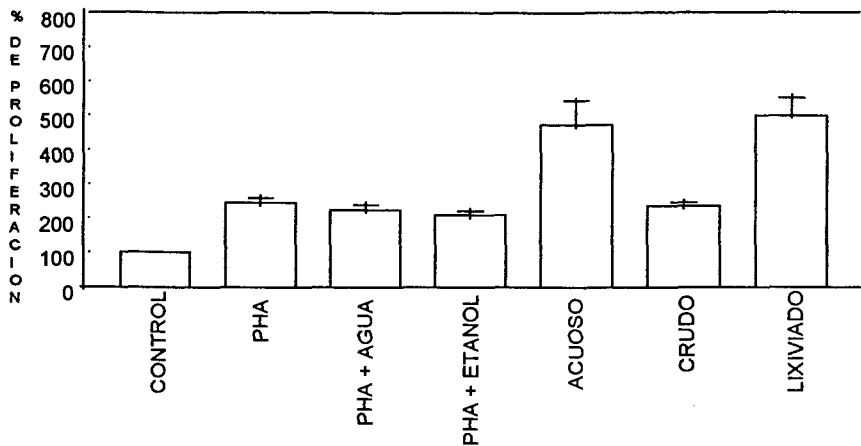
PHA vs Lixiviado  $p < 0.05$

Agua vs Crudo  $p < 0.05$

Etanol vs Crudo  $p < 0.05$

FIGURA 11

**PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA T A UNA CONCENTRACION DE 150  $\mu$ l.**



PHA vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Agua vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Etanol vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Crudo vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Acuoso vs crudo  $p \leq 0.01$

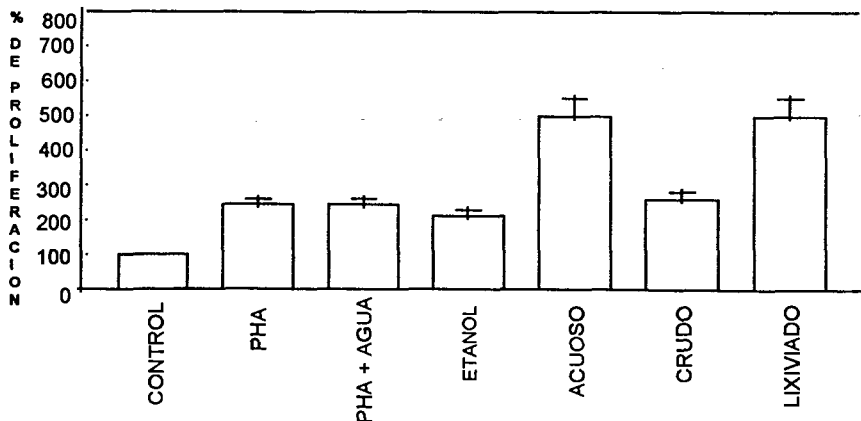
PHA vs Acuoso  $p \leq 0.005$

Etanol vs Acuoso  $p \leq 0.005$

Agua vs Acuoso  $p \leq 0.05$

FIGURA 12

**PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA T A UNA CONCENTRACION DE 200  $\mu$ l.**



PHA vs Acuoso  $p \leq 0.001$

PHA vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Agua vs Acuoso  $p \leq 0.001$

Agua vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Etanol vs Acuoso  $p \leq 0.001$

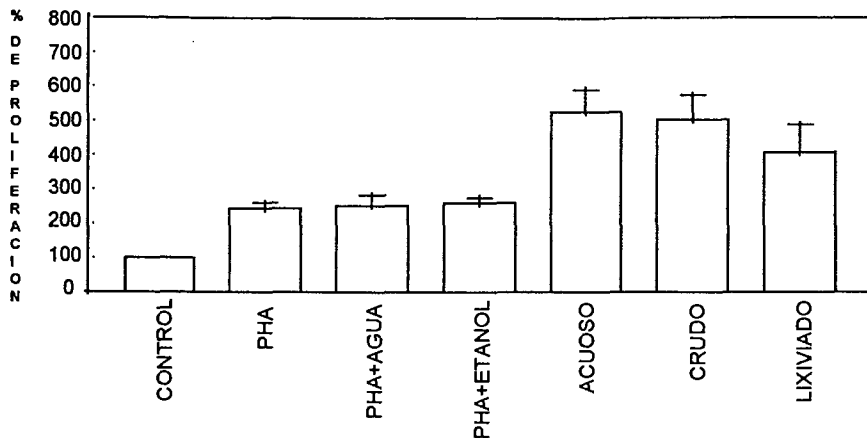
Etanol vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Acuoso vs Crudo  $p \leq 0.001$

Lixiviado vs Crudo  $p \leq 0.001$

FIGURA 13

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA IBUG-76 A UNA CONCENTRACION DE 100  $\mu$ l.



PHA vs Acuoso  $p < 0.001$

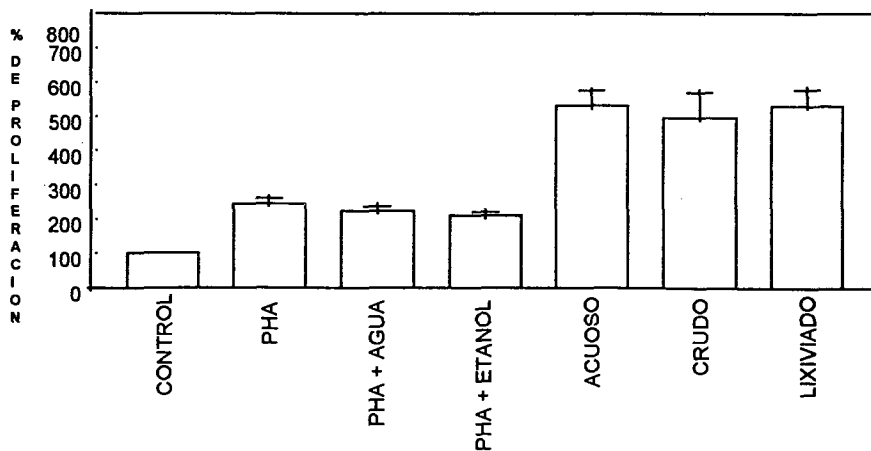
PHA vs Crudo  $p < 0.005$

Etanol vs Acuoso  $p < 0.005$

Etanol vs Crudo  $p < 0.05$

FIGURA 14

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA IBUG-76 A UNA CONCENTRACION DE 150  $\mu$ l.



PHA vs Acuoso  $p \leq 0.001$

PHA vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

Etanol vs Acuoso  $p \leq 0.001$

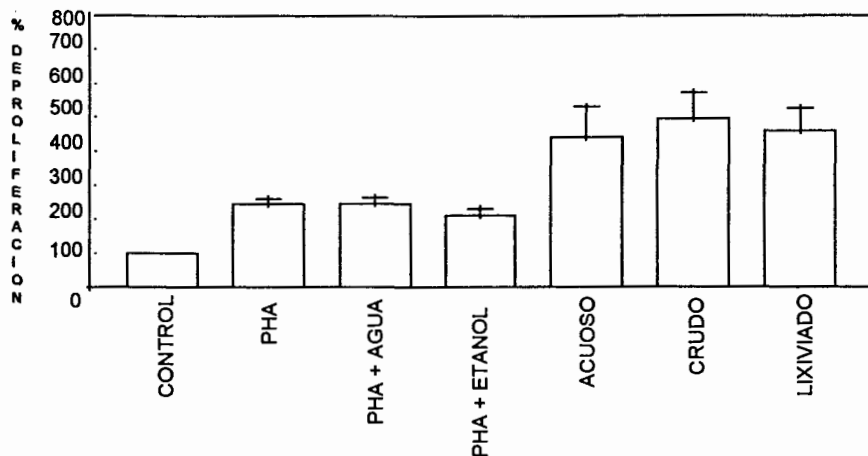
Etanol vs Lixiviado  $p \leq 0.001$

PHA vs Crudo  $p \leq 0.005$

Etanol vs Crudo  $p \leq 0.005$

FIGURA 15

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO IBUG-76 A UNA CONCENTRACION DE 200  $\mu$ l.



Etanol vs Crudo  $p < 0.005$

Etanol vs Lixiviado  $p < 0.005$

PHA vs Acuoso  $p < 0.05$

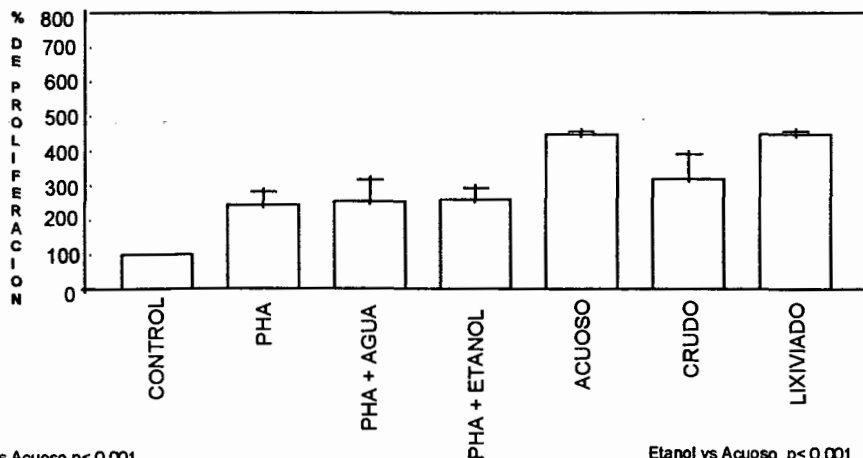
PHA vs Crudo  $p < 0.05$

Crudo vs Lixiviado  $p < 0.05$

Etanol vs Acuoso  $p < 0.05$

FIGURA 16

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA IBUG-77 A UNA CONCENTRACION 100  $\mu$ l.



PHA vs Acuoso  $p < 0.001$

PHA vs Lixiviado  $p < 0.001$

Agua vs Acuoso  $p < 0.001$

Acuoso vs Lixiviado  $p < 0.001$

Etanol vs Acuoso  $p < 0.001$

Acuoso vs Lixiviado  $p < 0.001$

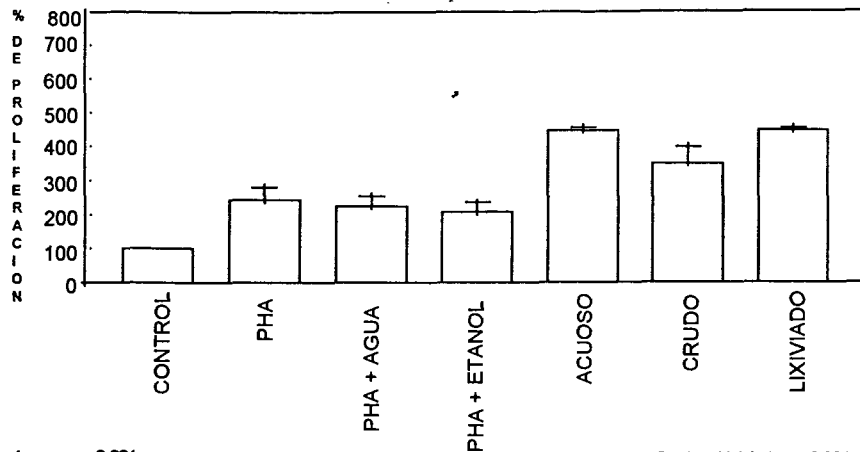
Acuoso vs Crudo  $p < 0.001$

Crudo vs Lixiviado  $p < 0.001$

PHA vs Crudo  $p < 0.005$

FIGURA 17

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO DE LA CEPA IBUG- 77. A UNA CONCENTRACION DE 150  $\mu$ l.



PHA vs Acuoso  $p < 0.001$

PHA vs Lixiviado  $p < 0.001$

Agua vs Acuoso  $p < 0.001$

Agua vs Lixiviado  $p < 0.001$

Etanol vs Acuoso  $p < 0.001$

Crudo y Lixiviado  $p < 0.001$

Acuoso vs Crudo  $p < 0.001$

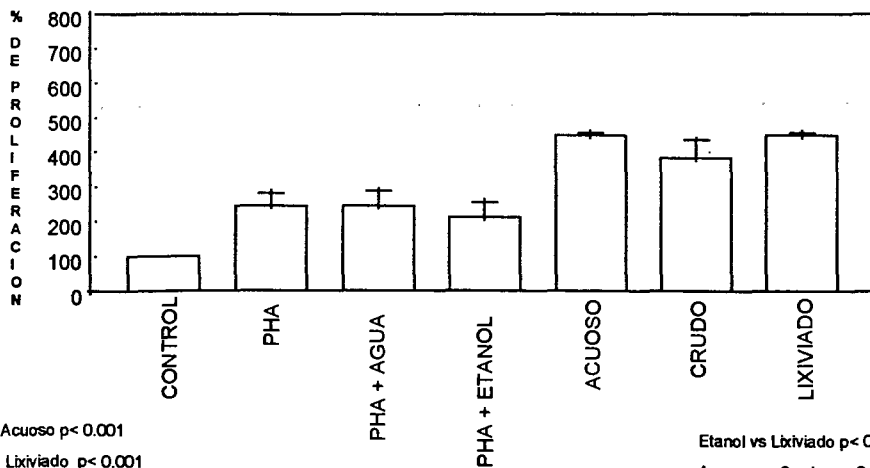
Crudo vs Lixiviado  $p < 0.001$

PHA vs Crudo  $p < 0.005$

Agua vs Crudo  $p < 0.005$

FIGURA 18

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTO ACUOSO, CRUDO Y LIXIVIADO CEPA IBUG-77. A UNA CONCENTRACION DE 200  $\mu$ l.



PHA vs Acuoso  $p < 0.001$

PHA vs Lixiviado  $p < 0.001$

Agua vs Acuoso  $p < 0.001$

Agua vs Lixiviado  $p < 0.001$

Etanol vs Acuoso  $p < 0.001$

Etanol vs Crudo  $p < 0.001$

Etanol vs Lixiviado  $p < 0.001$

Acuoso vs Crudo  $p < 0.001$

Crudo vs Lixiviado  $p < 0.001$

PHA vs Crudo  $p < 0.005$

Agua vs Crudo  $p < 0.005$

FIGURA 19

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS DE LA CEPA IBUC-76 CULTIVADA EN BAGAZO DE MAGUEY TEQUILERO.

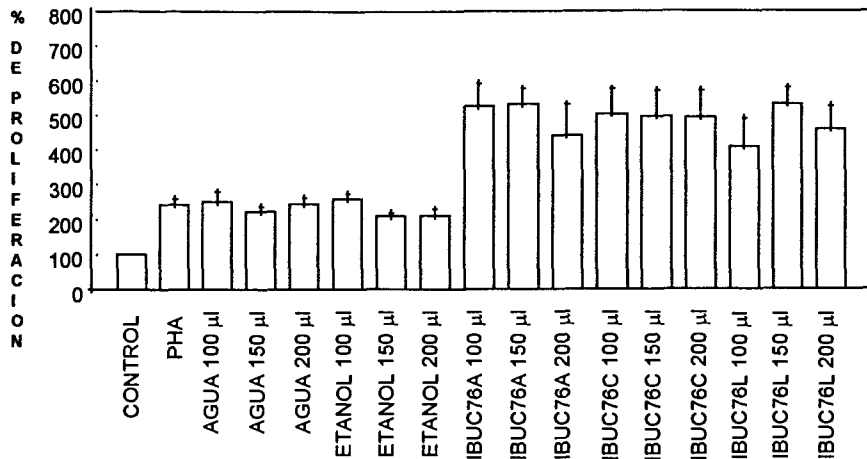


FIGURA 20

PROLIFERACION EN LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS DE LA CEPA IBUC-77 CULTIVADA EN BAGAZO DE MAGUEY TEQUILERO.

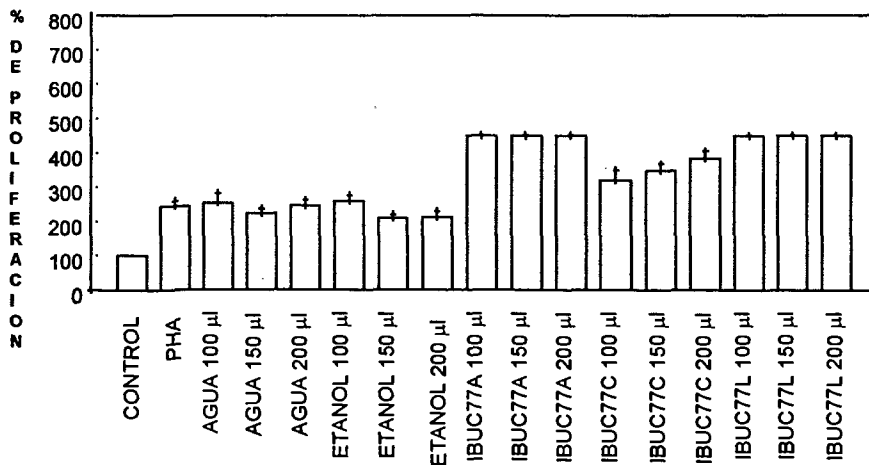
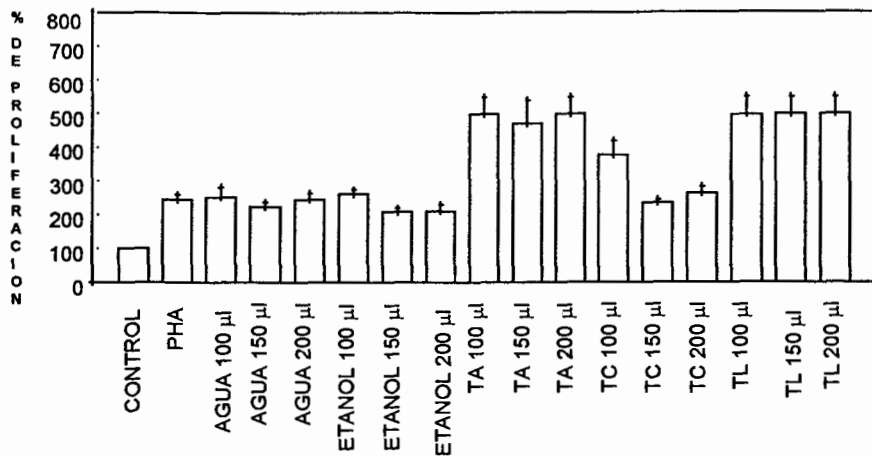
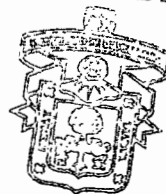


FIGURA 21

PROLIFERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS DE LA CEPA T, CULTIVADA EN ASERRÍN DE ENCINO.



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Los cultivos a los que se les agregó los diferentes extractos, mostraron un evidente incremento en el porcentaje de proliferación, debido a que se sabe que *Ganoderma lucidum* tiene sustancias activas como triterpenos, ergosterol, uracil, glucanos y proteínas, entre las cuales se ha aislado la proteína inmunomoduladora LZ-8, que tiene una secuencia de aminoácidos semejante a la cadena pesada de las inmunoglobulinas y que pudiera unirse inespecíficamente al receptor para el fragmento cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas G, localizado en la superficie de la membrana celular de los linfocitos T, mismo que al ser estimulado produce la liberación de mediadores químicos de la respuesta inmune como IL-2 , IFN $\gamma$  y TNF.(6,8,19,20,21).

En el caso de los extractos crudos de la cepa T que no presentaron un efecto linfoproliferativo, este fenómeno probablemente se debió a la forma en que se obtuvo el extracto y consecuentemente al tipo de diluyente, es decir, que los solventes como el cloroformo y metanol utilizados en la extracción de los principios activos y/o extractos, no fueron en este caso capaces de diluir las sustancias activas que contiene *Ganoderma lucidum*. Otra posibilidad es que pudo haberse ocasionado un cambio de pH en el medio de cultivo por el etanol que se utilizó en su extracción, ya que al adicionar el extracto a la mezcla de cultivo, este se tornó de color amarillo, indicando de esa manera su acidificación, misma que pudiese explicar que el efecto linfoproliferativo observado en los extractos crudos de las



cepas T e IBUG-77, en comparación con los controles y con los extractos acuosos y lixiviados de estas mismas cepas. Sin embargo, el que los extractos crudos de la cepa IBUG-76 tengan un efecto linfoproliferativo en todas sus concentraciones, descarta lo anterior, mas aún cuando sería de esperarse que a una concentración de 200  $\mu$ l, el cambio de pH fuese mayor y por lo tanto se hubiese disminuido o inhibido la proliferación, fenómeno que no sucedió. En conclusión el cambio de pH no juega un papel primordial para el efecto linfoproliferativo de los extractos crudos de las tres cepas de *Ganoderma lucidum*.

Por lo anterior, se puede suponer que las sustancias activas con actividad mitogénica sobre los linfocitos humanos como pudiese ser la proteína LZ-8, no son solubles en etanol o que la cepa T carece de estas. Otro aspecto que se consideró, es que este efecto probablemente se debe al substrato de aserrín de encino suplementado con cascarilla de algodón o de cacahuete utilizado para el cultivo de *Ganoderma lucidum* cepa T, comparado con las cepas IBUG-76 e IBUG-77 que fueron cultivadas en bagazo de maguey tequilero, sin embargo, no se encontró tal evidencia.

Finalmente, cabe mencionar que la cepa IBUG-76 fué la que obtuvo un mejor efecto linfoproliferativo en todos sus extractos, lo que se debió por tratarse de una cepa de origen silvestre, en contraste con la T que ha sido manipulada para su

comercialización y de la cepa IBUG-77 que se derivó de esta última, ya que se sabe que las cepas de hongos que continuamente son inoculadas en medio de cultivos artificiales, con el tiempo pierden algunas de sus propiedades de síntesis y patógenas, etc. (25,26).

1.-Se recomienda el uso del substrato de bagazo de maguey tequilero para el cultivo de *G. lucidum*, debido a que sus extractos tuvieron un efecto mitogénico similar o mayor que los extractos de cultivos en aserrín de encino; así como, un costo económico menor.

2.-Los extractos acuosos y lixiviados de las cepas IBUG76, IBUG77 y T de *Ganoderma lucidum* mostraron tener un efecto mitogénico mayor sobre linfocitos humanos *in vitro* comparados con los controles.

3.- Todos los extractos y concentraciones de la cepa IBUG-76 indujeron los mejores porcentajes de proliferación linfocítica en comparación con los extractos de las cepas IBUG-77 y T.

4.-El bagazo de maguey tequilero utilizado como substrato para el cultivo de *Ganoderma lucidum*, no modificó la propiedad mitogénica de los extractos de este hongo.

5.- El etanol, diluyente de los extractos crudos, no modifica la capacidad linfoproliferativa de los extractos de las cepas IBUG-76 y T.

6.- Para fines de estudio de la aplicación farmacológica de los extractos como

1. Wainwright M. Aplicaciones Medicas de los Hongos en Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA, S.A; 1992 p57.
2. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. En: Paul Stamets, editor. editorial Ten Speed Press P.O Box 7123, California, 1996.
3. Corner E.J. Ad Polyporaceas I Amauroderma and Ganoderma. En: J. Cramer, editor. Beihefte Zur Nova Hedwigia Heft 75. Vaduz: Inder A.R. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft; 1983. p.38
4. Ji-Ding Z The Ganodermataceae in China en J. Cramer, editor.in Biblioteca mycologica Band 132. Berlin. Der gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung; 1983. p.13
5. Ulloa M; Harlin R. Atlas de Micología Básica. Editorial CONCEPTO, S. A. p156.
6. Kino-K., Yamashita A., Yamaoka K., et. al. Isolation and characterization of new immunomodulatory protein Ling Zhi-8 (LZ-8) from *Ganoderma lucidum* J Biol Chem 1989; 264: 472.

7. Tanaka-S, Ko-K, Kino-K, Tsuchiya-K, et. al. Complete Amino Sequence of an Immunomodulatory Protein, Ling Zhi-8 (LZ-8). The J of Biol Chem 1989; 264:16372
8. Mizumoto-K, Sone-T, Yamaji-T, et. al. Immunomodulating protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) prevents insulinitis non-obese diabetic mice. Diabetologia 1990;33:713.
9. Murasugi-A, Tanaka-S, Komiyama-N, Iwata-N, Kino-K, Tsunoo-H. Molecular cloning of cDNA and gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a fungus, *Ganoderma lucidum*. The J of Biol Chem 1991; 266:2486.
10. Sone-Y, Okuda-R, Wada-N, Kishida-E, Masaki-A. Structures if antitumor activities of polysaccharides isolated from fruiting body ond growing culture of micelium of *Ganoderma lucidum*. Agric. Biol. Chem. 1985; 49:2541.
11. Hikino-H, Konno-C, Mirin-Y, Hayashi-T. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A y B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta-Med 1985; 4:339.
12. Nishitoba-T, Sato-H, Sakamura-S. New terpenoids, ganoderic acid J and ganolucidic acid-C struct. det, bitter, *Ganoderma lucidum*. Agric. Biol. Chem; 1985;49:3637.

13. Nishitoba-T, Sato-H, Kasai-T, Kawagishi-H, Sakumura-S. New bitter C27 and C30 terpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum*.(Reishi). Agric. Biol. Chem 1985; 49:1793.
14. Nishitoba-T, Sato-H, Sakumura-S. New terpenoids, ganolucidic acid-D, ganoderic acid L, lucidone C and lucidenic acid G, from fungus *Ganoderma lucidum*. Agric.Biol.Chem 1986; 50:809
15. Komoda-Y, Nakamura-H, Ishihara-S, Uchida-M, Kohda-H, Yamasaki-K. Structures of new terpenoid constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karst (Polyporaceae). Chem. Pharm. Bull 1985; 33:4829.
16. Kohda-H, tokumoto-W, Sakamoto-K, Fujii-M, Hirai-Y, Yamasaki-K. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (FR) KARST. histamine release-inhibitory triterpenes. Chem. Pharm. Bull. 1985; 33:1367.
17. Toth-J, Luu-B, Ourisson-G. The ganoderic acids T to Z: cytotoxic triterpenes of *Ganoderma lucidum* (polyporaceae). Tetrahedron-Lett. 1983; 24:1081.
18. Lin-C, Tome-W, Won-S. Novel cytotoxic principles of Formasan *Ganoderma lucidum*. J. Nat. Prod. 1991; 54:998.

19. Lin-W, Hung-H, Hsu-C, Lin-J. Dimerization of the N-terminal Amphipathic  $\alpha$ -Helix Dipeptide of The fungal Immunomodulatory Protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-sig) Defined by a Yeast Two-hybrid System and Site-directed Mutagenesis The J of Biol Chem. 1997; 272:20044.
20. Kawagishi-H, Mitsunaga-S, Yamawaki-M, et al. A Lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. Phytochem. 1996; 44: 7.
21. Lin-M, Lin-C, Chen-M, Ujie-T, Takada-A. Radical scavenger and antiepatotoxic activity of ganoderma formosanum, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo.japonium*. J Ethnopharm 1995; 47:33.
22. Hong-K, Fann-Y, Hsu-s, Kuo-K, Lin-C. Mediation of the Cytotoxicity of Lanostanoids and Steroids of *Ganoderma tsugae* through Apoptosis an cell cycle. J.Nat. Prod. 1998;61:485.
23. Mosmann. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival; Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods. 1983; 65:55.
24. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and Further Development of

a Precise and Rapid dye Method for Measuring Cell Growth Cell Kil. J. Immunol.

Methods 1989;119: 203.

25. Hogan H. Laura, Klein Bruce, Levitz Stuart. Virulence Factors of Medically

Important Fungi. Clin Microbiol. Rev. Oct, 1996; 9:469.

26. Kozel Thomas. Activation of the Complement System by Pathogenic Fungi.

Clin Microbiol. Rev. Jan, 1996; 9:34.