



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dra. Ángara Zambrano A.
INSTITUTO: Microbiología
FACULTAD: Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Eduardo Valenzuela F.
INSTITUTO: Microbiología
FACULTAD: Ciencias

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE POLISACÁRIDOS OBTENIDOS DESDE EL MICELIO DE *Agrocybe aegerita* Y *Hericiium erinaceum*, SOBRE CÉLULAS TUMORALES N2A Y JURKAT T

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Químico Farmacéutico

PATRICIO EUGENIO SALVO MIRANDA

VALDIVIA - CHILE

2008

**Esta Tesis fue realizada en el Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile, y fue financiado por el Fondo de Fomento al
Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyecto Fondef D05I10196) y el Fondo
Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto FONDECYT 11060180-2006)**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos:

A Dios por acompañarme en cada momento de mi vida y darme la fuerza necesaria para llevar a cabo esta meta.

A mi profesora patrocinante la Dra. Ángara Zambrano, por todo su tiempo, comprensión y apoyo durante la realización de este trabajo. Gracias por su profesionalismo, preocupación y por los buenos momentos compartidos.

A mi profesor co-patrocinante Dr. Eduardo Valenzuela, por el profesionalismo y apoyo incondicional durante el desarrollo de la presente tesis.

A mi profesor informante Juan Carlos Paredes por la valiosa ayuda prestada durante la realización de este trabajo.

A todo el cuerpo docente de la escuela de Química y Farmacia de la Universidad Austral de Chile, por entregarme las herramientas necesarias para poder desempeñarme como un profesional de la salud capacitado en todas las acciones relacionadas con el medicamento.

A mis padres, estaré eternamente agradecido de ellos por darme la oportunidad de cumplir mis sueños.

A mi hermano por ser mi gran amigo y por entregarme su cariño y apoyo durante el desarrollo de nuestra vida.

A mi abuelita Otilia por todo el cariño y apoyo que me ha entregado.

A mis compañeros tesisistas, por toda la comprensión y apoyo durante la elaboración del presente trabajo.

Finalmente, agradezco a la promoción de Química y Farmacia 2002, por todo su apoyo y cariño a lo largo de estos años; sin lugar a dudas fueron pilares fundamentales en la realización de este logro.

ÍNDICE GENERAL

		<u><i>Pág.</i></u>
	Índice General	I
	Índice de Figuras y Tablas	III
	Índice de Anexos	V
1	<u>RESÚMEN</u>	<u>1</u>
1	<u>SUMMARY</u>	<u>2</u>
2	<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>3</u>
3	<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>15</u>
	3.1. MATERIALES.....	15
	3.1.1. Material biológico.....	15
	3.1.2. Reactivos.....	16
	3.1.3. Equipos.....	16
	3.1.4. Otros.....	16
	3.2. MÉTODOS.....	17
	3.2.1. Cultivo de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i>	17
	3.2.2. Extracción de polisacáridos desde el micelio de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i>	17
	3.2.3. Cultivo de líneas celulares.....	18
	3.2.3.1. Procedimiento para células adherentes (N2A).....	18
	3.2.3.2. Procedimiento para células en suspensión (JURKAT T).....	19
	3.2.4. Ensayo de inhibición de la proliferación celular.....	19

3.2.4.1. Procedimiento para determinar la proliferación celular.....	20
3.2.5. Análisis estadístico.....	21
4 <u>RESULTADOS</u>	22
4.1. DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA CAPACIDAD DEL EXTRACTO POLISACÁRIDO DE <i>Agrocybe aegerita</i> Y <i>Hericiium erinaceum</i> DE INHIBIR LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS LÍNEAS TUMORALES JURKAT T Y N2A	22
4.1.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antiproliferativo presentado por el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T.....	22
4.1.2. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antiproliferativo de polisacáridos obtenidos desde el micelio de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a diferentes tiempos de incubación.....	27
4.1.3. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antiproliferativo presentado por el extracto polisacárido combinado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T.....	36
5 <u>DISCUSIÓN</u>	39
6 <u>CONCLUSIONES</u>	45
7 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	46
8 <u>ANEXOS</u>	62

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Efecto antiproliferativo a las 24 horas de incubación del extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A.....**24**
- Figura 2.** Efecto antiproliferativo a las 24 horas de incubación del extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T.....**25**
- Figura 3.** Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 24 horas de incubación.....**29**
- Figura 4.** Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 48 horas de incubación.....**30**
- Figura 5.** Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 72 horas de incubación.....**31**
- Figura 6.** Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T a 24 horas de incubación.....**32**
- Figura 7.** Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T a 48 horas de incubación.....**33**
- Figura 8.** Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T a 72 horas de incubación.....**34**

Figura 9. Efecto antiproliferativo a las 24 horas de incubación del extracto polisacárido combinado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> sobre las líneas tumorales N2A y JURKAT T.....	37
Tabla 1. Descripción de las líneas celulares tumorales utilizadas.....	15
Tabla 2. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido filtrado y no filtrado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> que inhiben la proliferación celular de N2A en un 50% (dosis IC ₅₀ *) a 24 horas de incubación.....	26
Tabla 3. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido filtrado y no filtrado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> que inhiben el crecimiento celular de JURKAT T en un 50% (dosis IC ₅₀ *) a 24 horas de incubación.....	27
Tabla 4. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> que inhiben la proliferación celular de N2A en un 50% (dosis IC ₅₀ *) a 24, 48 y 72 horas de incubación.....	35
Tabla 5. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> que inhiben la proliferación celular de JURKAT T en un 50% (dosis IC ₅₀ *) a 24, 48 y 72 horas de incubación.....	36
Tabla 6. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido combinado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> que inhiben la proliferación celular de N2A y JURKAT T en un 50% (dosis IC ₅₀ *) a 24 horas de incubación.....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: FIGURAS.....	62
Figura 1. Localización cromosómica de los diferentes proto-oncogenes y genes supresores de tumores mapeados hasta la fecha.....	62
Figura 2. Diferencias morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis.....	63
Figura 3. Vías de inducción de apoptosis.....	64
Figura 4. Fases del ciclo celular y activación secuencial de los diferentes complejos CDK/ciclina a lo largo de la progresión del ciclo celular.....	65
Figura 5. Hongos utilizados en el presente trabajo.....	65
ANEXO 2: TABLAS.....	66
Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de <i>Agrocybe aegerita</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24 horas de incubación.....	66
Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de <i>Hericiium erinaceum</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24 horas de incubación.....	67

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido de <i>Agrocybe aegerita</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24, 48 y 72 horas de incubación.....	68
Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido de <i>Hericiium erinaceum</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24, 48 y 72 horas de incubación.....	69
Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido combinado de <i>Agrocybe aegerita</i> y <i>Hericiium erinaceum</i> , sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24 horas de incubación.....	70
Tabla 6. Polisacáridos con actividad antitumoral aislados de Basidiomycetes.....	71
Tabla 7. Polisacáridos utilizados en el tratamiento clínico del cáncer en Japón.....	73
Tabla 8. Categorías de genes celulares involucrados en el ciclo celular y desarrollo del cáncer.....	73
ANEXO 3: PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL TRATAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.....	74
Congelación y descongelación de células.....	74
Lavado de células.....	76

1. RESUMEN

Las especies *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* pertenecen a la División Basidiomycota. Los hongos de esta División han despertado gran interés en las últimas décadas debido a la presencia de polisacáridos, metabolitos con un amplio espectro de actividades biológicas, dentro de las cuales destaca la actividad antitumoral presentada sobre una gran variedad de cánceres humanos, demostrando especificidad y selectividad sobre las células tumorales. Con el objetivo de poder desarrollar nuevas terapias contra esta enfermedad, en este trabajo se evaluó *in vitro* el efecto antiproliferativo de polisacáridos aislados desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, sobre dos líneas celulares tumorales, una derivada de un neuroblastoma de ratón (N2A) y la otra proveniente de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana (JURKAT T). Para el ensayo de inhibición de la proliferación celular se sembraron microplacas de 96 pocillos de fondo plano, con 3×10^3 - 5×10^5 células/pocillo en 90 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y con concentraciones crecientes de polisacáridos que oscilan desde 0 (control: células cultivadas en ausencia de extracto polisacárido) hasta 2500 μ g/mL, durante 24, 48 y 72 h de incubación. La proliferación celular se determinó empleando el método *in vitro* MTT, un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Los resultados obtenidos han demostrado que la cuantificación de la proliferación celular de JURKAT T y N2A se mantiene con valores superiores al 80% a bajas concentraciones de extracto polisacárido, sin embargo, a altas concentraciones de extracto se observa una disminución significativa de las células JURKAT T y N2A hasta de un 50% con el extracto polisacárido de *A. aegerita* y de un 80% con el extracto polisacárido de *H. erinaceum* a las 24 h de cultivo. A las 48 y 72 h de incubación, se determinó una mayor disminución de las células JURKAT T y N2A, particularmente a altas concentraciones de extracto polisacárido (≥ 1000 μ g/mL). En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores y respaldan la realización de estudios adicionales para dilucidar el mecanismo de acción que presentan estos metabolitos sobre las células tumorales.

1. SUMMARY

The *Agrocybe aegerita* and *Hericium erinaceum* species belong to the Basidiomycota. The fungus of this Division have aroused a certain interest in the last few decades due to the presence of polysaccharides, metabolites with a wide spectrum of biological activities, among which the antitumor activity becomes more apparent on a great variety of human cancers demonstrating specificity and selectivity with regards to tumor cells. With the objective of developing new therapies against this illness, in this work, the antiproliferative effect of isolated polysaccharides from the mycelium of *A. aegerita* and *H. erinaceum* was evaluated in vitro, using two types of tumor cells, one derived from a mouse neuroblastoma (N2A), the other originating from a human acute T-lymphoblastic leukemia (JURKAT T). For the test of inhibition of cellular proliferation, microplates, small cups were seeded with from 3×10^3 - 5×10^5 cells/cup in 90 μ L of medium DMEM supplemented with 10% of SFB and with increasing concentrations of polysaccharides that varied from 0 (control: cells cultivated in absence of polysaccharides extract) up to 2500 μ g/mL, over incubation period of 24, 48, 72 hours. The cellular proliferation was determined using the in vitro method MTT, a colorimetric test that measures the metabolic activity of the cells during the active proliferation stage. The results obtained have demonstrated that the rate of cellular proliferation of JURKAT T and N2A is maintained at levels above 80% with lower concentrations of polysaccharides extract, nonetheless at higher concentrations of extract a significant diminishment of the JURKAT T and N2A cells was observed 50% with polysaccharide extract of *A. aegerita* and of 80% with polysaccharide extract of *H. erinaceum* after 24 hours of cultivation. At 48 and 72 hours of incubation, a greater diminishment of JURKAT T and N2A cells was determined, particularly at higher concentrations of polysaccharide extract (≥ 1000 μ g/mL). In conclusion, the results obtained in this work are encouraging and support the continuation of further studies in order to elucidate the effect that the metabolites have on tumor cells.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cáncer: generalidades

El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células, que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando la muerte del organismo. Esta enfermedad es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células y la posterior adquisición de la capacidad invasiva que les permite escapar de su tejido de origen, colonizando y proliferando en otros tejidos u órganos (Jiménez, 2006; Mansilla, 2005).

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados y debido al aumento paralelo de la incidencia de esta patología con respecto al aumento de la esperanza de vida en la población, existe un gran interés médico y social por esta enfermedad (Mansilla, 2005). La mayoría de los cánceres son el resultado de mutaciones en el DNA de una célula somática inicial, que son heredadas por su descendencia clonal. Aquellas células progenie que adquieren nuevas alteraciones genéticas que les confieren ventajas proliferativas son seleccionadas, provocando que este grupo de células escape del control del crecimiento celular normal y dañe otras células sanas, impidiendo el correcto funcionamiento del organismo (Chabner & Longo, 2001).

En los últimos años se han identificado, caracterizado y mapeado muchos de los elementos genéticos involucrados en el desarrollo de las diversas formas del cáncer (Collins et al., 1997) (Ver anexo 1; Figura 1). En primer lugar se identificaron los oncogenes (versiones genéticamente alteradas de los proto-oncogenes), elementos genéticos que activan la proliferación celular e inhiben la apoptosis (Perales, 2005). Los genes supresores de tumores constituyen el segundo grupo de genes asociados al cáncer. A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores regulan negativamente la proliferación celular e inducen apoptosis, y en las células cancerosas se encuentran versiones mutadas que conllevan a la pérdida de su función (Collins et al., 1997). Se ha identificado un tercer tipo de genes relacionados con el desarrollo de tumores, estos son los denominados genes mutadores. Estos genes, que se encargan

de reparar errores en el DNA, no regulan directamente el ciclo celular sino que mantienen la integridad y fidelidad del genoma. Cuando se inactivan, las células adquieren potencial mutagénico, ya que se pueden activar oncogenes y/o inactivar genes supresores de tumores (Chabner & Longo, 2001).

El desarrollo de un tumor es el resultado de varias mutaciones que confieren a la célula una ventaja proliferativa. En general el fenotipo neoplásico resulta de una combinación de alteraciones genéticas que incluye la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Collins et al., 1997). Los procesos de división celular, diferenciación y muerte celular son básicamente similares en células normales y en células tumorales. La única diferencia es que las células cancerosas presentan aberraciones en los mecanismos de control de estos eventos. En las células tumorales se presentan cuatro tipos de funciones celulares básicas alteradas. En primer lugar, los puntos de control de la proliferación celular son defectivos, generando células con genomas inestables que evolucionan a células cancerosas (Jiménez, 2006). En segundo lugar, el programa de diferenciación celular puede estar alterado. Por otro lado, la integridad cromosómica y genética suele ser inestable, pudiendo generar un incremento de la capacidad metastásica. Finalmente, el programa de muerte celular programada o apoptosis puede estar desregulado (Chabner & Longo, 2001). La pérdida de la capacidad para que las células mueran por apoptosis contribuye a la inestabilidad genómica y a la tumorigénesis y, en consecuencia, a la pérdida del mecanismo de eliminación de las células con daño génico (Lowe et al., 1993).

- Muerte celular

La muerte celular puede producirse a través de dos mecanismos: necrosis y apoptosis. La necrosis es un tipo de muerte celular pasiva, que no requiere de la participación activa de la célula y puede afectar a una zona más o menos amplia de tejido. Se caracteriza principalmente por la ruptura osmótica de la célula, debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, que permite la entrada masiva de Ca^{2+} y consecuentemente la entrada pasiva de agua, acompañada de un flujo anormal de iones. También se distingue por la respuesta inflamatoria que se desencadena como

consecuencia de esta citolisis. Los estímulos que la originan son hipoxia, isquemia, infecciones virales o bacterianas y la exposición a determinados agentes corrosivos, entre otros (Bree et al., 2002; Montaner, 2000).

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico por el cuál las células mueren de forma controlada en respuesta a diversos estímulos (Jiménez, 2006; Torrá, 2006). Es un proceso regulado a nivel genético y esencial en el desarrollo de un organismo, ya que esta relacionado con el control de la homeostasis y envejecimiento celular; se trata también de un mecanismo de defensa por el cual son eliminadas del organismo aquellas células infectadas, mutadas o dañadas, en respuesta a diferentes agentes externos como por ejemplo: las radiaciones ionizantes o agentes quimioterapéuticos (Kerr et al., 1994; Thompson, 1995; Vaux & Korsmeyer, 1999).

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, fragmentación y condensación de la cromatina, fragmentación del DNA intranucleosomal y la formación de cuerpos apoptóticos como resultado de la desintegración celular (Elliott et al., 1999; Montaner, 2000; Torrá, 2006). Cabe señalar que la apoptosis, al contrario de la necrosis, no produce respuesta inflamatoria, haciéndola por tanto más difícil de detectar desde el punto de vista histológico (Díaz & Wolfe, 1995) (Ver anexo 1; Figura 2).

Existen dos vías principales de inducción de apoptosis, una vía extrínseca o vía de los receptores de muerte celular (TNF, Fas, TRAIL) y una vía intrínseca o mitocondrial. Las dos vías comparten la cascada de las caspasas, que son la vía efectora de la apoptosis, donde ambas vías convergen a nivel de la activación de la caspasa-3, la cual marca el punto sin retorno de la cascada, la que finaliza con la fragmentación de la cromatina y la muerte celular (Cousin et al., 2000) (Ver anexo 1; Figura 3).

- Control de la proliferación celular

Una célula tumoral lo primero que presenta es una alteración del ciclo celular. El ciclo celular es un proceso de gran importancia para la célula ya que tiene como función la formación completa de una nueva célula evitando en lo posible la creación de células con múltiples errores, lo cual le permite al organismo permanecer en un constante

equilibrio (Jiménez, 2006). El ciclo celular se divide en dos fases funcionales, S y M, y dos fases preparatorias, G1 y G2. El material genético de la célula se duplica durante la fase S. Una vez duplicado el DNA, los cromosomas se segregan de manera equitativa a cada uno de los núcleos de las células hijas durante la fase M o mitosis. Las fases preparatorias G1 y G2 se consideran puntos de control para asegurar que los procesos de síntesis de DNA y segregación cromosómica tengan lugar correctamente. Las células pueden dejar de dividirse y entrar en fase G0 o quiescencia (Collins et al., 1997; Coqueret, 2002).

Existen dos niveles de control del ciclo celular: uno extrínseco y otro intrínseco. Las vías de regulación extrínsecas actúan en respuesta a las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula, mientras que las vías intrínsecas son responsables de la progresión ordenada de los eventos del ciclo celular (Mansilla, 2005).

La maquinaria básica que coordina la progresión del ciclo celular está constituida por una familia de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclinas o CDKs ya que, para ser activas necesitan de la asociación a un segundo tipo de proteína, las ciclinas, que se expresan a lo largo del ciclo celular de forma transitoria y en el momento preciso. El holoenzima completo está constituido por una subunidad catalítica, la quinasa, y una subunidad reguladora específica, la ciclina (Collins et al., 1997; Coqueret, 2002). Se han identificado diferentes complejos ciclina/CDK y la activación de estos complejos de manera secuencial controla la progresión ordenada del ciclo celular (Smits & Medema, 2001) (Ver anexo 1; Figura 4).

La transición ordenada a través de las diferentes fases del ciclo celular está regulada por los puntos de control ("*checkpoints*"), que se encargan de asegurar el éxito de la división celular. El punto de control de G1 evita la entrada de las células en la fase S cuando las condiciones ambientales o el tamaño celular no son adecuados, o cuando la célula tiene el DNA dañado. El punto de control de G2 asegura que la replicación durante la fase S ha sido correcta y que las condiciones ambientales son apropiadas para que la célula pueda iniciar la mitosis (Chabner & Longo, 2001). Durante la transición de la metafase a la anafase existe un punto de control adicional, que asegura que los cromosomas estén correctamente alineados y que no haya errores en el huso acromático, antes de iniciarse la segregación cromosómica a las células hijas (Castedo

et al., 2004; Huang et al., 2005). Cuando se activan los puntos de control en respuesta a alteraciones que pueden comprometer la fidelidad de la división, se produce la detención del ciclo celular (Collins et al., 1997).

2.2. Basidiomycetes como potenciales fuentes de metabolitos antitumorales

Los hongos son organismos eucarióticos, quimioheterótrofos y carentes de clorofila. Abundan en el suelo, en la vegetación y en la materia existente en el agua. En la naturaleza, los hongos juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y son responsables junto a las bacterias del reciclaje de nitrógeno, carbono y otros elementos vitales (Davis et al., 1978; Prieto, 1992).

El estudio sistemático de los hongos comenzó hace apenas 250 años, pero este grupo de organismos es conocido por el hombre hace milenios (Prieto, 1992). El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación de productos químicos hacen que el área de los productos naturales sea la de mayor crecimiento. En la actualidad se han descrito cerca de un millón de productos naturales aislados a partir de diferentes fuentes biológicas, de las cuales los microorganismos constituyen una de las menos estudiadas y por lo tanto, ofrecen grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras con actividad biológica (Brizuela et al., 1998).

La investigación de nuevos compuestos antitumorales en la naturaleza no se limita solo a plantas superiores, microorganismos muy utilizados como fuentes de antibióticos, producen un gran número de metabolitos con propiedades antitumorales (Trease & Evans, 1991). Dentro de los microorganismos, los Basidiomycetes presentan una capacidad de producción de metabolitos biológicamente activos apenas investigada y constituyen potenciales fuentes naturales que han motivado en las últimas décadas el interés de estudiar estos organismos (Mizuno et al., 1992).

La División taxonómica Basidiomycota forma un grupo diverso de hongos, constituyen el grupo más evolucionado en lo que respecta a los hongos y se caracteriza porque sus especies presentan un talo micelial, formado por hifas tabicadas que comúnmente presentan fíbulas o un talo unicelular como es el caso de los hongos levaduriformes (Ainsworth & Sussman, 1965; Davis et al., 1978). La reproducción se puede llevar a

cabo por medio de dos vías, la asexual dada por la producción de esporas llamadas conidias y la sexual que se caracteriza por la producción de esporas exógenas denominadas basidiosporas, las cuales se forman en la superficie de estructuras especializadas llamadas basidios. La mayoría de los hongos comestibles pertenecen a este grupo taxonómico (Davis et al., 1978).

La amplia gama de productos naturales con actividad biológica producidos por estos hongos abarca desde agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales y citostáticos hasta enzimas y reguladores del crecimiento (Brizuela et al., 1998; Chihara et al., 1969; Ito et al., 1979). Los polisacáridos con actividad antitumoral producidos por basidiomicetes han ido recibiendo en los últimos años una creciente atención, debido a la potente actividad antitumoral presentada sobre una gran variedad de cánceres humanos, demostrando especificidad y selectividad sobre las células tumorales (Daba & Ezeronye, 2003; Ooi & Liu, 2000), apareciendo en la literatura reportes sobre polisacáridos antitumorales aislados a partir de hongos comestibles tales como *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum* (Mizuno et al., 1992; Yoshida et al., 1996). Sin embargo, el mecanismo antitumoral aún no está dilucidado (Ooi & Liu, 2000).

- *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing.

Taxonómicamente *A. aegerita* es un hongo que pertenece al Reino Fungi; División Basidiomycota; Clase Agaricomycetes; Orden Agaricales; Familia Bolbitiaceae; Género *Agrocybe*. Entre los nombres comunes de esta especie destaca: seta de chopo y seta de mermez (Giovannini, 2006; Wasser & Weis, 1999) (Ver anexo 1; Figura 5). Es un hongo saprófito que crece en la materia muerta de diversos árboles, tales como: álamo, sauce, fresno, olmo y arce (Giovannini, 2006). Se distribuye principalmente en Norteamérica y sur de Europa (Stamets, 1993), aunque también se ha encontrado en India (Kaul, 1981). Para su cultivo se necesita de un clima templado y húmedo (Giovannini, 2006).

Propiedades medicinales

Este hongo es utilizado en algunas regiones de China como antifúngico y antitumoral (Diyabalanage et al., 2008), diurético y antidiarreico (Hobbs, 1996), antiinflamatorio y antioxidante (Zhang et al., 2003). También se ha reportado actividad hipoglicemiante *in vitro* debido a la acción de dos polisacáridos (AG-HN1 y AG-HN2) aislados desde el extracto acuoso de *A. aegerita* (Kiho et al., 1994).

La actividad antitumoral ha sido reportada sobre el sarcoma 180 de ratón, debido a la acción de un polisacárido lineal (1→3)- α -D-glucano aislado desde el cuerpo fructífero de *A. aegerita* (Yoshida et al., 1996).

- *Hericium erinaceum* (Bull.:Fr.) Pers.

Taxonómicamente *H. erinaceum* es un hongo que pertenece al Reino Fungi; División Basidiomycota; Clase Agaricomycotina; Orden Russulales; Familia Hericiaceae; Género *Hericium*. Entre los nombres comunes de esta especie destaca: melena de león, pom pom blanc y yamabushitake (Giovannini, 2006; Mizuno et al., 1992; Wasser & Weis, 1999) (Ver anexo 1; Figura 5). Es un hongo que crece principalmente en árboles como el roble y el haya, y en escasas ocasiones se observa en otros árboles. La distribución de esta especie es bastante irregular, presentándose en Norteamérica, Europa y Asia (Giovannini, 2006).

Propiedades medicinales

Esta especie es un hongo comestible utilizado en la medicina China para tratar problemas de indigestión, neurastenia y debilidad general (Giovannini, 2006). El micelio es elaborado en forma de píldoras para tratar úlceras duodenales, gastritis crónica y carcinoma esofágico (Fujiwara et al., 2006; Giovannini, 2006). En esta especie también se han reportado casos aislados que sugieren las siguientes actividades: hipoglicemiante y antiagregante plaquetario (Kawagishi et al., 1994), antimicrobiana (Kim et al., 2000), citotóxica (Kuwahara et al., 1992), inmunomoduladora (Liu et al., 2002), antioxidante (Mau et al., 2002) y antitumoral (Mizuno et al., 1992; Mizuno et al.,

1995a). Recientes estudios han reportado un efecto neuroprotector contra isquemias cerebrales, por lo que puede ser clínicamente útil en la prevención de infartos cerebrales (Fujiwara et al., 2006).

Actualmente esta especie es utilizada para el tratamiento clínico del cáncer en China (Mizuno, 1995c). La actividad antitumoral ha sido reportada sobre el Sarcoma 180 de ratón, cáncer cervicouterino (Hela) y tumor de Ehrlich (Mizuno, 1999a). Esta actividad ha sido atribuida a polisacáridos aislados desde el cuerpo fructífero de *H. erinaceum*. Los polisacáridos mencionados son los siguientes: β -glucosilano, complejo β -glucosilano-proteína, complejo galactoxiloglucano-proteína y manoglucosilano (Kawagishi et al., 1990; Mizuno et al., 1992; Wasser & Weis, 1999).

- Polisacáridos con actividad antitumoral aislados de Basidiomycetes

Los polisacáridos son macromoléculas que se encuentran en abundancia en la naturaleza. Presentan en su estructura repetidos polímeros de residuos de monosacáridos unidos uno del otro por medio de enlaces glucosídicos. Entre las macromoléculas, los polisacáridos presentan un gran potencial de variabilidad estructural, lo cual le proporciona la flexibilidad necesaria para regular mecanismos de interacción célula-célula en organismos superiores (Daba & Ezeronye, 2003; Ooi & Liu, 2000).

Actualmente se han descubierto numerosos polisacáridos antitumorales extraídos desde setas, hongos, levaduras, algas, líquenes y plantas (Jong et al., 1991; Ren et al., 1995; Sone et al., 1996). Los polisacáridos antitumorales aislados de basidiomicetes se han presentado en los cuerpos fructíferos, cultivos de micelio y en los cultivos filtrados de basidiomicetes (Daba & Ezeronye, 2003). Estos polisacáridos varían en su composición química, estructura, propiedades físicas y actividad antitumoral (Franz, 1989; Whistler et al., 1976; Zhang et al., 2007). La gran mayoría de los polisacáridos purificados de las setas pertenecen a homoglicanos o heteroglicanos y el resto pertenece a complejos de polisacárido-proteína. La fuente principal de polisacáridos antitumorales está relacionado con las membranas celulares de los hongos, las cuales están constituidas por polisacáridos tales como: quitina, celulosa, (1 \rightarrow 3)- β -glucano,

(1→6)-β-glucano, (1→3)-α-glucano o complejos de polisacárido-proteína tales como galactomanano-proteína y glucuromanano-proteína. Sin embargo, la quitina y el quitosano no han presentado actividad antitumoral (Mizuno et al., 1995a; Moradali et al., 2007).

A varios de los polisacáridos aislados de hongos, se les ha identificado y adjudicado actividad antitumoral (Chihara, 1992; Mizuno et al., 1995b; Whistler et al., 1976). Estos extractos polisacáridos han demostrado una potente actividad antitumoral sobre una gran variedad de cánceres humanos, tales como: adenocarcinoma mamario 755, sarcoma S-180, cáncer de hígado HpG2, cáncer de glándula mamaria MCF-7, leucemia L-1210, carcinoma gástrico SGC-7901, cáncer de colón SW-480, linfoma de Namalwa y varios otros tumores (Hattori et al., 2004; Li et al., 2004; Zhang et al., 2007). A pesar de que no existe claridad acerca del mecanismo antitumoral que presentan sobre las células cancerígenas, se ha señalado que los polisacáridos han presentado las siguientes actividades:

1. Modificación de la respuesta biológica aumentando o potenciando la respuesta inmune, ya sea *in vivo* e *in vitro*, induciendo una inmunorespuesta celular iniciada por interacciones macrófago-linfocito y citotoxicidad mediada por anticuerpos contra células diana, lo cual contribuye a la eliminación de las células tumorales (Ikeda et al., 2004; Nagorcen et al., 2003; Poutsiaka et al., 2003).
2. Inducción de mecanismos apoptóticos sobre las células cancerígenas, provocando la inhibición selectiva del crecimiento tumoral (Cui et al., 2007; Lin et al., 2001; Zhang & Huang, 2006). A pesar que el mecanismo antiproliferativo presentado por polisacáridos sobre las células tumorales no está dilucidado, algunos estudios señalan que la incubación de polisacáridos con células tumorales podría modificar la expresión de señales celulares al interior de las células tumorales. Este efecto podría detener el ciclo celular y generar el proceso apoptótico (Chen & Chang, 2004; Li et al., 2004; Lin et al., 2003).

3. Efectos antimetástasis, inhibiendo metaloproteinasas y otras enzimas involucradas en el desarrollo de la metástasis (Kobayashi et al., 1995; Ooi & Liu, 2000).
4. Prevención de la oncogénesis por administración oral de polisacáridos (Zhang et al., 2007). Datos epidemiológicos obtenidos en Japón indican que el consumo de hongos comestibles está asociado a tasas inferiores de muerte por cáncer. Estudios *in vivo* han reportado que ratones tratados con una dieta normal (grupo control) y ratones tratados con una dieta rica en polisacáridos, antes de ser inoculados con agentes cancerígenos (BNN, metilcolantreno), presentaron al cabo de algunas semanas un menor índice de ratones con cáncer en el grupo tratado con una dieta rica en polisacáridos en comparación al grupo control (Ikekawa, 2001; Kurashiga et al., 1997; Nanba & Kuroda, 1987).

Actualmente varios de los polisacáridos aislados de hongos se encuentran en ensayos preclínicos y clínicos, y otros han sido utilizados con éxito en tratamientos contra el cáncer, principalmente en China y Japón (Kobayashi et al., 1993). Si bien hay algunos ejemplos de polisacáridos que han demostrado ser eficaces contra determinados tipos de cáncer al ser utilizados como monoterapia, los resultados más exitosos y prometedores se han presentado cuando los polisacáridos se utilizan como terapia coadyuvante a fármacos quimioterapéuticos, ejemplo de aquellos son PSK y PSP, dos polisacáridos aislados desde el micelio de *Coriolus versicolor* que han sido ampliamente estudiados. Se ha demostrado que PSK induce el aumento de caspasa-3 y la supresión de las vías de activación de NF- κ B al ser administrada en conjunto con docetaxel (agente quimioterapéutico inductor de apoptosis en células tumorales humanas) (Haldar et al., 1997; Kolfshoten et al., 2002), por lo que la combinación de PSK con una dosis baja de docetaxel (tóxico en dosis terapéuticas) puede ser una nueva estrategia terapéutica para tratar a pacientes con cáncer pancreático (Zhang et al., 2003). Por otro lado, PSP ha demostrado inducir un aumento significativo en la calidad de vida de los pacientes con cáncer, al producir un alivio sustancial del dolor y aumentar o potenciar el estado inmunológico en pacientes inmunodeprimidos que presentaban cáncer de estómago, esófago, pulmón, ovario y cérvix (Kidd, 2000).

Si bien queda mucho por conocer e investigar acerca de estos metabolitos, los resultados obtenidos en los ensayos preclínicos y clínicos son alentadores y proporcionan proyecciones clínicas insospechadas en la terapia del cáncer. A continuación se señalan los beneficios reportados por estos metabolitos en el tratamiento del cáncer:

- Eficaces contra un gran variedad de cánceres humanos y animales (Cui et al., 2007; Zhang et al., 2007).
- Atóxicos y bien tolerados (Fullerton et al., 2000; Kidd, 2000).
- Reducen los efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia (Furue et al., 1981; Nakano et al., 1999).
- Aumentan la supervivencia y mejoran la calidad de vida de los pacientes (Kidd, 2000).
- Previenen la oncogénesis por administración oral de polisacáridos (Zhang et al., 2007).

Conociendo la potente actividad antitumoral presentada por estos metabolitos sobre una gran variedad de cánceres humanos, teniendo en cuenta además que actualmente existe escasa información respecto al mecanismo de acción que presentan estos metabolitos y específicamente los polisacáridos aislados desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum* sobre las células tumorales, y no existiendo información respecto al efecto que presentan estos metabolitos sobre la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A, la hipótesis de trabajo es la siguiente:

Hipótesis

Los polisacáridos extraídos desde el micelio de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* inducen *in vitro* una inhibición de la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A de manera dosis-dependiente.

Para aceptar o rechazar la hipótesis, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Extraer desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, mediante métodos químicos, polisacáridos con actividad antitumoral.
2. Determinar *in vitro* la capacidad del extracto polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum* de inhibir la proliferación de dos líneas celulares de diferente origen tumoral, una derivada de un neuroblastoma de ratón (N2A) y la otra proveniente de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana (JURKAT T).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material Biológico

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron dos especies de hongos: *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum*. Estas cepas fueron adquiridas en MYCELIA (Sint-Amandsberg, Bélgica).

Para los ensayos de inhibición de la proliferación celular se utilizaron dos líneas celulares tumorales obtenidas de la American Type Culture Collection (Manassas, USA). La línea celular N2A que corresponde a un neuroblastoma de ratón y la línea celular JURKAT T que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de las líneas celulares tumorales utilizadas.

CARACTERÍSTICAS	LÍNEA CELULAR	
	JURKAT T	N2A
Morfología	Células grandes, abundante citoplasma, cromatina dispersa y nucleolos múltiples prominentes	Células pequeñas, redondas y azules
Tejido	Linfocitos T	Células de la cresta neural del Sistema Nervioso Periférico Simpático
Origen	Sanguíneo	Neuronal
Crecimiento	Suspensión	Adherente
Procedencia	ATCC: TIB-152	ATCC: CCL-131

3.1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados durante el desarrollo de la fase experimental son presentados en orden alfabético y se señala entre paréntesis las abreviaturas usadas en el texto: Agar extracto de malta (AEM) Merck, caldo malta (CM) Merck, dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma, dodecil sulfato sódico (SDS) Merck, estreptomina Invitrogen, etanol (EtOH) Merck, L-glutamina Invitrogen, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) Invitrogen, medio RPMI 1640 Invitrogen, penicilina Invitrogen, sal de tetrazolio MTT Sigma, suero bovino fetal (FBS) Winkler, tampón fosfato salino (PBS) Merck, tripsina Invitrogen.

3.1.3. Equipos

Agitador magnético con calefactor FISATOM modelo 753A, agitador Orbital Shaker modelo SO1, autoclave Orthman, balanza analítica Sartorius modelo 2462, baño termostático Haake modelo D8, baño termostático RV05 modelo 2B, cámara de flujo laminar Class IIA/B3 Biological Safety Cabinet modelo 1285 REL # 4, cámara de incubación SANYO modelo MCO-15AC, centrífuga IEC Centra MP4, congelador - 80 °C Thermo Forma, contenedor de nitrógeno líquido International Cryogenics modelo IC 35 RX, espectrofotómetro UV/visible Jasco modelo V-530, liofilizador VIRTIS modelo FM 12 XL, microscopio invertido OLYMPUS modelo CKX41, rotavapor Heidolph modelo W1, vórtex manual modelo K-550-GE (220 y 50 Hz).

3.1.4. Otros

Agua destilada estéril, cápsula de porcelana, crioviales, cronómetro, embudo Buchner, espátulas metálicas, filtros Millipore de 0.22 μm , guantes desechables, jeringas de 5 mL, matraces balón de 250 mL, matraz Erlenmeyer de 100 y 250 mL, matraz Kitasato de 500 mL, mechero Bunsen, micropipetas P20, P200 y P1000, microplacas de 96 pocillos de fondo plano, papel filtro (Whatman N° 1), pinza sostén, pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL, pipetas Pasteur, placas de cultivo de 25 y 75 cm^2 , porta objeto, probetas de vidrio de 10 mL, regla, rejilla de amianto, trípode, trompa metálica para vacío, tubos de ensayo, tubos eppendorf de 1,5 mL, tubos Falcon de 25 y 50 mL, varilla de agitación, vaso precipitado de 25, 250 y 100 mL, vidrio reloj.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum*

Las cepas de *A. aegerita* y *H. erinaceum* se cultivaron individualmente en caldo malta al 1% (CM) en botellas de cultivo. Cada una de las botellas que contenía 100 mL de CM fue inoculada con tres discos de agar con micelio (cada uno de 1 cm de diámetro). Los cultivos se mantuvieron a 23 ± 1 °C y 150 rpm durante 30 días en un agitador Orbital.

3.2.2. Extracción de polisacáridos desde el micelio de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum*

Los polisacáridos fueron obtenidos a través del siguiente procedimiento:

- Una vez concluido el período de incubación de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, los cultivos líquidos son filtrados al vacío utilizando papel Whatman N° 1.
- El micelio obtenido (201 g y 1,2 g de micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, respectivamente) se lavó varias veces con agua destilada para eliminar los restos del medio de cultivo.
- El micelio obtenido se sometió a extracción con una solución de agua/etanol (70:30) en agitación constante por seis horas a una temperatura de 70 °C. Este proceso permitió la extracción de las paredes celulares (fuente principal de polisacáridos con actividad antitumoral) desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum*.
- La solución obtenida es filtrada al vacío utilizando papel Whatman N° 1.
- El filtrado es evaporado en rotavapor, reduciendo al mínimo su volumen.
- El filtrado obtenido se dejó secar en liofilizador hasta peso constante.
- El extracto seco fue pesado en balanza analítica (625 mg y 62,5 mg de extracto polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, respectivamente) y en base a su peso fue calculado la solución stock de cada extracto polisacárido (25 mg/mL y 2,5 mg/mL de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, respectivamente). Dicha solución se diluyó en agua estéril destilada para los ensayos *in vitro* de inhibición de la

proliferación celular, para así obtener las concentraciones deseadas. Las soluciones utilizadas en este estudio se encuentran en el rango de 25 µg/mL a 2500 µg/mL.

3.2.3. Cultivo de líneas celulares

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles.

La línea celular N2A, fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% de SBF y antibióticos (penicilina 50 U/mL y estreptomycin 50 mg/mL). La línea celular JURKAT T, fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, antibióticos (penicilina 50 U/mL y estreptomycin 50 mg/mL) y L-glutamina 2 mM.

Los cultivos celulares de ambas líneas se mantuvieron en placas ventiladas y la incubación en una estufa a 37 °C y a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (Mansilla, 2005; Zambrano et al., 2007).

Las líneas celulares establecidas se pueden dividir en dos tipos principales: células adherentes (N2A) que se fijan al material plástico del frasco de cultivo y por lo tanto, deben desprenderse de esa superficie antes de ser utilizadas y células en suspensión (JURKAT T), que normalmente no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo (Morgan & Darling, 1995). Cuando las células llegaban a condiciones de saturación (células en suspensión) o de confluencia (células adherentes), se procedió a subcultivar para asegurar el crecimiento exponencial de las células. El subcultivo celular permite controlar la densidad del inóculo inicial que asegure que se trabaja en condiciones de crecimiento óptimas para cada línea celular.

3.2.3.1. Procedimiento para células adherentes (N2A)

- Eliminar el medio de cultivo del frasco.
- Lavar las células dos veces con tampón PBS 1x estéril (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄).

- Tratar con tripsina las células añadiendo el volumen de tripsina necesario para cubrir las células (2-3 mL) e incubar 5-10 minutos a 37 °C en la cámara de incubación, con el objetivo de desprender la monocapa celular. El control de la acción de la tripsina sobre la monocapa se realizó mediante la observación del cultivo en microscopio invertido.
- Se golpea el frasco suavemente en la parte inferior de la placa. Las células se desprenden debido a que la tripsina es una enzima proteolítica que rompe la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que mantiene unidas a las células (Navarro, 2005).
- Inactivar la tripsina añadiendo medio de cultivo suplementado a 37 °C.
- Pasar el volumen a un nuevo frasco de cultivo estéril.
- Guardar el frasco dentro de un incubador y controlar el crecimiento celular.

3.2.3.2. Procedimiento para células en suspensión (JURKAT T)

- Obtener mediante una pipeta el volumen de cultivo que asegure un subcultivo en fase exponencial de crecimiento y traspasar a un tubo Falcon.
- Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 o 10 mL (según el frasco de cultivo a utilizar, ya sea de 25 o 75 cm², respectivamente) de medio de cultivo suplementado a 37 °C.
- Pasar el volumen a un nuevo frasco de cultivo estéril.
- Guardar el frasco dentro de un incubador y controlar el crecimiento celular.

3.2.4. Ensayo de inhibición de la proliferación celular

La proliferación celular se determinó empleando el ensayo colorimétrico MTT, que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Este es un ensayo rápido, confiable, versátil y cuantitativo (Castro, 2006; Isolabella, 2005); que se fundamenta en la reducción del colorante MTT de color amarillo por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, para producir un derivado del formazán de color violeta

insoluble en agua pero soluble en DMSO, que absorbe a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas) (Dinezot & Lang, 1986; Mosmann, 1983; Perales, 2005). Este método ha sido utilizado de manera exitosa para monitorear la sensibilidad de las células tumorales humanas a los agentes quimioterapéuticos (Ferrari et al., 1990).

3.2.4.1. Procedimiento para determinar la proliferación celular

- Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano, en un número de 3×10^3 - 5×10^5 células/pocillo, durante 24 h, con medio DMEM (libre de rojo fenol) suplementado con 10 % de SBF.
- Luego, se agrega 10 μ L de extracto polisacárido a cada pocillo en distintas concentraciones (25-2500 μ g/mL), preparadas a partir de una solución stock de 25 mg/mL en el caso de *A. aegerita* y de 2,5 mg/mL en el caso de *H. erinaceum*, completando un volumen final de 100 μ L/pocillo. Se incuba por 24, 48 y 72 h. Los primeros pocillos se utilizan como control (no se agrega extracto polisacárido).
- Luego, se agrega 10 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL y se incuba por 4 h a 37 °C.
- Posteriormente se agrega solución de lisis (50% dimetilformamida, 20% SDS [pH 4.7]) y se incuba por 24 h a 37 °C.
- Se registra la cuantificación de la proliferación de las células tumorales por medio de un espectrofotómetro UV/visible con un filtro a 540 nm. El resultado de esta determinación nos indica el porcentaje de inhibición de la proliferación celular (Mansilla, 2005; Torrá, 2006).

La supervivencia celular se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de proliferación celular} = \frac{A_P \text{ células tratadas}}{A_P \text{ células control}} \times 100$$

A_P = Absorbancia promedio

3.2.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron analizados estadísticamente con el programa estadístico GraphPad Prism (versión 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, EUA, 2003). El análisis estadístico entre los valores de controles y ensayos fueron interpretados mediante el test de student, con un nivel de significancia de ($p < 0,05$). Los gráficos se obtuvieron usando el software GraphPad Prism.

Los valores de IC_{50} fueron calculados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism, mediante el análisis estadístico de regresión lineal (ecuación de la recta: $y=mx+b$).

Los resultados presentados en las Figuras y Tablas corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento \pm el error estándar (SD). Al menos tres experimentos independientes fueron realizados en cada ensayo.

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DEL EXTRACTO POLISACÁRIDO DE *Agrocybe aegerita* Y *Hericiium erinaceum* DE INHIBIR LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS LÍNEAS TUMORALES JURKAT T Y N2A

La proliferación celular se determinó empleando el ensayo colorimétrico del MTT. A partir de los resultados obtenidos, se construyeron las curvas de supervivencia celular que se muestran en las Figuras 1 a la 9, y a partir de estos resultados se calcularon las concentraciones de polisacáridos que inhiben la proliferación celular en un 50% (dosis IC₅₀) respecto a las mismas células sin tratar (Tablas 2 a la 6).

De modo general, los resultados obtenidos en este estudio muestran que las células tratadas con extracto polisacárido presentan en todos los casos absorbancias (A⁰) inferiores a las presentadas por el control. La concentración número 0 (control) representa las células que sólo contienen medio de cultivo. Si se considera una proliferación del 100% la obtenida en estas células control, se puede señalar que las A⁰ alcanzadas cuando las células se tratan con diferentes concentraciones de extracto polisacárido muestran una disminución de la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A en la medida en que aumenta la concentración de cada extracto. El análisis gráfico de las Figuras 1 a la 9 describe una relación casi lineal con pendiente negativa entre el porcentaje de inhibición de la proliferación celular y las diferentes concentraciones de extracto polisacárido.

4.1.1. Evaluación *in vitro* del efecto antiproliferativo presentado por el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T

En la Figura 1, se observa el efecto antiproliferativo del extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 24 h de incubación. A bajas concentraciones de los extractos polisacáridos filtrados y no filtrados se determinó un crecimiento similar al control (células cultivadas en ausencia

de extracto polisacárido), sin embargo, a altas concentraciones de extracto polisacárido ($\geq 250 \mu\text{g/mL}$) se observó una disminución significativa de las células tumorales N2A. Este efecto resultó ser dependiente de la concentración, efecto que se observa principalmente a altas concentraciones de extracto polisacárido ($\geq 250 \mu\text{g/mL}$). Además fue observada una mayor actividad antiproliferativa por acción del extracto polisacárido no filtrado de ambas especies.

Lo mismo es presentado en la Figura 2, pero en la línea tumoral JURKAT T, donde se registro un efecto similar al observado para la línea tumoral N2A.

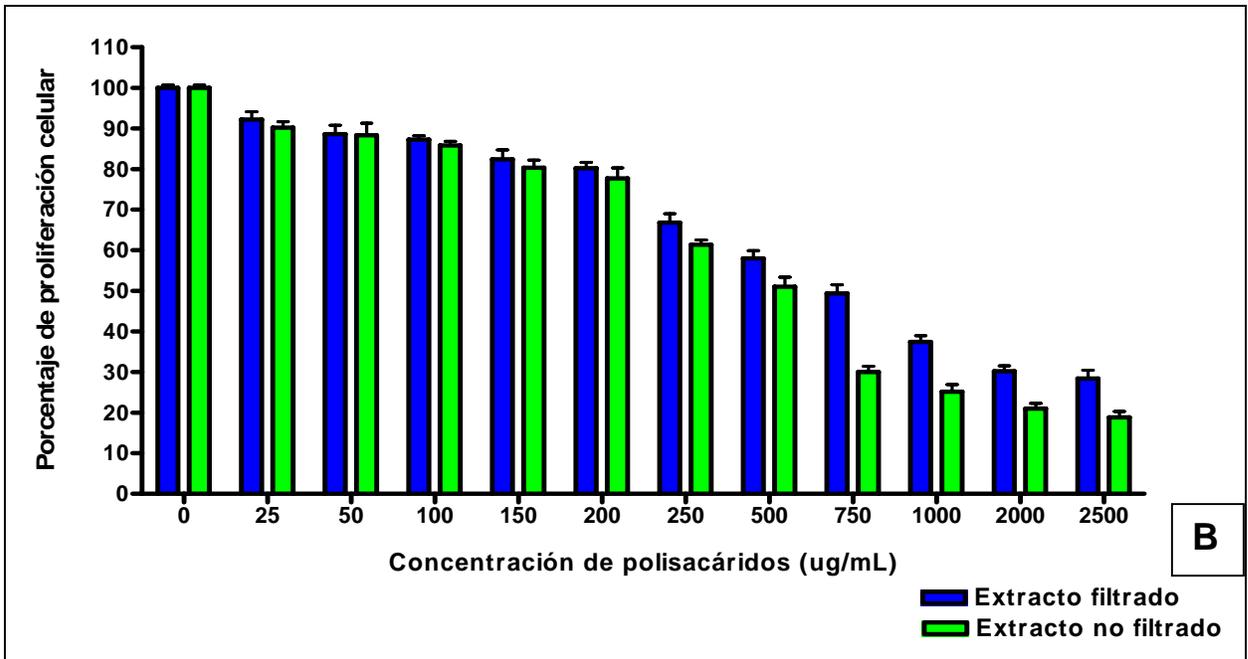
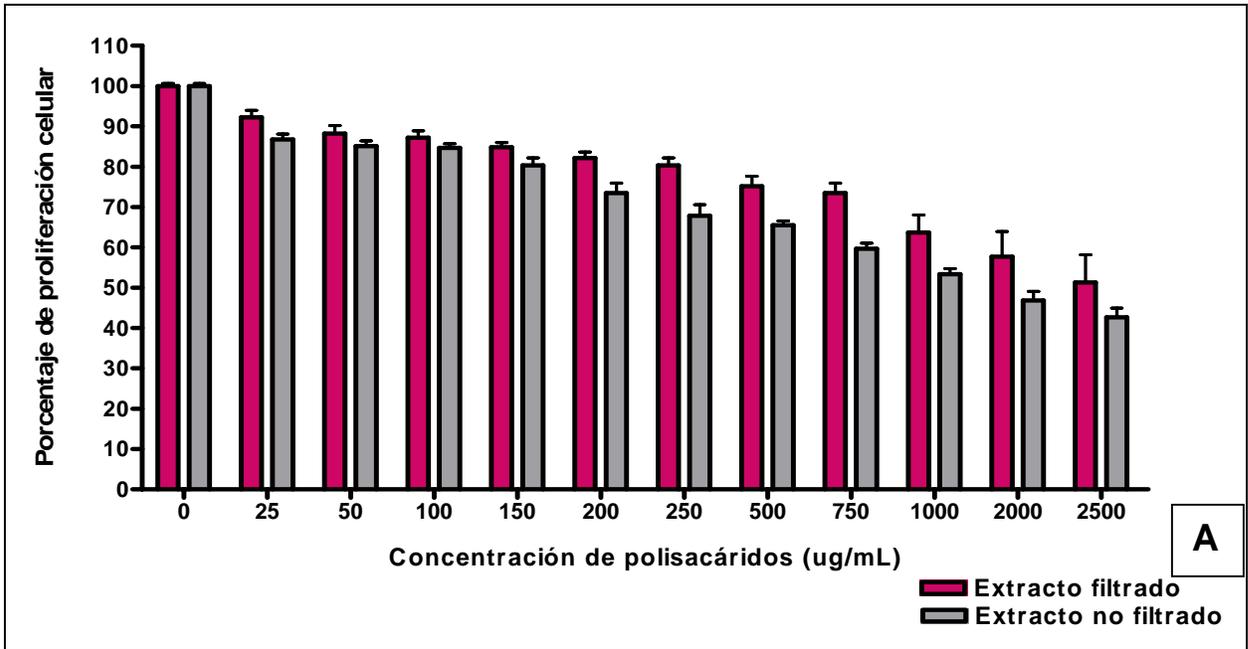


Figura 1. Efecto antiproliferativo a las 24 horas de incubación del extracto polisacárido filtrado y no filtrado de A: *Agrocybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

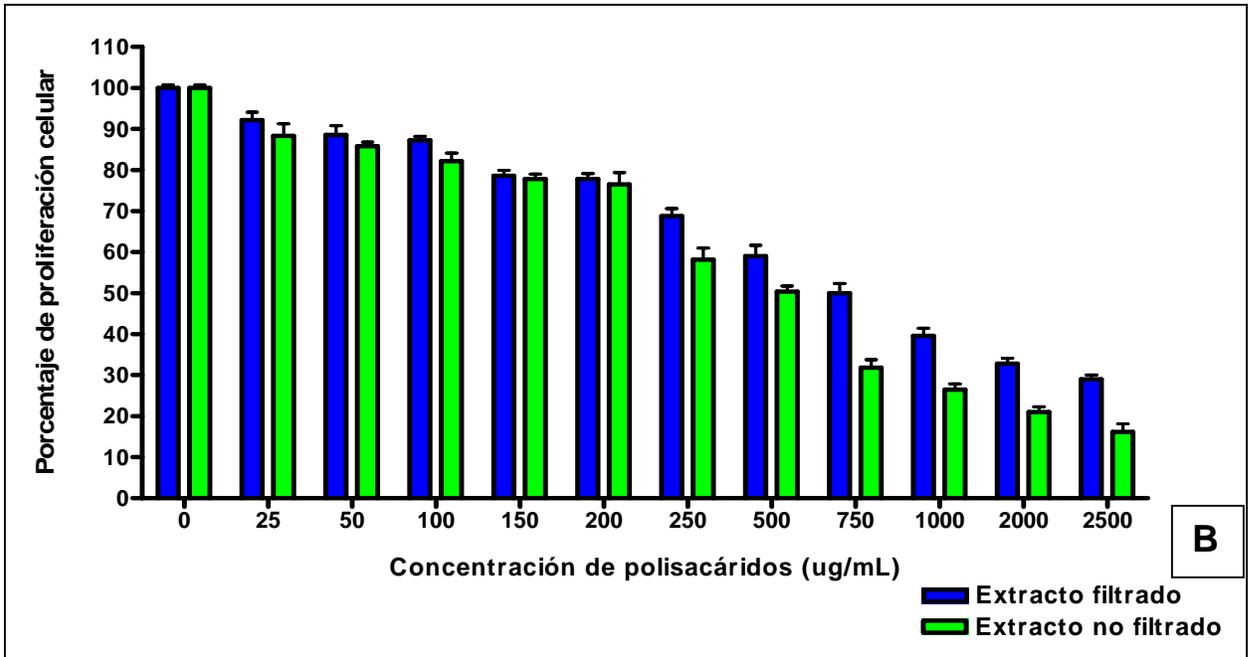
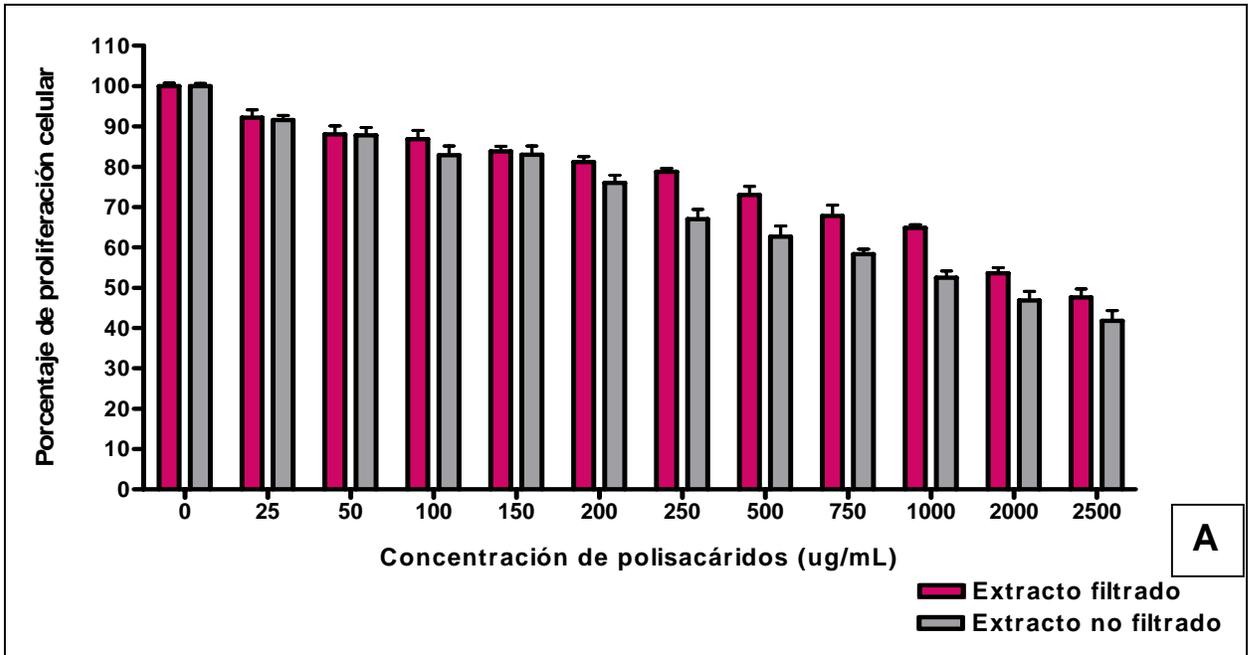


Figura 2. Efecto antiproliferativo a las 24 horas de incubación del extracto polisacárido filtrado y no filtrado de A: *Agroclybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

La Tabla 2 muestra los valores de IC₅₀ calculados para las células N2A después de 24 h de tratamiento continuo con el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum*. Las concentraciones IC₅₀ obtenidas para las células N2A tratadas con el extracto polisacárido filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum* fueron de 2294 µg/mL y 1317 µg/mL, respectivamente. En el caso del extracto polisacárido no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, los valores obtenidos de IC₅₀ fueron de 1904 µg/mL y 1038 µg/mL, respectivamente.

Tabla 2. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* que inhiben la proliferación celular de N2A en un 50% (dosis IC₅₀*) a 24 horas de incubación.

Línea Celular	Extracto Polisacárido		*IC ₅₀ (µg/mL) 24 h
N2A	<i>Agrocybe aegerita</i>	Filtrado	2294 ± 2,03
		No filtrado	1904 ± 3,26
	<i>Hericiium erinaceum</i>	Filtrado	1317 ± 4,37
		No filtrado	1038 ± 5,95

* Los valores de IC₅₀ obtenidos representan la concentración a la que se alcanza el 50% del efecto inhibitorio máximo obtenido a 2500 µg/mL.

La Tabla 3 muestra los valores de IC₅₀ calculados para las células JURKAT T después de 24 h de tratamiento continuo con el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum*. Las concentraciones IC₅₀ obtenidas para las células JURKAT T tratadas con el extracto polisacárido filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum* fueron de 2226 µg/mL y 1351 µg/mL, respectivamente. En el caso del extracto polisacárido no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, los valores obtenidos de IC₅₀ fueron de 1882 µg/mL y 989 µg/mL, respectivamente.

Tabla 3. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* que inhiben la proliferación celular de JURKAT T en un 50% (dosis IC₅₀*) a 24 horas de incubación.

Línea Celular	Extracto Polisacárido		*IC ₅₀ (µg/mL) 24 h
JURKAT T	<i>Agrocybe aegerita</i>	Filtrado	2226 ± 2,12
		No filtrado	1882 ± 3,59
	<i>Hericiium erinaceum</i>	Filtrado	1351 ± 4,13
		No filtrado	989 ± 5,58

* Los valores de IC₅₀ obtenidos representan la concentración a la que se alcanza el 50% del efecto inhibitorio máximo obtenido a 2500 µg/mL.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 1 y 2) se determinó que las concentraciones de extracto polisacárido no filtrado necesarias para inhibir la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A, siempre fueron inferiores a las obtenidas por el extracto polisacárido filtrado. Por tal motivo, se procedió a utilizar el extracto polisacárido no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum* para la realización de los ensayos posteriores de inhibición de la proliferación celular.

4.1.2. Evaluación *in vitro* del efecto antiproliferativo de polisacáridos obtenidos desde el micelio de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a diferentes tiempos de incubación

En la Figura 3 a la 5 se presentan los gráficos del efecto antiproliferativo del extracto de polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a diferentes tiempos de incubación. En la Figura 3, se observa que a bajas concentraciones de extracto de polisacárido (≤ 200 µg/mL), la cuantificación de la proliferación celular es alta ($\geq 80\%$ de células N2A), sin embargo, a altas concentraciones de extracto polisacárido se observa una disminución significativa de la población celular, que decrece hasta en un 50% con el extracto polisacárido de *A. aegerita* y en un 80% con el extracto polisacárido de *H. erinaceum* a 24 h de incubación. A las 48 y 72 h de

incubación (Fig. 4 y 5, respectivamente), se aprecia un efecto análogo al observado en la Figura 3 a bajas concentraciones de extracto de polisacárido, sin embargo, a altas concentraciones de extracto ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$) se determinó una mayor disminución de las células tumorales N2A en relación a la observada en la Figura 3, que decrece hasta en un 73% con el extracto polisacárido de *A. aegerita* y en un 94% con el extracto polisacárido de *H. erinaceum*, a las 72 h de incubación (2500 $\mu\text{g/mL}$).

Por su parte en la Figura 6 a la 8 se presentan los gráficos de los ensayos realizados en la línea tumoral JURKAT T a diferentes tiempos de incubación. Los resultados obtenidos dan cuenta de un efecto análogo al observado sobre la línea tumoral N2A, donde ambos extractos polisacáridos inducen una disminución de la proliferación de las células tumorales JURKAT T de manera dependiente al incremento de las concentraciones de polisacáridos empleadas, apreciándose a las 48 y 72 h de incubación, una mayor disminución de las células tumorales, particularmente a altas concentraciones de extracto polisacárido ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$).

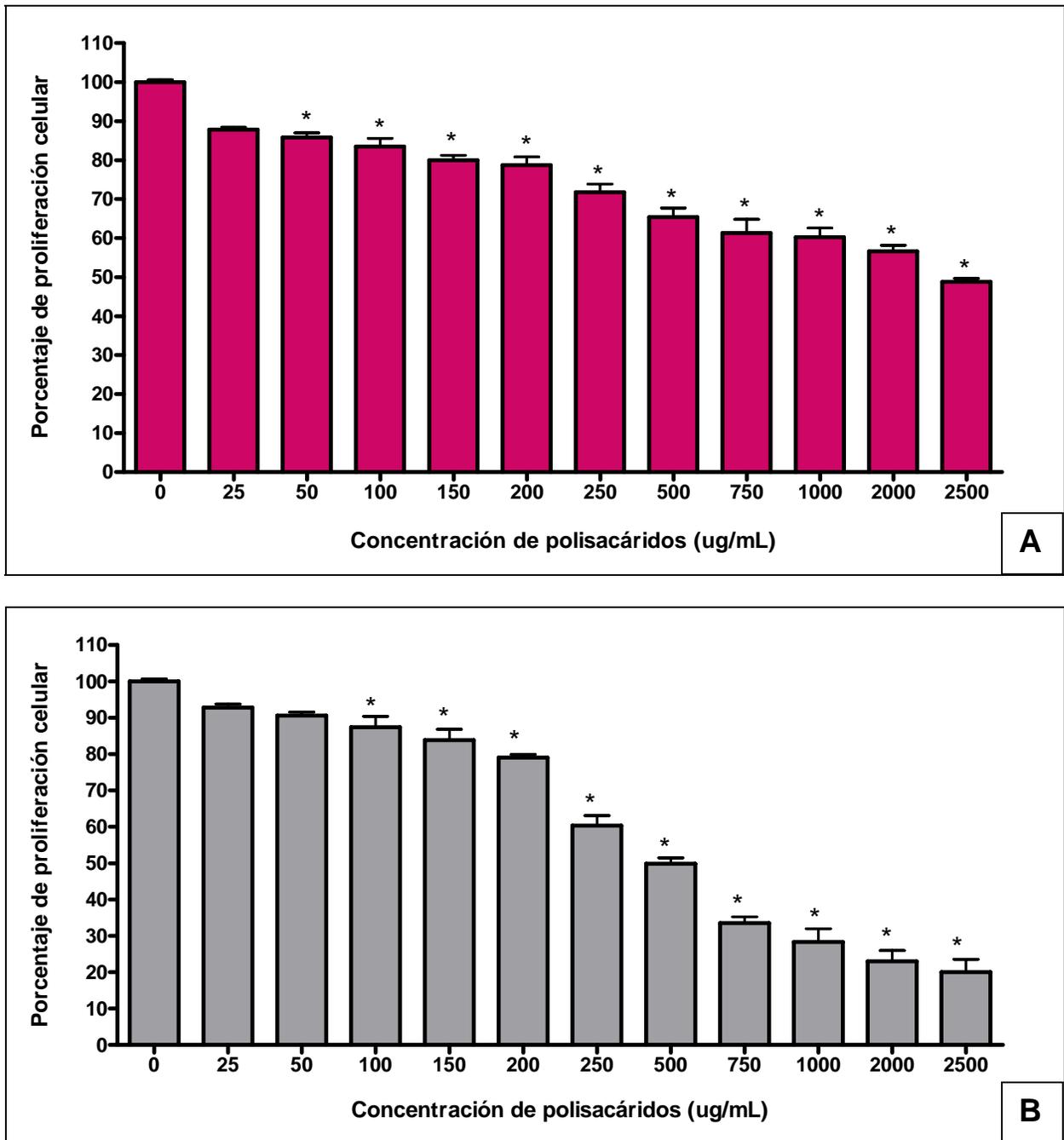


Figura 3. Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de A: *Agrocybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 24 horas de incubación. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; calculado respecto al control).

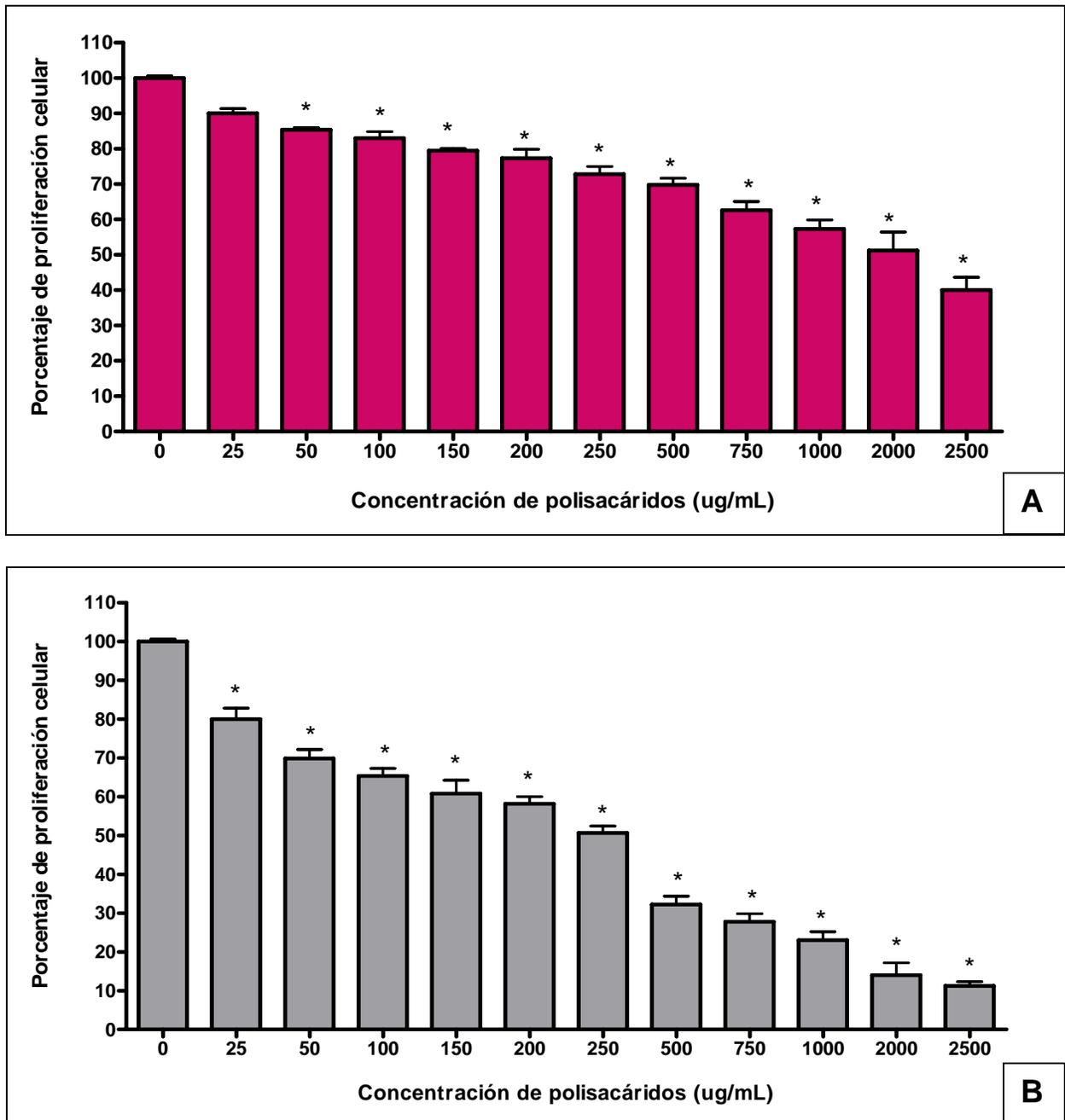


Figura 4. Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de A: *Agroclybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 48 horas de incubación. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; calculado respecto al control).

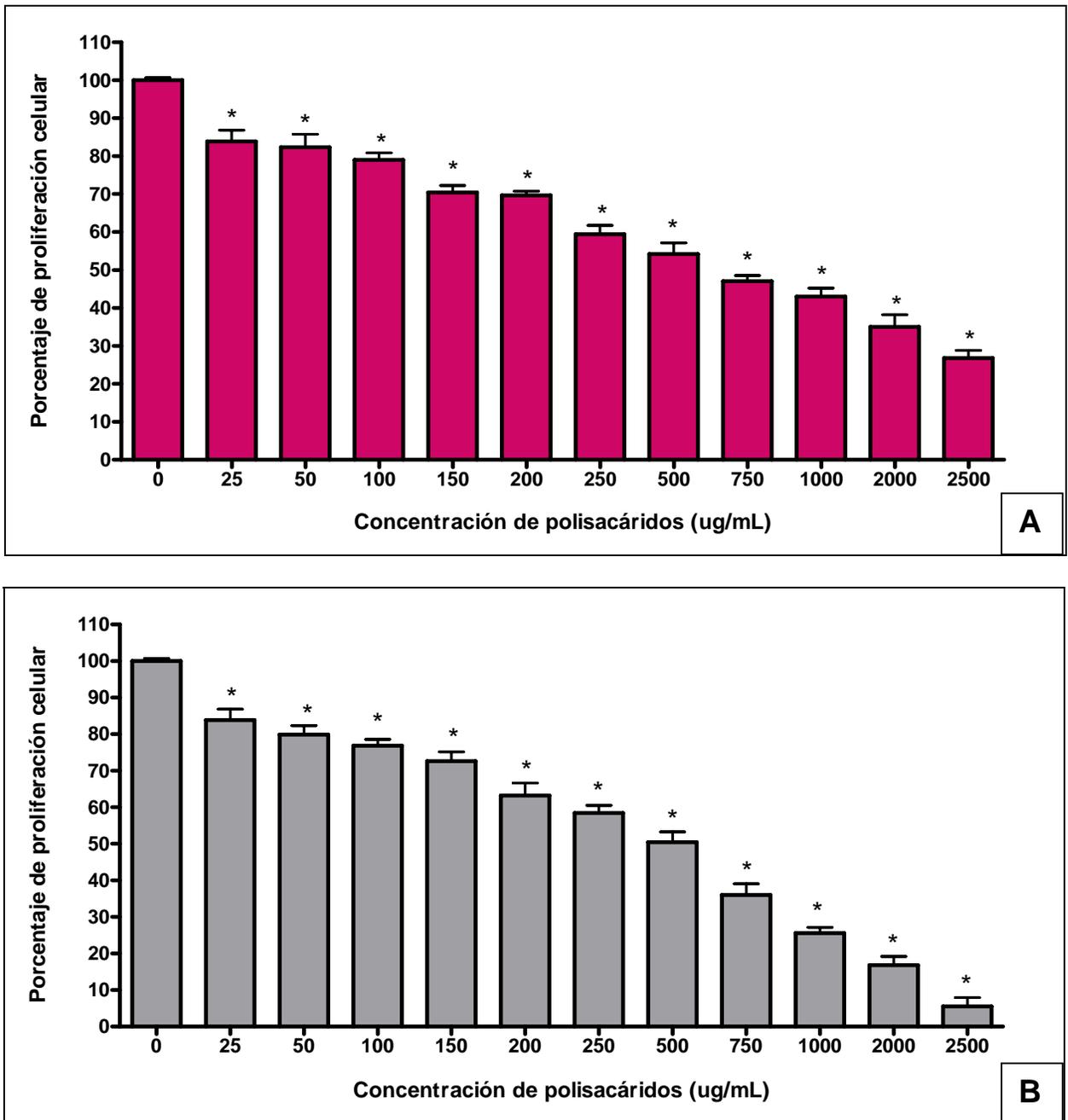


Figura 5. Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de A: *Agrocybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral N2A a 72 horas de incubación. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; calculado respecto al control).

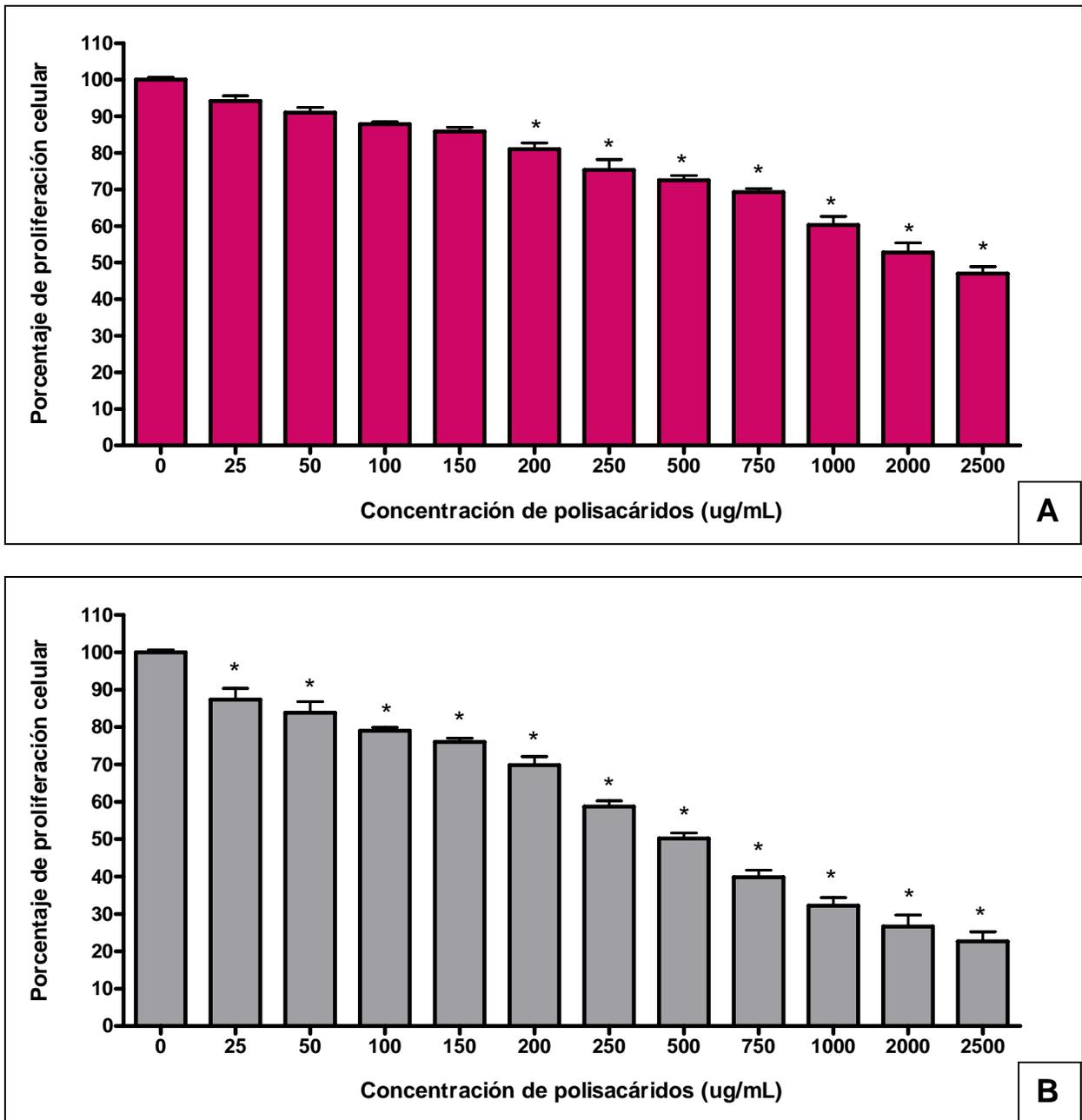


Figura 6. Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de A: *Agrocybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T a 24 horas de incubación. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; calculado respecto al control).

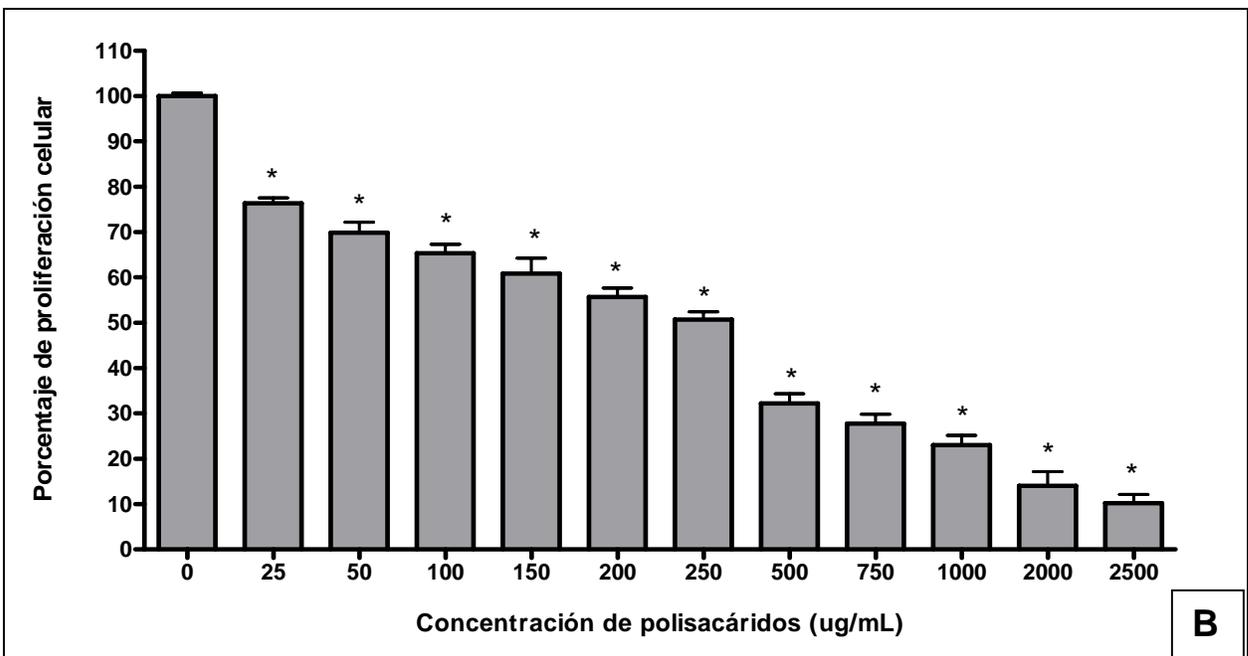
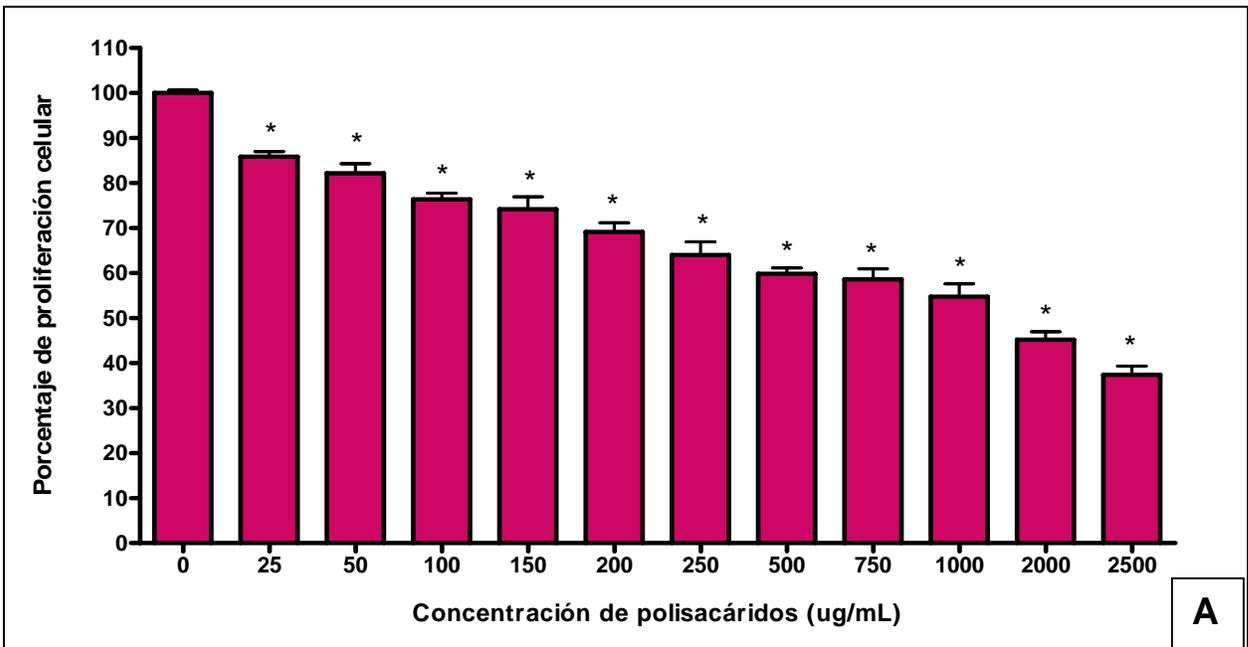


Figura 7. Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de A: *Agrocybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T a 48 horas de incubación. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; calculado respecto al control).

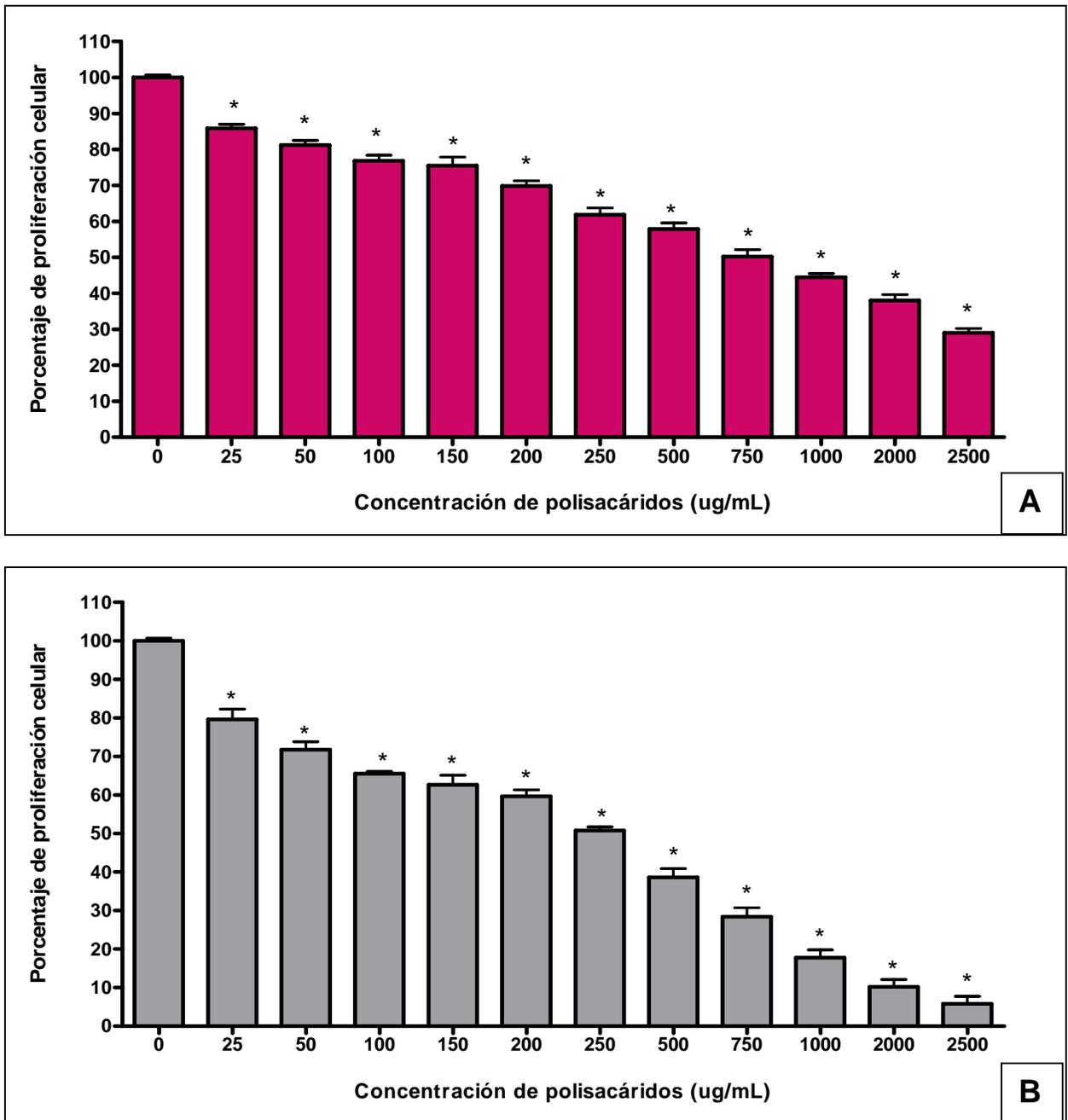


Figura 8. Efecto antiproliferativo del extracto polisacárido de A: *Agrocybe aegerita* y B: *Hericium erinaceum* sobre la línea tumoral JURKAT T a 72 horas de incubación. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; calculado respecto al control).

La Tabla 4 muestra los valores de IC₅₀ calculados para las células N2A después de 24, 48 y 72 h de incubación con el extracto polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum*. A las 24 h de incubación, las concentraciones IC₅₀ obtenidas para el extracto polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum* fueron de 2454 µg/mL y 1100 µg/mL, respectivamente. Al final del ensayo (72 h), los valores de IC₅₀ fueron de 1263 µg/mL para el extracto polisacárido de *A. aegerita* y de 825 µg/mL para *H. erinaceum*.

Tabla 4. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* que inhiben la proliferación celular de N2A en un 50% (dosis IC₅₀*) a 24, 48 y 72 horas de incubación.

Línea Celular	Extracto Polisacárido	*IC ₅₀ (µg/mL) 24 h	*IC ₅₀ (µg/mL) 48 h	*IC ₅₀ (µg/mL) 72 h
N2A	<i>Agrocybe aegerita</i>	2454 ± 3,05	1925 ± 2,68	1263 ± 4,18
	<i>Hericiium erinaceum</i>	1100 ± 5,90	908 ± 5,09	825 ± 4,71

* Los valores de IC₅₀ obtenidos representan la concentración a la que se alcanza el 50% del efecto inhibitorio máximo obtenido a 2500 µg/mL.

La Tabla 5 muestra los valores de IC₅₀ calculados para las células JURKAT T después de 24, 48 y 72 h de incubación con el extracto polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum*. A las 24 h de incubación, las concentraciones IC₅₀ obtenidas para el extracto polisacárido de *A. aegerita* y *H. erinaceum* fueron de 2176 µg/mL y 1089 µg/mL, respectivamente. Al final del ensayo (72 h), los valores de IC₅₀ fueron de 1361 µg/mL para el extracto polisacárido de *A. aegerita* y de 597 µg/mL para *H. erinaceum*.

Tabla 5. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum* que inhiben la proliferación celular de JURKAT T en un 50% (dosis IC₅₀*) a 24, 48 y 72 horas de incubación.

Línea Celular	Extracto Polisacárido	*IC ₅₀ (µg/mL) 24 h	*IC ₅₀ (µg/mL) 48 h	*IC ₅₀ (µg/mL) 72 h
JURKAT T	<i>Agrocybe aegerita</i>	2176 ± 2,50	1744 ± 3,43	1361 ± 3,86
	<i>Hericiium erinaceum</i>	1089 ± 5,01	600 ± 5,98	597 ± 5,68

* Los valores de IC₅₀ obtenidos representan la concentración a la que se alcanza el 50% del efecto inhibitorio máximo obtenido a 2500 µg/mL.

4.1.3. Evaluación *in vitro* del efecto antiproliferativo presentado por el extracto polisacárido combinado de *Agrocybe aegerita* y *Hericiium erinaceum*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T

En la Figura 9, se muestra el gráfico del efecto antiproliferativo del extracto de polisacárido combinado de *A. aegerita* y *H. erinaceum* sobre las líneas tumorales N2A y JURKAT T a 24 h de incubación. Se observa que la combinación de ambos extractos induce una disminución de la proliferación de las células tumorales N2A y JURKAT T a las 24 h de incubación. Este efecto, al igual que el presentado en las Figuras anteriores (Fig. 1 a la 8), resultó ser dependiente de la concentración de polisacáridos.

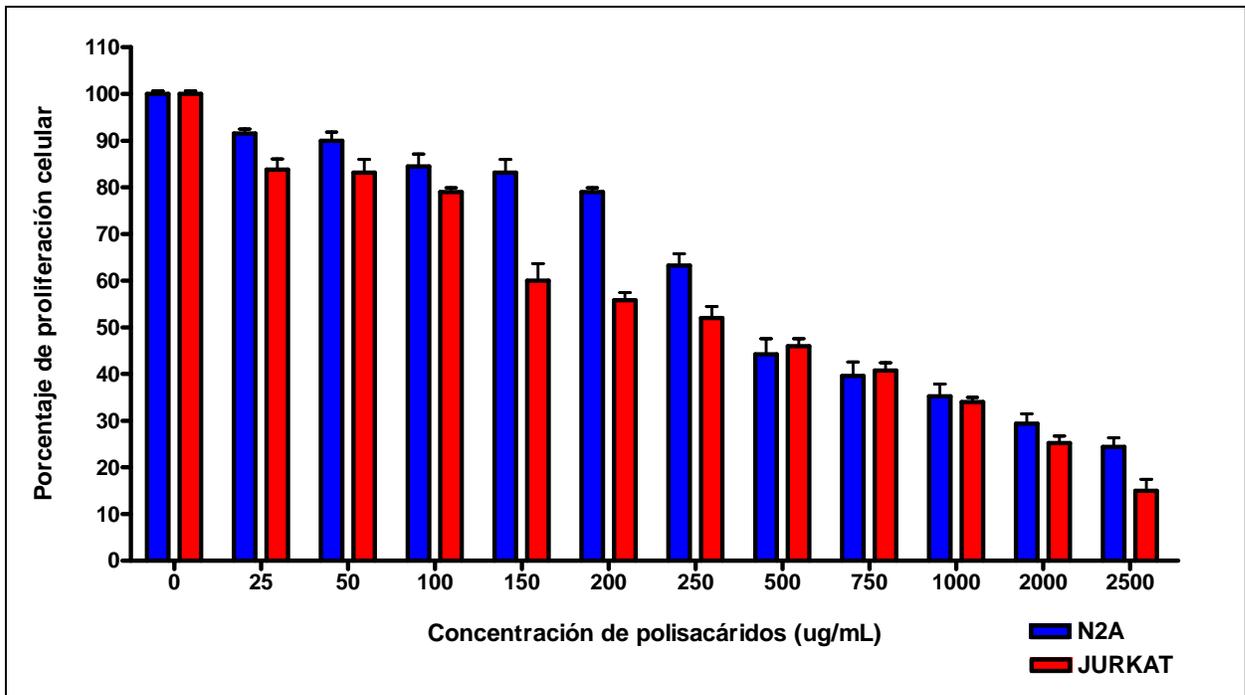


Figura 9. Efecto antiproliferativo a las 24 horas de incubación del extracto polisacárido combinado de *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum* sobre las líneas tumorales N2A y JURKAT T. La proliferación celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT a 540 nm. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

La Tabla 6 muestra los valores de IC_{50} calculados para las células JURKAT T y N2A después de 24 h de incubación con el extracto polisacárido combinado de *A. aegerita* y *H. erinaceum*. Las concentraciones IC_{50} obtenidas para el extracto polisacárido combinado fueron de 1217 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular N2A y de 915 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular JURKAT T.

Tabla 6. Valores de las concentraciones de extracto polisacárido combinado de *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum* que inhiben la proliferación celular de N2A y JURKAT T en un 50% (dosis IC₅₀*) a 24 horas de incubación.

Línea Celular	Extracto Polisacárido	*IC ₅₀ (µg/mL) 24 h
N2A	Extracto combinado	1217 ± 5,52
JURKAT T	Extracto combinado	915 ± 5,33

* Los valores de IC₅₀ obtenidos representan la concentración a la que se alcanza el 50% del efecto inhibitorio máximo obtenido a 2500 µg/mL.

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que las concentraciones de extracto polisacárido de *H. erinaceum* necesarias para inhibir la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A, siempre fueron inferiores a las obtenidas por el extracto polisacárido de *A. aegerita*. De estos resultados se deduce que al menos en las líneas celulares tumorales analizadas, los polisacáridos obtenidos desde el micelio de *H. erinaceum* se comportaron como agentes antiproliferativos muy eficaces.

5. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se estima que en el año 2005 murieron de cáncer 7,6 millones de personas, y en los próximos 10 años morirán 84 millones de personas más. Por lo tanto, el descubrimiento e identificación de nuevas drogas antitumorales, se convierte en una meta importante en la investigación de las ciencias biomédicas (Mansilla, 2005; Ooi & Liu, 2000).

En este contexto, la búsqueda de potenciales polisacáridos como agentes antitumorales proviene probablemente de la insatisfacción de la quimioterapia y radioterapia. Un gran número de los compuestos químicos que han sido identificados y utilizados como agentes específicos para matar a las células tumorales, son también tóxicos para las células normales, presentando efectos secundarios considerables y por lo tanto, su uso clínico es restringido (Ooi & Liu, 2000). Es así, como los Basidiomycetes han despertado un gran interés en las últimas décadas debido a la presencia de polisacáridos, metabolitos con un amplio espectro de actividades biológicas, dentro de las cuales destaca la actividad antitumoral presentada sobre una gran variedad de cánceres humanos, demostrando especificidad y selectividad sobre las células tumorales. Sin embargo, el mecanismo antitumoral aún no está dilucidado (Daba & Ezeronye, 2003; Ooi & Liu, 2000).

En la presente tesis se abordó el estudio *in vitro* del efecto antiproliferativo de polisacáridos obtenidos desde el micelio de *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum* sobre las células tumorales JURKAT T y N2A. Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que la cuantificación de la proliferación celular se mantiene con valores superiores al 80%, con concentraciones inferiores a 200 µg/mL de extracto polisacárido, sin embargo, a altas concentraciones de extracto polisacárido (≥ 250 µg/mL) se comienza a observar una disminución significativa de la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A, lo cual se manifiesta de forma proporcional al incremento de las concentraciones de polisacáridos empleados, observándose una disminución de las células tumorales JURKAT T y N2A hasta de un 50% con el extracto polisacárido de *A. aegerita* y de un 80% con el extracto polisacárido de *H. erinaceum* a 24 h de cultivo. A las 48 y 72 h de incubación, se determinó una mayor disminución de las células

tumorales N2A y JURKAT T, efecto que se aprecia particularmente a altas concentraciones de extracto polisacárido ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$).

Según lo informado por Cui *et al.*, (2007), Jiménez *et al.*, (2008) y Li *et al.*, (2004), el efecto antiproliferativo presentado por los polisacáridos se llevaría a cabo mediante dos mecanismos probables: **(1)** un efecto citotóxico induciendo muerte celular y **(2)** un efecto citostático provocando la detención del ciclo celular. Vetcher, (2003), señala que las drogas que actúan antes del punto S, cuando las células se encuentran en estado de reposo (fases G0 y G1) y no permiten la división celular, son llamadas citostáticas; si actúan después de este punto son citotóxicas y bloquean fuertemente la división celular, conduciendo a la muerte celular.

A pesar de que ambos extractos polisacáridos inducen una inhibición de la proliferación de las células tumorales JURKAT T y N2A, los resultados obtenidos en este estudio han demostrado un mayor efecto antiproliferativo por acción del extracto polisacárido de *H. erinaceum* en comparación al presentado por el extracto polisacárido de *A. aegerita* sobre las células tumorales JURKAT T y N2A. Este efecto se puede atribuir a que los polisacáridos obtenidos desde el micelio de *A. aegerita* provocarían la inhibición de la proliferación de las células tumorales a través de un efecto citostático, el cual podría estar mediado como lo señalan recientes estudios *in vitro*, por un aumento de la expresión de p21 y una disminución de la expresión de la ciclina D1 (Zhang *et al.*, 2007). Por otra parte, el efecto presentado por los polisacáridos obtenidos desde el micelio de *H. erinaceum*, se puede atribuir a que la incubación de polisacáridos con las células tumorales JURKAT T y N2A, podría modificar la expresión de señales celulares al interior de las células tumorales. Este efecto podría detener el ciclo celular y generar el proceso apoptótico a altas concentraciones de extracto polisacárido ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$) (Chen & Chang, 2004; Li *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003), ya que la significativa disminución presentada por las células tumorales N2A y JURKAT T al ser incubadas con concentraciones superiores a $1000 \mu\text{g/mL}$ de extracto polisacárido, sugieren un efecto sobre la viabilidad celular. Lo anteriormente señalado concuerda con lo informado por Cui *et al.*, (2007) y Li *et al.*, (2004), quienes demostraron que los polisacáridos aislados desde *Grifola frondosa* y *Phellinus linteus*, respectivamente,

inhibieron la proliferación de las células tumorales mediante la inducción de apoptosis y la activación del punto de control G₂/M, provocando la detención del ciclo celular.

Cabe destacar que el ensayo colorimétrico MTT permitió determinar el porcentaje de inhibición de la proliferación celular inducido por polisacáridos, sin embargo, este tipo de ensayo no permite discriminar si la inhibición de la proliferación se debe a la inducción de muerte celular (efecto citotóxico) o a la parada de la progresión del ciclo celular (efecto citostático). Según Isolabella, (2005), se debe tener en cuenta también que la acción de una droga sobre un tipo celular específico, depende de varios factores como por ejemplo el tiempo de incubación del cultivo con la droga en estudio, el estadio del ciclo celular en el que se encuentre el cultivo y la concentración del agente citotóxico, el cual es determinante en cuanto al comportamiento de la célula y la incidencia de muerte sobre una población celular, ya que se correlaciona que a mayor concentración o intensidad, mayor es el número de células necróticas observadas. También se debe tener en consideración lo señalado por Jiménez *et al*, (2008), quienes demostraron que el mecanismo de acción por el cual PSK induce un efecto antiproliferativo sobre las células tumorales, difiere según la histología tumoral. Por tal motivo, es necesaria la realización de estudios adicionales que permitan dilucidar el mecanismo de acción antitumoral que presentan estos metabolitos sobre las células cancerígenas.

Uno de los inconvenientes presentados durante el desarrollo de los ensayos de inhibición de la proliferación celular, fue la presencia de contaminación en los extractos polisacáridos, debido a ello, se procedió a filtrar parte de cada extracto utilizando filtros Millipore de 0.22 µm con jeringas desechables de 5 mL, para disminuir la contaminación del extracto original y observar la actividad antiproliferativa de cada extracto. Los resultados obtenidos señalan que ambos extractos polisacáridos inducen una disminución de las células tumorales JURKAT T y N2A a las 24 h de incubación, sin embargo, las concentraciones de extracto polisacárido no filtrado necesarias para inhibir la proliferación de las células tumorales, siempre fueron inferiores a las obtenidas por el extracto polisacárido filtrado (fenómeno que se observa más claramente a altas concentraciones de extracto polisacárido). De acuerdo a lo señalado por Adachi *et al*, (1990a y 1990b), este fenómeno se debe a que los polisacáridos de mayor peso

molecular son retenidos en el filtro, por lo tanto, la fracción con el peso molecular más alto siempre exhibe una mayor actividad antitumoral. Por tal motivo, se procedió a utilizar el extracto polisacárido no filtrado de *A. aegerita* y *H. erinaceum* para la realización de los ensayos posteriores de inhibición de la proliferación celular.

En China, Kim *et al*, (2007), comunicaron que el tratamiento combinado de un extracto de triterpenos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* y el extracto polisacárido de la planta *Duchesnea chrysantha*, causó un efecto sinérgico sobre la leucemia HL-60, induciendo una disminución significativa de las células tumorales de manera dosis y tiempo dependiente. En base a estos antecedentes, se observó el efecto combinado de polisacáridos aislados desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum* sobre las células tumorales N2A y JURKAT T. Se observa que la combinación de ambos extractos induce una disminución de las células N2A y JURKAT T de manera dosis-dependiente a las 24 h de incubación, sin embargo, la acción combinada de ambos extractos no presentó un aumento del efecto antiproliferativo sobre las células tumorales N2A y JURKAT T, con respecto al efecto de cada extracto en forma separada.

Es importante destacar que el efecto inhibitorio de la proliferación celular presentado por los polisacáridos obtenidos desde el micelio de *A. aegerita* y *H. erinaceum*, se presenta sobre dos líneas celulares tumorales que difieren en su origen tumoral, tal como es el caso de la línea celular N2A que corresponde a un tumor sólido que se origina en el SNS y la línea celular JURKAT T que corresponde a una neoplasia de origen hematopoyético, por lo tanto, la actividad antiproliferativa presentada por estos metabolitos no es específica a un tejido tumoral. Estos resultados concuerdan con los expuestos por Jiménez *et al*, (2008), quienes señalan que PSK presentó un efecto inhibitorio de la proliferación celular de manera no específica a un tejido tumoral, ejemplo de aquello es la actividad antiproliferativa presentada sobre las siguientes líneas celulares tumorales: Hela (cervicouterino), AGS (gástrico), A549 (pulmón), B16 (melanoma murino), B9 (fibrosarcoma) y ANDO2 (melanoma humano).

Muchos son los blancos biológicos mediante los cuales los fármacos pueden afectar el crecimiento celular. Por este motivo, los resultados obtenidos llevan a pensar varias posibilidades de mecanismo de acción para estos principios activos, tales como: la intervención mediante intercalación de los compuestos sobre el material genético de la

célula; un efecto sobre la capacidad metabólica de la célula afectando principalmente el funcionamiento mitocondrial; activación de los receptores de muerte celular (TRAIL, TNF o Fas) activando la vía extrínseca de inducción de apoptosis; activación de la caspasa efectora 3 provocando la condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de los sustratos; bloqueo de la biosíntesis de macromoléculas vitales para la célula; producción de especies reactivas (ROS) que generarían un proceso apoptótico; despolarización de la mitocondria; o inhibición de mediadores celulares que forman parte del mismo metabolismo celular, son algunas posibles respuestas a la actividad antitumoral presentada por estos metabolitos sobre las células tumorales.

El ensayo de inhibición de la proliferación celular fue prioritario y fundamental para el desarrollo y proyección de este estudio, ya que de no obtener resultados acordes a una disminución de las células tumorales JURKAT T y N2A, esto habría significado la finalización de cualquier otro experimento. De tal modo, los auspiciosos resultados obtenidos en esta investigación, abren un amplio abanico de posibilidades para el análisis y estudio de estos metabolitos, con el objetivo de poder entender y comprender mejor el mecanismo por el cual estos principios activos inhiben la proliferación de las células tumorales, y con ello, definir el potencial uso de estos compuestos como terapia complementaria en el tratamiento del cáncer.

La proyección clínica que presentan los polisacáridos antitumorales aislados de hongos en la terapia clínica del cáncer, se encuentra dirigida básicamente hacia la investigación y desarrollo de las siguientes actividades:

1. Potenciales agentes quimioterapéuticos, ya que emergen como uno de los medios posibles para inhibir el crecimiento tumoral sin dañar las células huésped.
2. Potenciales agentes coadyuvantes a fármacos quimioterapéuticos. Los auspiciosos resultados citados en la literatura obtenidos con otros polisacáridos fúngicos en los ensayos preclínicos y clínicos, han demostrado el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes y el aumento de la tolerancia a los protocolos de la quimioterapia y radioterapia, disminuyendo sus efectos adversos.

3. Las propiedades quimiopreventivas que presentan estos metabolitos, convierten a los hongos comestibles en potenciales alimentos funcionales, que pueden ser utilizados en la dieta diaria como suplementos dietéticos, extractos concentrados o consumidos en forma fresca, con el objetivo de impedir o revertir la tumorigénesis, evitando el desarrollo de una neoplasia maligna invasora.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados y discutidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Los polisacáridos extraídos desde el micelio de *Agrocybe aegerita* y *Heridium erinaceum* inducen *in vitro* una disminución de la proliferación de células tumorales JURKAT T y N2A de manera dosis-dependiente ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$).
- La actividad antiproliferativa de los extractos polisacáridos obtenidos de *H. erinaceum* y *A. aegerita* no es específica a un tipo de tejido tumoral y se determinó una mayor actividad antiproliferativa del extracto de *H. erinaceum* comparado con el de *A. aegerita* sobre células tumorales JURKAT T y N2A a diferentes tiempos de incubación.
- La actividad antiproliferativa sobre células tumorales JURKAT T y N2A de los extractos polisacáridos no filtrados obtenidos de *H. erinaceum* y *A. aegerita* fue mayor a la determinada por estos mismos extractos pero filtrados y no se determinó un efecto sinérgico de la combinación de los polisacáridos sobre las líneas celulares antes señaladas.

De acuerdo a lo expuesto la hipótesis es aceptada.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. & Yadomae, T. (1990a) Change of biological activities of (1→3)-beta-D-glucan from *Grifola frondosa* upon molecular weight reduction by heat treatment. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 477-481.
- Adachi, Y., Ohno, N., Yadomae, T., Susuki, I., Ohsawa, M. & Oikawa, S. (1990b) Thermal denaturation of (1→3)-β-D-glucans in neutral aqueous solution above 130°: effect on physicochemical properties. *Carbohydrate Research*, 198, 111-122.
- Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. (1965) *The Fungi. An Advanced Treatise. Vol. I. The fungal cell.* New York: Academic Press, New York. 748 pp.
- Bree, R. T., Stenson-Cox, C., Grealy, M., Byrnes, L., Gorman, A. M. & Samali, A. (2002) Cellular longevity: role of apoptosis and replicate senescence. *Biogerontology*, 3, 195-206.
- Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L. & Mansur, M. (1998) Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Micol.*, 15, 69-74.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. & Kroemer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825- 2837.
- Castro, S. L. (2006) Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de Javeriana, Colombia. 67 pp.
- Chabner, B. A. & Longo, D. L. (2001) *Cancer chemotherapy and biotherapy: principales and practice.* 3ª. Ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia. 1152 pp.
- Chen, Y. Y. & Chang, H. M. (2004) Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from Fu-Ling (*Poria cocos*) on human leukemic U937 and HL-60 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 759-769.

- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. & Fumiko, F. (1969) Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Nature*, 222, 687-688.
- Chihara, G. (1992) Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defense potentiator. *International Journal of Oriental Medicine*, 17, 57-77.
- Collins, K., Jacks, T. & Pavletich, N. P. (1997) The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 2776-2778.
- Coqueret, O. (2002) Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 299, 35-55.
- Cousin, F., Baldassini, S. & Bouchany, D. (2000) Expression of the pro-apoptotic caspase 3/CPP32 in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *J. Cutan. Pathol.*, 27, 235-241.
- Cui, F. J., Li, Y., Xu, Y. Y., Liu, Z. Q., Huang, D. M., Zhang, Z. C. & Tao, W. Y. (2007) Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Toxicology in vitro*, 21, 417-427.
- Daba, A. S. & Ezeronye, O. U. (2003) Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2, 672-678.
- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S., Wood, W. B. & McCarty, M. (1978) Tratado de Microbiología. 2ª Ed. Salvat Editores, S. A. Barcelona, España. pp. 908-1001.
- Díaz, S. & Wolfe, H. (1995) Apoptosis: de la morfología a los mecanismos. *Revista Española de Patología*, 28, 255-257.
- Dinezot, F. & Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. *J. Immunol. Meth.*, 89, 271-277.
- Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., DeWitt, D. L. & Nair, M. G. (2008) Health-beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Food Chemistry*, 108, 97-102.

- Elliott, M. J., Murphy, K. M., Stribinskiene, L., Ranganathan, V., Sturges, E., Farnsworth, M. L. & Lock, R. B. (1999) Bcl-2 inhibits early apoptotic events and reveals post-mitotic multinucleation without affecting cell cycle arrest in human epithelial tumor cells exposed to etoposide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 44, 1-11.
- Ferrari, M., Fornasiero, M. C. & Isetta, A. M. (1990) MTT colorimetric assays for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *Journal of Immunological Methods*, 131, 165-172.
- Franz, G. (1989) Polysaccharides in Pharmacy: Current applications and future concepts. *Planta Medica*, 55, 493-497.
- Fujiwara, M., Egashira, N. & Mishima, K. (2006) Utility and function of mushrooms neuroprotective effect of *Hericium erinaceum*. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 211, 141-147.
- Fullerton, S. A., Samadi, A. A., Tortorelis, D. G., Choudhury, M. S., Mallouh, C., Tazaki, H. & Konno, S. (2000) Induction of apoptosis in human prostate cancer cells with β -glucan (Maitake mushroom polysaccharide). *Molecular Urology*, 4, 7-13.
- Furue, H., Itoh, I., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T., Ogawa, N. & Taguchi, T. (1981) Phase III study on Lentinan. *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy*, 8, 944-960.
- Giovannini, I. (2006) Cultivated Basidiomycetes as a source of new products: - *in vitro* cultivation development, - selection of strains resistant to *Trichoderma viride*, - search for new active compounds, - factors influencing plasticity in *Grifola frondosa*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Neuchatel, Suiza. 210 pp.
- Haldar, S., Basu, A. & Croce, C. M. (1997). Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.*, 57, 229-233.
- Hattori, T. S., Komatsu, N., Schichijo, S. & Itoh, K. (2004) Protein-bound polysaccharides K induced apoptosis of the human Burkitt lymphoma cell line, Namalwa. *Biomed. Pharmacother.*, 58, 226-230.

- Hobbs, C. (1996) *Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture*. Ed. Miovic: Botanica Press, Santa Cruz. 252 pp.
- Hongos Comestibles Cultivados en Chile-UACH. <http://www.hongoschile.cl/>. (Página revisada 23-06-2008).
- Huang, X., Tran, T., Zhang, L., Hatcher, R. & Zhang, P. (2005) DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 1065-1070.
- Ikeda, H., Chamoto, K., Tsuji, T., Suzuki, Y., Wakita, D., Takeshima, T. & Nishimura, T. (2004) The critical role of TLR-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci.*, 94, 697-703.
- Ikekawa, T. (2001) Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. *International Journal Medical Mushrooms*, 3, 291-298.
- Isolabella, P. (2005) Efecto de drogas citotóxicas sobre células HEP-2 y U-937. Tesis, Escuela de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Belgrano, Argentina. 36 pp.
- Ito, H., Hidaka, H. & Sugiura, M. (1979) Effects of Coriolan, an antitumor polysaccharide, produced by *Coriolus versicolor* Iwade. *Jap. J. Pharmacol.*, 29, 953-957.
- Jiménez, E. M. (2006) Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de caléndula: propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas. Tesis doctoral, Facultad de Medicina. Universidad de Granada, España. 184 pp.
- Jiménez, E., Berruguilla, E., Romero, I., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F. & Garcia, A. (2008) The immunomodulator PSK induces *in vitro* cytotoxic activity in tumour cell lines *via* arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer*, 8, 1-11.
- Jong, S. C., Birmingham, J. M. & Pai, S. H. (1991) Immunomodulatory substances of fungal origin. EOS-J. *The Journal of Immunology and Immunopharmacology*, 11, 115-122.
- Kaul, T. N. (1981) Common edible mushrooms of Jammu and Kashmir. *Mushroom Science*, 11, 79-82.

- Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. & Nakamura, T. (1990) Formulation of a potent antitumor (1-6)-beta-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, 12, 393-404.
- Kawagishi, H., Mori, H., Uno, A., Kimura, A. & Chiba, S. (1994) A sialic acid-binding lectin from the mushroom *Hericium erinaceum*. *FEBS letters*, 340, 56-58.
- Kerr, J., Winterford, C. & Harmon, B. (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-2026.
- Kidd, P. M. (2000) The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy. *Alternative Medicine Review*, 5, 4-27.
- Kiho, T., Sobue, S. & Udai, S. (1994) Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*. *Carbohydr. Res.*, 3, 81-87.
- Kim, D. M., Pyun, C. W., Ko, H. G. & Park, W. M. (2000) Isolation of antimicrobial substances from *Hericium erinaceum*. *Mycobiology*, 28, 33-38.
- Kim, K. C., Kim, J. S., Son, J. K. & Kim, I. G. (2007) Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells by the *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts. *Cancer Letters*, 246, 210-217.
- Kobayashi, H., Matsunaga, K. & Fujii, M. (1993) PSK as a chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2, 271-276.
- Kobayashi, H., Matsunaga, K. & Oguchi, Y. (1995) Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 4, 275-281.
- Kofschoten, G. M., Hulscher, T. M., Duyndam, M. C., Pinedo, H. M. & Boven, E. (2002). Variation in the kinetics of caspase-3 activation, bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochem. Pharmacol.*, 63, 733-743.
- Kurashiga, S., Akuzawa, Y. & Endo, F. (1997) Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration in cancer outbreaks and

activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N-butamolinitrosoamine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 19, 175-183.

- Kuwahara, S., Morihiro, E., Nemoto, A. & Hiramatsu, A. (1992) Synthesis and absolute configuration of a cytotoxic fatty acid isolated from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 1417-1419.
- Li, G., Kim, D. H., Kim, T. D., Park, B. J., Park, H. D., Park, J. I., Na, M. K., Kim, H. C., Hong, N. D., Lim, K., Hwang, B. D. & Yoon, W. H. (2004) Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cell. *Cancer Letters*, 216, 175-181.
- Lin, X., Cai, Y. J., Li, Z. X., Liu, Z. L., Yin, S. F. & Zhao, J. C. (2001) *Cladonia furcata* polysaccharide induced apoptosis in human leukemia K562 cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22, 716-720.
- Lin, X., Cai, Y., Li, Z., Chen, Q., Liu, Z. & Wang, R. (2003) Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CEP-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1622, 99-108.
- Liu, C. P., Fang, J. N. & Xiao, X. Q. (2002) Structural characterization and biological activities of SC4, an acidic polysaccharide from *Salvia chinensis*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23, 162-166.
- Lowe, S., Ruley, H., Jacks, T. & Housman, D. E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74, 957-967.
- Mansilla, S. (2005) Análisis de la expresión génica y de los mecanismos de muerte celular inducidos por la Bisantraciclina WP631 en células tumorales humanas. Tesis doctoral, Facultad de Biología. Universidad de Barcelona, España. 289 pp. http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0915105-090353//5.Discusi%F3n.pdf. (Página revisada 14-05-2008).
- Mau, J. L., Lin, H. C. & Song, S. F. (2002) Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*, 35, 519-526.

- Mizuno, T., Wasa, T., Ito, H., Suzuki, T. & Ukai, N. (1992) Antitumor active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, and edible, and medicinal mushroom called yamabushitake or Houtou. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 347-348.
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T. & Kawagishi, H. (1995a) Antitumor active substances from mushrooms. *Food Review International*, 11, 23-61.
- Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T. & Li, J. (1995b) Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*, 11, 151-166.
- Mizuno, T. (1995c) Yamabushitake, *Hericium erinaceus*: bioactive substances and medicinal utilization. *Food Review International*, 11, 173-178.
- Mizuno, T. (1999a) Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 105-119.
- Mizuno, T. (1999b) The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 9-29. http://www.icnet.uk/labs/med_mush/final_pdfs/chapt5.pdf. (Página revisada 10-04-2008).
- Montaner, B. R. (2000) Caracterización y purificación de un principio activo de origen bacteriano con actividad antitumoral. Tesis doctoral en Farmacia, Facultad de Biología. Universidad de Barcelona, España. 250 pp.
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S. & Hedjaroude, G. A. (2007) Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, 7, 701-724.
- Morgan, S. J. & Darling, D. C. (1995) Cultivo de células animales. Editorial Acribia, Zaragoza. 159 pp.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

- Nagorcen, D., Scheibengogen, C., Marincola, F. M., Lestch, A. & Keilholz, U. (2003) Natural T cell immunity against cancer. *Clinical Cancer Research*, 9, 4296-4303.
- Nakano, H., Nanatame, K., Nemoto, H., Motohashi, H., Nishiyama, K. & Kumada, K. (1999) A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Hepato-Gastroenterology*, 46, 2662-2668.
- Nanba, H. & Kuroda, H. (1987) Antitumour mechanisms of orally administered Shiitake fruit-bodies. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 2459-2464.
- Navarro, M. E. (2005) Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea. Tesis doctoral, Facultad de Ingeniería. Universidad Politécnica de Cataluña, España. 295 pp.
- Ooi, V. E. & Liu, F. (2000) Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715-729.
- Perales, S. (2005) Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, España. 263 pp.
- Peralta, O., Bahena, M., Díaz, C. E. & Madrid, V. (1997) Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*, 39, 451-462. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/106/10639508.pdf>. (Página revisada 11-10-2007).
- Poutsiaka, D. D., Mengozzi, M., Vannier, E., Sinha, B. & Dinarello, C. A. (2003) Cross-linking of the β -glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. *Blood*, 82, 3695-3700.
- Prieto, A. (1992) Polisacáridos de *Talaromyces*: Su aplicación en Quimiotaxonomía. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, España. 149 pp.

- Ren, D. L., Wang, J. Z., Noda, H., Amano, H. & Ogawa, S. (1995) The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumors and immune activities in mice. *Planta Medica*, 61, 120-125.
- Smits, V. A. & Medema, R. H. (2001) Checking out the G(2)/M transition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1519, 1-12.
- Sone, Y., Isoda-johmura, M. & Kasaki, A. (1996) Isolation and chemical characterization of polysaccharides from Iwatake, *Gyrophora esculenta* Miyoshi. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 213-215.
- Stamets, P. (1993) Growing gourmets and medicinal mushrooms. Ed. Ten Speed Press, Berkeley, CA. 551 pp.
- Thompson, C. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.
- Torrá, S. M. (2006) Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides. Tesis doctoral, Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona, España. 221 pp.
- Trease, G. E. & Evans, W. C. (1991) Tratado de Farmacognosia. 13^a. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México. pp. 692-714.
- Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.*, 31, 214-223. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>. (Página revisada 10-12-2007).
- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell*, 96, 245-254.
- Vetcher, D. L. (2003). Drogas antimetabólicas en Cardiología Intervencionista. El comienzo del éxito en la resolución de la restenosis. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.*, 32, 406-410.
- Von Bernhardi, R. (2004) Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Rev. Chil. Neuro-psiquiatr.*, 42, 281-292. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92272004000400005&script=sci_arttext. (Página revisada 15-03-2008).

- Wasser, S. P. & Weis, A. L. (1999) Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycete mushrooms: current perspectives (review). *International Journal Medicinal Mushrooms*, 1, 31-62. http://www.icnet.uk/labs/med_mush/final_pdfs/chapt5.pdf. (Página revisada 10-04-2008).
- Whistler, R. L., Bushway, A. A., Singh, P. P., Nakahara, W. & Tokuzen, R. (1976) Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32, 235-275.
- Yoshida, I., Kiho, T., Usui, S., Sakushima, M. & Ukai, S. (1996) Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1→3)- α -D-glucans extracted from the fruit bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 114-121.
- Zambrano, A., Otth, C., Mujica, L., Concha, I. I. & Maccioni, R. B. (2007) Interleukin-3 prevents neuronal death induced by amyloid peptide. *BMC Neuroscience*, 8, 1-11.
- Zhang, Y., Mills, G. L. & Nair, M. G. (2003) Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*, 10, 386-390.
- Zhang, C. X. & Huang, K. X. (2006) Mechanism of apoptosis induced by a polysaccharide, from the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (MAP) in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 210, 236-245.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. & Wang, Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 4-19.

ABREVIATURAS

A⁰: Absorbancia

A549: Línea celular tumoral que corresponde a un adenocarcinoma de pulmón humano

AG-HN1: Glucano de alto peso molecular aislado desde el extracto acuoso de *A. aegerita*

AG-HN2: Heteroglucano de bajo peso molecular aislado desde el extracto acuoso de *A. aegerita*

AGS: Línea celular tumoral que corresponde a un adenocarcinoma gástrico humano

AIF: Factor inductor de apoptosis

ANDO2: Línea celular tumoral que corresponde a un melanoma humano

ATCC: Colección Americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*)

B9: Línea celular tumoral que corresponde a un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno

B16: Línea celular tumoral que corresponde a un melanoma murino

BL: Linfocitos B

BNN: N-butil-N-butanolnitrosamina, sustancia química inductora de cáncer de vejiga

Ca²⁺: Ión Calcio

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas (*Cyclin dependent kinases*)

ciclina D1: Proteína que controla el ciclo celular, permitiendo la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular

Cit: Citocromo

cm: Centímetro

cm²: Centímetro cuadrado

CM: Caldo malta

CO₂: Dióxido de carbono

CSF: Factor estimulador de colonia

CTL: Linfocitos T citotóxicos

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco, alto en glucosa con L-glutamina y 110 mg de piruvato sódico

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EtOH: Etanol

Fas: Receptor de muerte celular

FasL: Ligando de Fas

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

g: Gramos

G₂/M: Segundo punto de control (*checkpoint*) del ciclo celular que se encuentra a la entrada de la mitosis, la célula detiene la progresión en el ciclo si la replicación está incompleta o si el DNA está dañado

h: Horas

Hela: Línea celular tumoral que corresponde a un adenocarcinoma cervicouterino humano

HL-60: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia promielocítica humana

Hz: Hertz

IAP: Inhibidor de apoptosis

IC₅₀: Concentración que inhibe la proliferación celular en un 50%

IL: Interleuquina

JURKAT T: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana

KCl: Cloruro de potasio

KH₂PO₄: Fosfato monobásico de potasio

L: Litro

Lentinano: Polisacárido β-D-glucano aislado de *Lentinus edodes*

M: Molar

Mac: Macrófagos

MAF: Factor activador de macrófagos

MCF-7: Línea celular tumoral que corresponde a un cáncer de glándula mamaria humana

mg: Miligramos

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mm: Milímetro

MTT: Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Nº: Número

N2A: Línea celular tumoral que corresponde a un neuroblastoma de ratón

NaCl: Cloruro de sodio

Na₂HPO₄: Fosfato disódico

Namalwa: Línea celular tumoral que corresponde a un linfoma de Burkitt humano

NF-κB: Factor nuclear de locus kappa de las inmunoglobulinas en células B (*Nuclear factor-kappa B*)

NK: Células natural killer

nm: Nanómetro

N-myc: Oncogén similar a *myc* aislado de un neuroblastoma

p21: Proteína inhibidora de la actividad de fosforilación de los complejos ciclina/CDK

p53: Proteína antioncogénica, supresora de tumores, que desempeña un papel importante en la apoptosis y control del ciclo celular

PBS: Tampón fosfato salino de Dulbecco, sin calcio ni magnesio (*Phosphate buffered saline*)

PC-TL: Linfocitos T precitotóxicos

PSK y PSP: Complejos de polisacárido-proteína aislados desde el micelio de *Coriolus versicolor*

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*)

rpm: Revoluciones por minuto

RPMI 1640: Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión

SD: Desviación estándar (*Standard deviation*)

SDS: Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

SNS: Sistema Nervioso Simpático

tBid: Bid truncado

TL (H): Linfocitos T helper

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*)

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (*TNF-Related apoptosis-inducing ligand*)

UV: Ultravioleta

µg: Microgramos

µm: Micrometros

GLOSARIO

Alimentos funcionales: Son aquellos alimentos que en forma natural o procesada, contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición básica.

Antiproliferativo: Sustancia química que impide el crecimiento y división celular.

Caspasa: Familia de proteasas citoplasmáticas específicas de aspartato, que han sido identificadas como reguladores claves en la transducción y ejecución de la señal apoptótica.

Citostático: Sustancia química que ejerce control en la regulación y expresión de las proteínas moduladoras del ciclo celular. Detienen la división celular en un estadio temprano del ciclo celular, controlando la proliferación celular.

Citotóxico: Sustancia química dañina para las células, lo cual significa que suprime las funciones de la célula o le provoca la muerte.

Cuerpo fructífero: Estructura multicelular especializada y diferenciada en la que se forman las esporas.

Leucemia linfoblástica aguda de tipo T: Tipo de leucemia en la que se encuentran demasiados linfoblastos (glóbulos blancos inmaduros) de células T en la sangre y médula ósea.

Línea celular: Células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado a vivir en cultivo, poseen capacidad de proliferación ilimitada, debido a que han sufrido un proceso de transformación, que implica la alteración de las características de crecimiento.

Metástasis: Diseminación de las células cancerosas a órganos distantes de una infección o un tumor primario maligno o cáncer, por lo general a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático.

Micelio: Conjunto de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Neurastenia: Neurosis caracterizada por una sensación de agotamiento físico y mental.

Neuroblastoma: Tumor maligno frecuente en la infancia, originado en las células de la cresta neural en el Sistema Nervioso Periférico Simpático.

Oncogénesis: Secuencia de cambios citológicos, genéticos y celulares que culminan en la transformación de una célula normal en otra cancerosa.

Quimioheterótrofo: Microorganismo que utiliza sustancias químicas como fuente de energía y sustancias orgánicas como fuente de carbono.

Quimioprevención: Utilización de sustancias químicas para prevenir la aparición de una enfermedad. También se conoce como quimioprofilaxis.

Quimioterapéutico: Medicamento utilizado para tratar el cáncer.

Receptores de muerte celular: Proteínas extracelulares que forman parte de la superfamilia del TNF-R, cuyos miembros participan en procesos como la proliferación, diferenciación, regulación de la respuesta inmunológica, expresión de genes y también en la supervivencia y muerte celular.

Saprófito: Microorganismo que emplea la materia orgánica producida por otros seres vivos como fuente de materia y energía.

Terapia coadyuvante: Tratamiento que acompaña a uno previo considerado principal, con el fin de aumentar las posibilidades de curación.

Tumorigénesis: Origen y formación de un tumor canceroso, a través de la proliferación incontrolada de células.

ANEXOS

ANEXO 1. FIGURAS

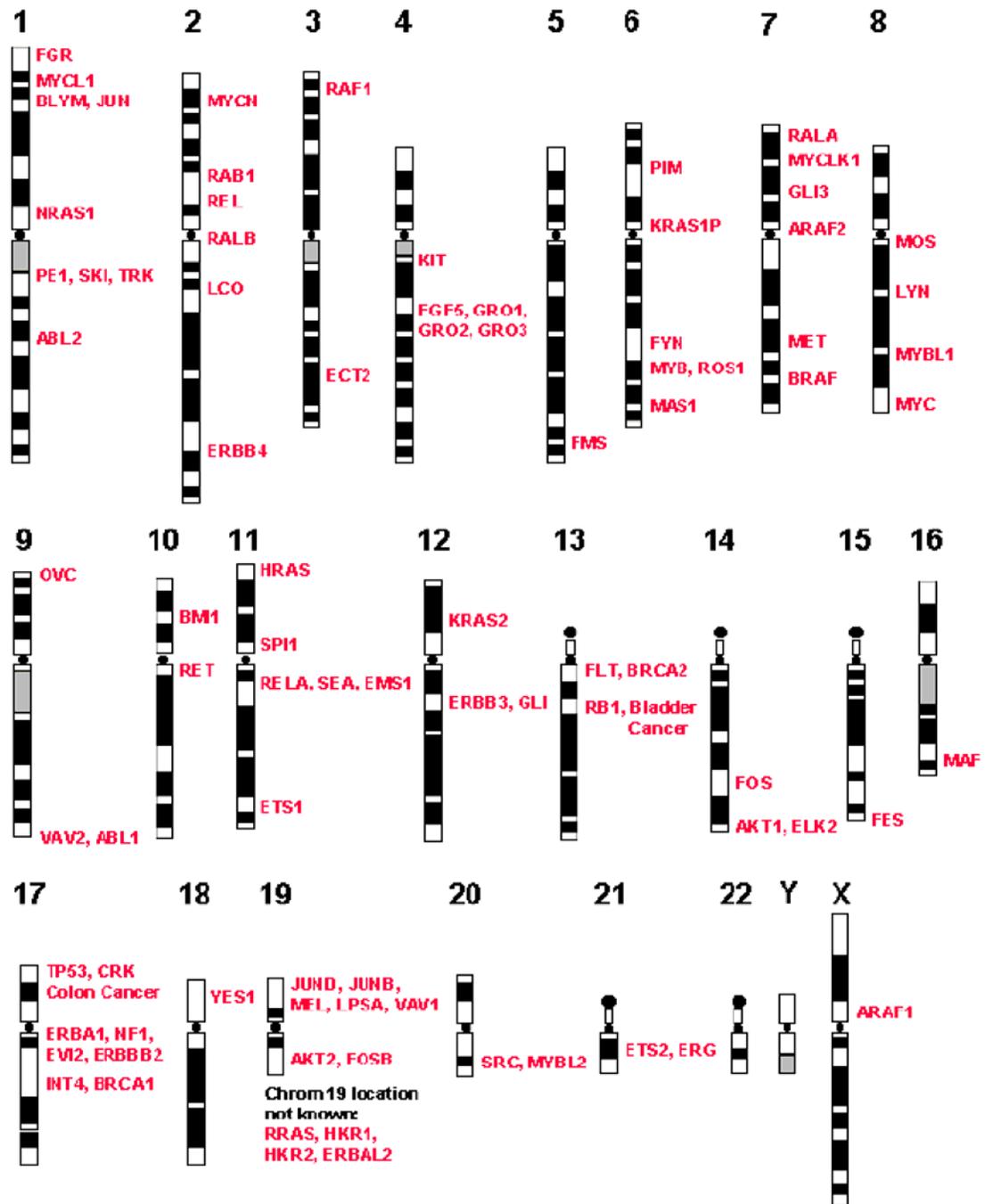


Figura 1. Localización cromosómica de los diferentes proto-oncogenes y genes supresores de tumores mapeados hasta la fecha. Tomado de Mansilla, (2005).

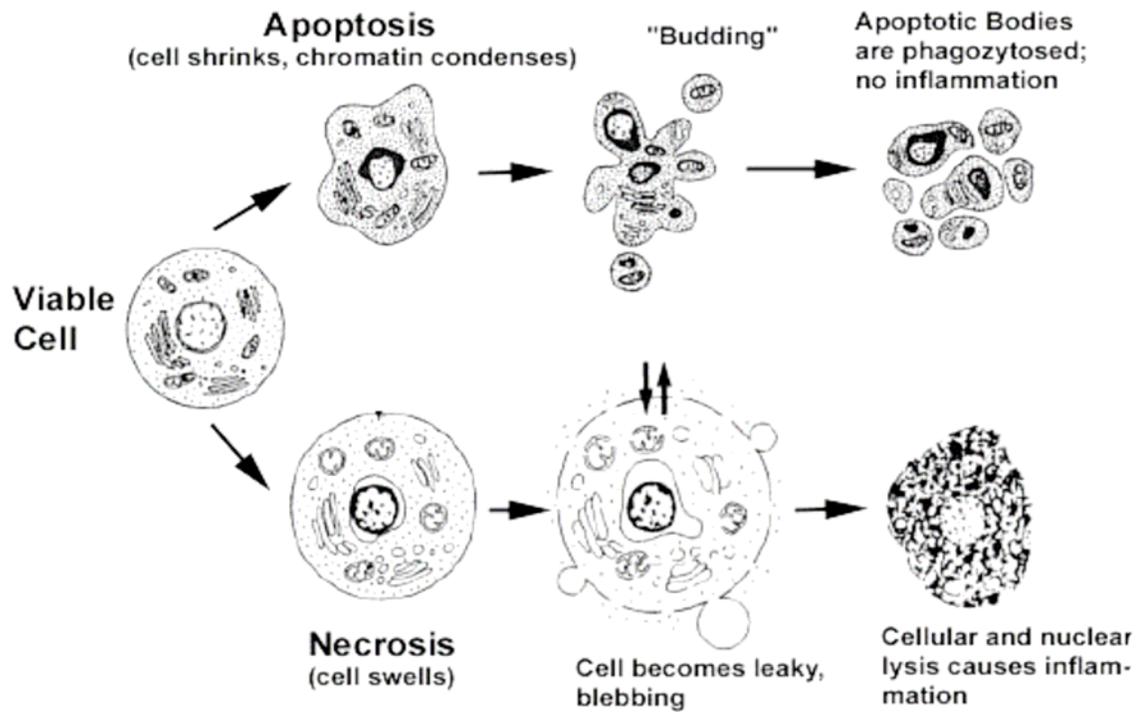


Figura 2. Diferencias morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis. Tomado de Van Cruchten & Van Den Broeck, (2002).

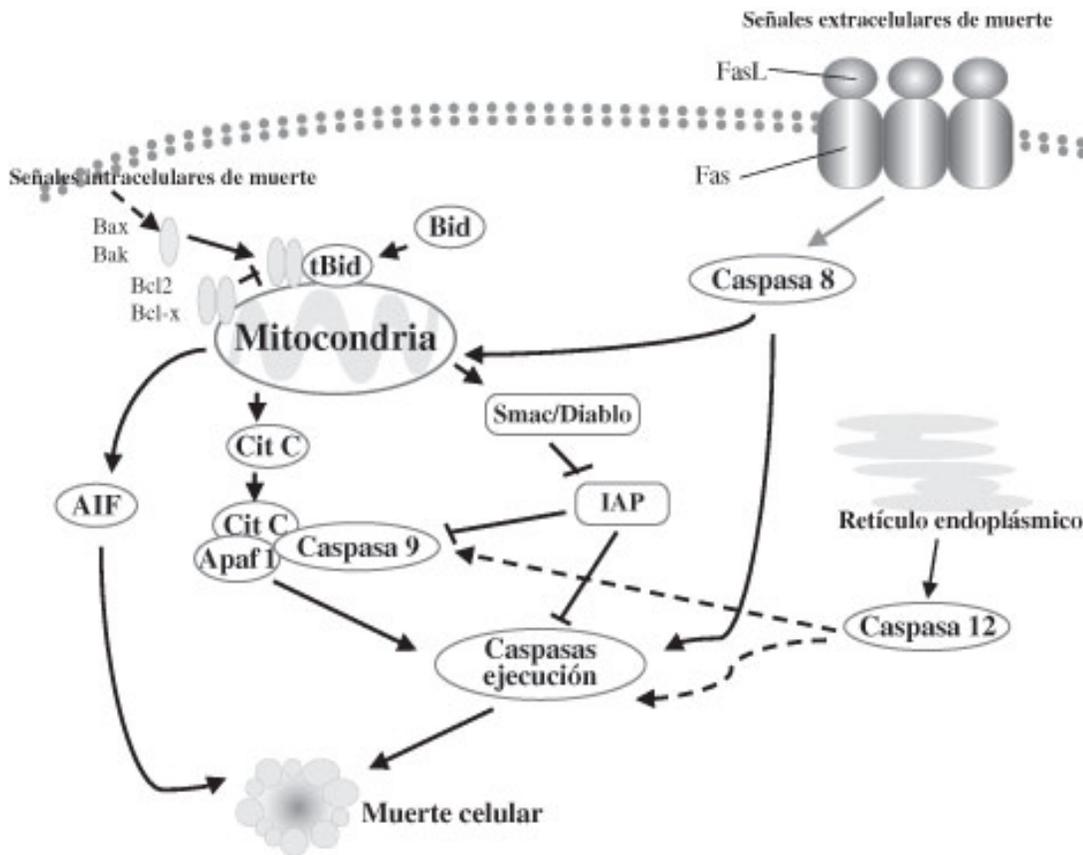


Figura 3. Vías de inducción de apoptosis. Señales extracelulares a través de los receptores de muerte celular, tales como Fas, y señales intracelulares, incluyendo el daño a constituyentes subcelulares o estrés del retículo endoplásmico, gatillan vías de muerte celular genéticamente programadas. Las dos vías pro-apoptóticas indicadas, convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, las cuales marcan el punto sin retorno de la cascada, la que finaliza con la muerte de la célula. **AIF**, factor inductor de apoptosis; **Cit C**, Citocromo, **FasL**, ligando de Fas, **IAP**, inhibidor de apoptosis, **tBid**, Bid truncado. Tomado de Von Bernhardt, (2004).

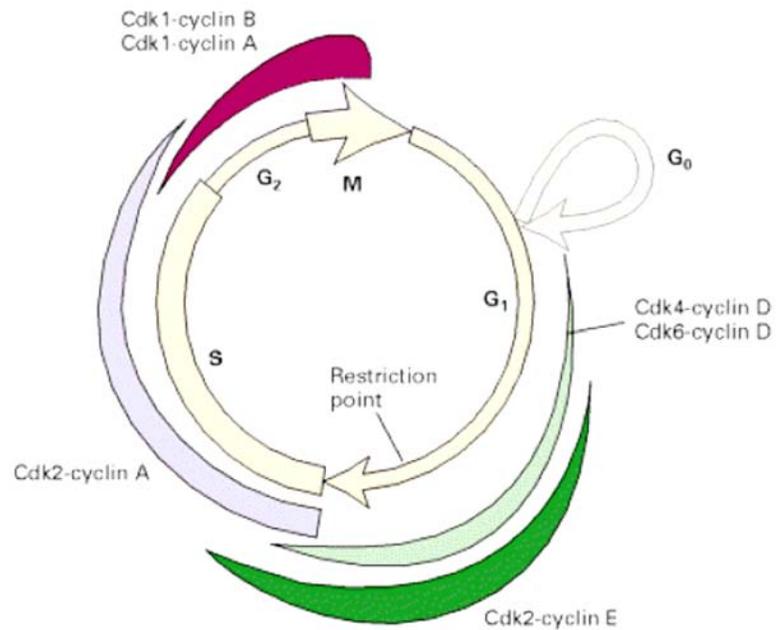


Figura 4. Fases del ciclo celular y activación secuencial de los diferentes complejos CDK/ciclina a lo largo de la progresión del ciclo celular. Tomado de Mansilla, (2005).

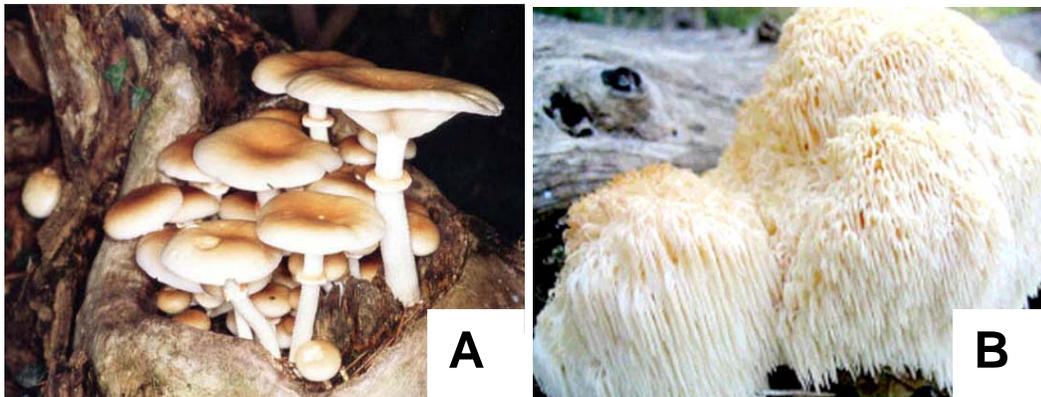


Figura 5. Hongos utilizados en el presente trabajo: A = *Agrocybe aegerita* y B = *Herichium erinaceum*. Fuente: www.hongoschile.cl.

ANEXO 2. TABLAS

Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Agrocybe aegerita*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24 horas de incubación. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Concentración (µg/mL)	Extracto no filtrado		Extracto filtrado	
	A _{540 nm} N2A	A _{540 nm} JURKAT T	A _{540 nm} N2A	A _{540 nm} JURKAT T
0	1,152	1,106	1,254	1,058
25	1,000	1,013	1,156	0,975
50	0,980	0,971	1,106	0,931
100	0,976	0,916	1,093	0,918
150	0,925	0,918	1,063	0,887
200	0,847	0,841	1,028	0,859
250	0,781	0,741	1,007	0,834
500	0,755	0,693	0,935	0,772
750	0,688	0,645	0,918	0,717
1000	0,614	0,581	0,777	0,686
2000	0,539	0,518	0,690	0,567
2500	0,492	0,462	0,609	0,504

A_{540 nm}: Absorbancia determinada a una longitud de onda de 540 nm.

JURKAT T: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana.

N2A: Línea celular tumoral que corresponde a un neuroblastoma de ratón.

Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido filtrado y no filtrado de *Hericium erinaceum*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24 horas de incubación. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Extracto no filtrado		Extracto filtrado	
	$A_{540\text{ nm}}$ N2A	$A_{540\text{ nm}}$ JURKAT T	$A_{540\text{ nm}}$ N2A	$A_{540\text{ nm}}$ JURKAT T
0	1,078	1,017	1,106	1,144
25	0,972	0,898	1,020	1,055
50	0,952	0,873	0,980	1,014
100	0,925	0,836	0,966	0,999
150	0,866	0,791	0,911	0,899
200	0,838	0,778	0,887	0,890
250	0,661	0,592	0,739	0,787
500	0,550	0,512	0,641	0,675
750	0,323	0,323	0,546	0,572
1000	0,270	0,270	0,414	0,458
2000	0,226	0,214	0,334	0,375
2500	0,203	0,165	0,314	0,332

$A_{540\text{ nm}}$: Absorbancia determinada a una longitud de onda de 540 nm.

JURKAT T: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana.

N2A: Línea celular tumoral que corresponde a un neuroblastoma de ratón.

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido de *Agrocybe aegerita*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24, 48 y 72 horas de incubación. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Concentración (µg/mL)	A _{540 nm} 24 h		A _{540 nm} 48 h		A _{540 nm} 72 h	
	N2A	JURKAT T	N2A	JURKAT T	N2A	JURKAT T
0	1,231	1,149	1,152	1,030	1,009	1,006
25	1,082	1,082	1,037	0,884	0,847	0,863
50	1,056	1,046	0,984	0,847	0,830	0,817
100	1,028	1,010	0,956	0,787	0,797	0,773
150	0,985	0,986	0,916	0,764	0,710	0,760
200	0,969	0,931	0,890	0,713	0,702	0,702
250	0,884	0,865	0,839	0,660	0,600	0,622
500	0,805	0,833	0,804	0,616	0,547	0,581
750	0,755	0,796	0,721	0,604	0,474	0,505
1000	0,742	0,693	0,660	0,564	0,434	0,448
2000	0,697	0,607	0,590	0,466	0,353	0,382
2500	0,601	0,540	0,461	0,385	0,270	0,292

A_{540 nm}: Absorbancia determinada a una longitud de onda de 540 nm.

JURKAT T: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana.

N2A: Línea celular tumoral que corresponde a un neuroblastoma de ratón.

Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido de *Hericium erinaceum*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24, 48 y 72 horas de incubación. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Concentración (µg/mL)	A _{540 nm} 24 h		A _{540 nm} 48 h		A _{540 nm} 72 h	
	N2A	JURKAT T	N2A	JURKAT T	N2A	JURKAT T
0	1,066	1,616	0,996	1,611	0,962	1,591
25	0,989	1,411	0,797	1,229	0,807	1,266
50	0,966	1,356	0,695	1,124	0,769	1,142
100	0,931	1,277	0,650	1,052	0,739	1,042
150	0,894	1,228	0,606	0,979	0,698	0,996
200	0,842	1,128	0,580	0,897	0,608	0,948
250	0,643	0,950	0,505	0,817	0,562	0,808
500	0,531	0,811	0,321	0,519	0,485	0,614
750	0,357	0,643	0,277	0,448	0,346	0,452
1000	0,302	0,520	0,229	0,371	0,246	0,283
2000	0,245	0,430	0,139	0,226	0,162	0,162
2500	0,213	0,367	0,112	0,164	0,053	0,092

A_{540 nm}: Absorbancia determinada a una longitud de onda de 540 nm.

JURKAT T: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana.

N2A: Línea celular tumoral que corresponde a un neuroblastoma de ratón.

Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular para el extracto polisacárido combinado de *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum*, sobre las células tumorales N2A y JURKAT T a 24 horas de incubación. Los resultados graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Concentración (µg/mL)	A _{540 nm} N2A	A _{540 nm} JURKAT T
0	1,177	0,934
25	1,077	0,783
50	1,059	0,777
100	0,995	0,738
150	0,979	0,560
200	0,930	0,521
250	0,745	0,486
500	0,521	0,430
750	0,466	0,381
1000	0,415	0,318
2000	0,346	0,235
2500	0,287	0,140

A_{540 nm}: Absorbancia determinada a una longitud de onda de 540 nm.

JURKAT T: Línea celular tumoral que corresponde a una leucemia linfoblástica aguda de tipo T humana.

N2A: Línea celular tumoral que corresponde a un neuroblastoma de ratón.

Tabla 6. Polisacáridos con actividad antitumoral aislados de Basidiomycetes. Tomado de Wasser & Weis, (1999).

Taxa	Fruiting body	Submerged cultured mycelial biomass	Liquid cultured broth
1	2	3	4
Phragmobasidiomycetes			
Auriculariales			
Auriculariaceae			
<i>Auricularia auricula-judae</i> (Bull.) Wettst.	(1-3)- β -glucan	-	-
Tremellales			
Tremellaceae			
<i>Tremella fuciformis</i> Berk.	Glucuronoxylomannan, T-7, T-19 (exopolysaccharides), mannose, xylose, glucuronic acid	Glucuronoxylomannan	Xylose, glucuronic acid, mannose
<i>T. mesenterica</i> Ritz.:Fr.	β -D-glucuronosyl (epitope)	-	-
Homobasidiomycetes			
Aphylophoromycetideae			
Ganodermatales			
Ganodermataceae			
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.:Fr.) P. Karst.	FI-1a (β -glucan), FIII-2b (hetero- β -glucan), acidic heteroglucan, chitin xyloglucan	-	β -glucan
<i>G. applanatum</i> (Pers.) Pat.	FI-1-B-1 (β -glucan)	F-1a-1-b (β -glucan), heteroglucans, peptidoglucans	-
<i>G. tsugae</i> Murr.	Heteroglucan, heterogalactan, β -glucan, glucan	Heteroglucan, α -glucan	-
Polyporales			
Schizophyllaceae			
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.:Fr	-	-	Sonifilan, SPG or Schizophyllan (β -glucan)
Polyporaceae			
<i>Dendropolyporus umbellatus</i> (Pers.:Fr.) Jül.	GU-2, GU-3, GU-4, AP (β -glucan)	-	β -glucan
<i>Grifola frondosa</i> (Dick.:Fr.) S.F. Gray	Grifolan (β -glucan), Fa-1a- β (acidic β -glucan), FIII-2c (hetero- β -glucan), xyloglucan, mannoglucan, fucomannoglucan	Heteroglucan protein, manogalactofucan, heteroxyylan, fucoxyylan, galactomannoglucan	-
<i>Fomes fomentarius</i> (L.:Fr.) Fr.	β -glucan	β -glucan	-
<i>Fomitopsis pinicola</i> (Schw.:Fr.) P. Karst	F-1a-2- β (β -glucan) α -(1-6)-linked	α - and β -glucan	-
<i>Albatrellus confluens</i> (Alb. et Schw.:Fr.) Kottl. et Pouz.	(1-3)- β -D-glucan	(1-3)- β -D-glucan	-
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Lloyd	β -glucan	Coriolan, PSK, Krestin (β -glucan -protein)	-
<i>Lenzites betulinus</i> (L.:Fr.) Fr.	β -glucan	-	-
<i>Wolfiporia cocos</i> (Schw.) Ryv. et Gilbn.	Pachymaran (β -glucan)	-	-
<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.:Fr.) Pers.	β -glucoxyylan, glucoxyylan protein, galactoxyloglucan protein	-	-
<i>Ionotus obliquus</i> (Pers.:Fr.) Bound. et Sing.	Polysaccharide fraction in the Allium-test	-	-

Continuación Tabla 6

Taxa	Fruiting body	Submerged cultured mycelial biomass	Liquid cultured broth
1	2	3	4
Gasteromycetideae,			
Phallaceae			
<i>Dictyophora indusiata</i> Fisch.	T-2 HN (O-acetylated-(1-3)- β -D-mannan), T-3-M ¹ (α -(1-3) linked D-mannan), T3-G, T-4-N, T-5-N (three kinds of β -D-glucans), T-3 Ad (Neutral heterogalactan)	-	-
<i>Phallus impudicus</i> L.:Pers.	PI-2 (glucomannan)	PI-2 (glucomannan)	-
<i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Sing.	Lentinan (β -D-glucans)	KS-2-a-mannan-peptide, LEM, LAP (heteroglucan-protein), EP3	LEM, LAP (heteroglucan-protein), EP3
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr.) Kumm.	Acidic polysaccharide fraction, HA (β -glucan)	-	β -glucan, heteroglucan
<i>P. chitriropileatus</i> Sing.	Heteroglucan, β -glucan-protein, glycoprotein (FI, FII, FIII)	-	-
<i>P. pulmonarius</i> (Fr.:Fr.) Quéf. (=P. sajor-caju Fr.:Fr.)	Xyloglucan, xylanprotein	-	-
Tricholomataceae			
<i>Panellus serotimus</i> (Pers.:Fr.) Kühn.	Heteroglucan, (1-6)- β -d-glucosyl-branched (1(2-3)- β -D-glucans)	-	-
<i>Omphalina epichysium</i> (Pers.:Fr.) Quéf.	EL-2 (β -glucan)	-	-
<i>Fiammulina velutipes</i> (Curt.:Fr.) P. Karst.	EA ₆ , EA ₆ -PII (β -glucan-protein)	Proflamin (glycoprotein)	-
<i>Leucopaxillus giganteus</i> (Fr.) Sing.	Mannoxyloglucan, heteroglucan, glucan, xyloglucan, xylogalacetoglucan, galactoxyloglucan	-	-
<i>Hypsizygus marmoreus</i> (Peck) Bigel.	β -(1-3)-D-glucan	-	-
Agaricaceae			
<i>Agaricus blazei</i> Murr.	FI ₁ ,a- β (β -glucan), FIII2- β (β -glucan-protein), FA-1a- β (hetero- β -glucan), FA-2b- β (RNA), FV-1 (insoluble β -glucan)	ATOM (glucomannan-protein)	AB-FP (mannan-protein)
<i>A. bisporus</i> (J.Lge) Imbach	β -glucan	-	-
Pluteaceae			
<i>Volvariella volvacea</i> (bull.:Fr.) Sing.	VVG (β -1-3)-D-glucans, α -manno- β -glucan	-	-
Strophariaceae			
<i>Pholiota nameko</i> (T. Ito) S. Ito et Imai	Galacto- β -glucan	-	-
Crepidotaceae			
<i>Crepidotus mollis</i> (Schaeff.:Fr.) Kumm.	CPS (β -glucan)	-	-
Bolbitiaceae			
<i>Agrocybe aegerita</i> (Brit.) Sing.	α -(1-3)- β -glucans	-	-

Tabla 7. Polisacáridos utilizados en el tratamiento clínico del cáncer en Japón. Tomado de Mizuno, (1999b).

Name of drug	Krestin	Lentinan	Sonifilan
Abbreviation	PSK	-	SPG
Common Name	Krestin	Lentinan	Schizophyllan
Company	Sankyo, Kureha	Ajinomoto, Yamanouchi, Morishita	Taito, Kaken
Marketed date	May 1977	December 1985	April 1986
Fungus (origin)	<i>Trametes versicolor</i> (mycelium)	<i>Lentinus edodes</i> (fruit body)	<i>Schizophyllum commune</i> (medium product)
Polysaccharide Structure	β -glucan-protein -1,6- branching -1,3: 1,4-main chain	β -glucan -1,6-branching -1,3-main chain	β -glucan β -1,6-branching β -1,3-main chain
MW	100,000	500,000	450,000
Specific rotation	-	+ 14-22° (NaOH)	+ 18-24° (water)
Pharmaceutical	1-g sack	1-mg vial	20-mg ampoule (2 ml)
Price	¥ 1,000	¥ 9,500	¥ 9,500
Dose route	p.o.	i.p., i.v.	i.p., i.v.
Cancer treated	Cancer of digestive organ, lung and breast	Cancer of stomach	Cervical cancer

Tabla 8. Categorías de genes celulares involucrados en el ciclo celular y desarrollo del cáncer. Tomado de Peralta et al., (1997).

Categoría	Gen*	Función	Alteración
I	<i>c-ras, c-myc, c-abl, c-Src, c-fos, c-jun, c-ets</i>	Factores de transcripción y transducción	Aumento de su función
II	<i>p53, Rb, APC1, MPC1, p16, p21, p27, W1</i>	Puntos de control del ciclo celular. Crecimiento y proliferación	Degradación o pérdida de la función
III	A) <i>bcl-2, bax</i> B) <i>p53, c-myc</i> , factores solubles como TNF y FAS	Inhiben apoptosis Inducen apoptosis	Expresión ganancia de la función Degradación o pérdida de la función

* Incluye a proto-oncogenes, oncogenes y genes supresores

ANEXO 3. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL TRATAMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

- Congelación y descongelación de células

Para conservar las líneas celulares durante un largo período de tiempo, se congelan las células en nitrógeno líquido. Este procedimiento se realizó de manera recurrente, con el objetivo de tener, a los menos, 10 crioviales para cada línea celular utilizada en el trabajo. De esta manera se aseguraba que todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo permanecían disponibles en el laboratorio para trabajos posteriores.

Se congelaron, aproximadamente, 3×10^7 - 5×10^7 células en medio de cultivo conteniendo DMSO. El DMSO es un anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células, manteniendo la integridad celular (Mansilla, 2005).

Procedimiento de congelación de células adherentes (N2A)

- Eliminar el medio de cultivo del frasco.
- Lavar las células dos veces con PBS 1x estéril.
- Tratar con tripsina a 37 °C, para desadherir las células del frasco. Se utilizó el volumen de tripsina necesario para cubrir las células (2-3 mL).
- Traspasar la suspensión celular a un tubo Falcon para centrifugar las células a 12.000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con PBS 1x estéril.
- Resuspender el precipitado en 50 % de DMEM, 40 % de FBS y 10 % de DMSO.
- Dispensar en crioviales (1 mL en cada criotubo).
- Guardar rápidamente los crioviales en el congelador a -80 °C durante 24 h.
- Guardar los crioviales en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

Procedimiento de congelación de células en suspensión (JURKAT T)

- Traspasar la suspensión celular a un tubo Falcon para centrifugar las células a 12.000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con PBS 1x estéril.
- Resuspender el precipitado en 50 % de DMEM, 40 % de FBS y 10 % de DMSO.
- Dispensar en crioviales (1 mL en cada criotubo).
- Guardar rápidamente los crioviales en el congelador a -80 °C durante 24 h.
- Guardar los crioviales en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

Procedimiento de descongelación de células

El procedimiento de descongelación de células tiene como objetivo eliminar el medio de congelación, que contiene DMSO, molécula que resulta tóxica para las células en crecimiento.

- Preparar un frasco de 25 cm² con 5 mL de medio de cultivo suplementado a 37 °C.
- Descongelar el criovial rápidamente.
- Una vez descongelado, tomar el volumen de células con una pipeta y pasarlo al frasco de cultivo.
- Guardar el frasco dentro del incubador por una hora.
- Eliminar el medio de cultivo del frasco (que incluye DMSO).
- Lavar las células dos veces con PBS 1x estéril.
- A continuación se realiza el procedimiento mencionado en materiales y métodos (3.2.3.), dependiendo de la línea celular descongelada.

- Lavado de células

Esta operación se realiza para retirar los restos de medio de cultivo cuando las células van a ser sometidas a algún experimento posterior, cambio de medio de cultivo o cuando las células van a ser congeladas (Ver anexo 3). Se añade 2-3 mL de tampón PBS 1x estéril al frasco de cultivo, se homogeniza el PBS en la placa durante 1 minuto, volviéndose a repetir este procedimiento 2-3 veces.