

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE DOS EXTRACTOS DEL HONGO *GRIFOLA FRONDOSA* (DICKS.:FR.) S.F. GRAY, MEDIANTE ENSAYOS *IN VITRO*

Lorenzana R¹, Mazariegos A¹, Paz M¹ y Sommerkamp I²

¹ Unidad de Bioensayos, Depto. de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC. ² Laboratorio Fitomykoterapéutico Lavra Mambré, Guatemala, C.A.

RESUMEN

Fue evaluada la actividad de dos extractos del hongo comestible *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray, conocido comúnmente como maitake sobre el sistema inmune humano. Se estudió la actividad inmunomoduladora de los extractos acuoso y etanólico obtenidos del cuerpo fructífero del hongo sobre los linfocitos por medio de un ensayo linfoproliferativo y fueron realizados ensayos hemolíticos *in vitro* para probar su influencia sobre las vías clásica y alterna del sistema de complemento.

El ensayo de linfoproliferación fue realizado colocando linfocitos purificados expuestos a los extractos y cultivados para una evaluación final colorimétrica con XTT, una sal de tetrazolio que es reducida a un compuesto coloreado y soluble por la actividad enzimática mitocondrial presente en células vivas.

Para la evaluación de los extractos sobre el sistema de complemento fueron utilizados ensayos hemolíticos basados en la ruptura de eritrocitos por el complejo de ataque a la membrana (CAM) generado tras la activación del sistema de complemento. La absorbancia de la hemoglobina liberada por los eritrocitos fue el parámetro de medición de la actividad del sistema de complemento.

Ambos extractos de *G. frondosa* mostraron actividad estimuladora de la linfoproliferación, observándose mayor actividad en el extracto etanólico. Los bioensayos sobre el sistema de complemento demostraron una acción inhibitoria en ambos extractos y sobre las dos vías del complemento, clásica y alterna.

SUMMARY

The activity on human immune system of two extracts obtained from the edible mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray, commonly known as maitake, was evaluated. The immunomodulative activity of both extracts, aqueous and ethanol, obtained from the fruitful body of the mushroom over human lymphocytes was studied by a lymphoproliferation assay and also two *in vitro* hemolytic assays were performed to prove their influence over complement system, both classic and alternative pathways.

Lymphoproliferation assay was performed with purified human lymphocytes exposed to the extracts and cultured for a final colorimetric test by XTT, a tetrazolium salt that yields a coloured soluble compound when reduced by mitochondrial enzymes from living cells.

To evaluate the extracts over complement system hemolytic assays were performed based on red blood cells lyses by the membrane attack complex (MAC) which is formed by triggering the complement system.

Both extracts of *G. frondosa* showed stimulating activity to lymphocytes and more activity was observed in ethanol extract. Complement assays showed inhibitory activity in both extracts over classic and alternative complement pathways.

INTRODUCCIÓN

Los hongos han sido valorados desde hace muchos años por sus propiedades comestibles en países de Asia y Europa. En China, han sido utilizados a través de generaciones como suplementos alimenticios y como tónicos para el sistema inmune, aumentando la longevidad y la salud en general de las personas. En Japón los hongos silvestres habitan en la parte noreste, y también se pueden encontrar en restaurantes de clase alta debido a su excelente textura, sabor y aroma. En países de Europa, los hongos son altamente cotizados, debido a su amplia gama de beneficios. Para los Yoruba, un grupo del noreste de Nigeria, los hongos se han convertido en una parte importante de su mitología, así como parte de sus medicinas naturales (1).

Se conoce una gran variedad de hongos con propiedades comestibles y terapéuticas, tales como *Lentinula edodes* (shiitake), *Hericium erinaceus*, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Volvariella volvaceae* y *Grifola frondosa* (maitake), tomando este último, gran relevancia en los últimos años (1). En tiempos feudales, el maitake era considerado tan valioso que se pagaba su peso en monedas de plata. Incluso actualmente los buscadores del hongo se reservan celosamente la

localización de las áreas donde crece. El maitake es muy buscado por los cocineros por su excelente sabor y textura, mientras otras personas lo valoran por sus beneficios terapéuticos (2).

Diversos principios activos con demostrada actividad antineoplásica e inmunomoduladora han sido aislados de más de 30 especies de hongos. Muchos de los principios activos micóticos se relacionan químicamente a la estructura β -D-glucano (polímeros de D-glucosa con otros monosacáridos) o β -D-glucanos enlazados a proteínas (péptidos-polisacáridos o proteoglicanos). A principios de la década de los ochenta, el micólogo japonés Hiroaki Nanba, de la Universidad Farmacéutica de Kobe llegó a la conclusión que los polisacáridos del maitake tenían una estructura única y demostró que su consumo lograba un pronunciado efecto antitumoral e inmunomodulador, mayor que el de otros hongos medicinales, en modelos animales. En 1984 Nanba identificó en el micelio y cuerpo fructífero del maitake, una fracción con capacidad de estimular a los macrófagos denominada fracción-D. Posteriormente se aislaron diversos compuestos activos que han demostrado otras actividades biológicas, entre las que se destacan: actividad contra la diabetes tipo 2, hipertensión arterial, hipercolesteremia y obesidad. Sin embargo, estas propiedades todavía están siendo estudiadas, y hacen falta nuevos estudios que avalen completamente las mismas (2).

Este estudio pretendió demostrar la actividad inmunomoduladora de los extractos etanólico y acuoso de *Grifola frondosa* sobre los linfocitos humanos y el sistema de complemento a través de un ensayo linfoproliferativo y ensayos hemolíticos *in vitro*. Con esto se intenta aportar los primeros datos experimentales en Guatemala, que apoyen el consumo tanto comestible como medicinal de este hongo y que proyecten la realización de estudios clínicos posteriores.



Grifola frondosa

MATERIALES Y MÉTODOS

El universo de este estudio lo constituyó el cuerpo fructífero del hongo *Grifola frondosa*, del cual se obtuvieron extractos acuosos y etanólicos.

Ensayo linfoproliferativo

Este ensayo se realizó con una lectina con conocido efecto linfoproliferativo, como control positivo y una solución de linfocitos en ausencia de lectina como control negativo. El ensayo permitió cuantificar la linfoproliferación, aprovechando la capacidad que tienen las células vivas (principalmente por acción de la actividad enzimática mitocondrial) de reducir la sal de tetrazolio (XTT) a un compuesto coloreado y soluble, cuya intensidad, proporcional a la cantidad de células presentes, fue medida espectrofotométricamente.

Los linfocitos fueron obtenidos a partir de sangre periférica con anticoagulante EDTA, para lo cual se llevaron a cabo cuatro etapas de centrifugación en frío, seguidas de separación de la capa de linfocitos y posterior re-suspensión en PBS de estas células.

Luego de este proceso, fue contado el número total de linfocitos por mililitro y luego se

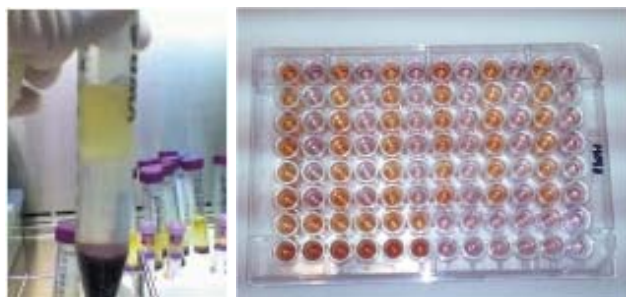
ajustó la concentración a 5×10^6 células/ml con RPMI-FBS. Fue utilizada una placa de microtitulación de 96 pozos (8 filas x 12 columnas). En ésta se colocaron 50 uL de extracto sin diluir en los dos primeros pozos de la primera fila, colocando en el tercer pozo el blanco de muestra. Fueron realizadas diluciones seriadas dobles de los tres pozos hasta la séptima fila, usando como diluyente RPMI – FBS. Se realizó este mismo procedimiento con las demás repeticiones utilizando las columnas 4 a 6, 7 a 9 y 10 a 12. En los primeros 6 pozos de la octava fila se colocaron controles positivos, y en los últimos 6 pozos de esta misma fila, se colocaron los controles negativos. Se agregó a cada pozo 50 uL de lectina y se colocó la placa en un ambiente de microaerofilia. Después de 4 días de incubación a 37 °C, se reveló la placa con una solución de XXT y se midió la densidad óptica a 490 nm en un fotómetro de placas y se calculó el porcentaje de linfoproliferación.

Ensayos hemolíticos

Fueron realizados ensayos para determinar la actividad del hongo sobre el sistema de complemento, basado en la hemólisis de los eritrocitos de carnero por el CAM generado tras la activación del sistema de complemento, los eritrocitos fueron los activadores y células diana; la absorbancia de la hemoglobina liberada se utilizó como parámetro en la medida de la actividad del complemento.

Determinación hemolítica para la actividad sobre la vía clásica.

Fue preparada una suspensión de eritrocitos de carnero en solución de Alsever obteniéndose células empacadas después de centrifugaciones en frío que se fueron re-suspendidas en buffer de veronal con calcio y magnesio (VSB⁺⁺).



Separación de linfocitos en gradiente de centrifugación (izquierda) y ensayo de linfoproliferación con XTT (derecha)



Ensayo hemolítico para la evaluación de los extractos de *Grifola frondosa*

La suspensión eritrocitaria fue sensibilizada con anticuerpos contra eritrocitos de carnero (amboceptor) y luego del extracto fue agregado suero humano como fuente de complemento. En los pozos de control se usó agua como el 100% de hemólisis y como control negativo se usó suero inactivado. La placa cubierta fue incubada a 37°C por 60 minutos y centrifugada a 2500 rpm por dos minutos. Finalmente fue medida la densidad óptica (DO) a 405 nm en un fotómetro de placas.

Determinación hemolítica para la actividad sobre la vía alterna

El ensayo difiere del anterior, en que esta vez son usados eritrocitos de conejo y un buffer EGTA-VG (contiene Mg^{+2} y ácido etilenglicol-bisβ-aminoetileter-tetraacético).

La placa es preincubada a 37°C por 30 minutos y después de agregada la suspensión de eritrocitos de conejo es incubada nuevamente 30 minutos, centrifugada y evaluada fotométricamente a 405 nm.

Cálculos

La actividad sérica fue calculada y expresada como porcentaje de hemólisis, así como la concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}). Se realizó la gráfica de % de inhibición vrs. log de concentración, con la recta de regresión lineal obtenida y se extrapoló el valor del 50% de inhibición para obtener la CI_{50} .

Las respuestas medidas fueron las siguientes: **a. Positiva:** si el extracto aumentó (actividad estimuladora) o disminuyó (actividad inhibitoria) en un 50% la concentración de hemoglobina comparado frente al resultado de la actividad sérica y si la concentración de la muestra en estudio necesaria para obtener un 50% de lisis eritrocitaria (CI_{50}) fue menor a 25 µg/mL y **b. Negativa:** si la concentración de hemoglobina producida por el extracto quedó inalterada comparada frente al resultado de la actividad sérica o la CI_{50} fue mayor a 16 µg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación Cualitativa de la Actividad Linfoproliferativa

La primera fase de este estudio, determinó la actividad linfoproliferativa *in vitro* de los extractos etanólico y acuoso de *G. frondosa*, a diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la tabla No. 1.

Tabla No. 1: Determinación de la actividad linfoproliferativa *in vitro* de los extractos acuoso y etanólico de *G. frondosa*

Concentración	Extracto Acuoso <i>x/n</i> *	Extracto Etanólico <i>x/n</i>
1000 µg/ml	5/5**	5/5**
500 µg/ml	0/5	5/5**
250 µg/ml	0/5	0/5
125 µg/ml	0/5	0/5
62.5 µg/ml	0/5	0/5
31.25 µg/ml	0/5	0/5
15.63 µg/ml	0/5	0/5

* número de repeticiones con resultado positivo / total de repeticiones realizadas

**p = 0.03125

A una concentración de 1000 µg/ml, ambos extractos presentaron actividad en las 5 repeticiones ensayadas. El extracto etanólico, además, mostró actividad a una concentración de 500 µg/ml, también para las 5 repeticiones ensayadas. Todas las demás concentraciones probadas dieron resultados negativos (por debajo del control), lo que permite establecer una concentración efectiva mínima de 1000 µg/ml para el extracto acuoso y de 500 µg/ml para el etanólico. El valor de p, en las concentraciones con actividad para ambos extractos, fue menor que el nivel de significancia estipulado (0.05) siguiendo una distribución binomial con una probabilidad de éxito *a priori* de 0.5. Esto indica que la respuesta obtenida en este ensayo es causada por los extractos.

Determinación del Porcentaje de Linfoproliferación

El porcentaje de linfoproliferación que presentó cada extracto fue determinado tomando

como 100 por ciento la linfoproliferación producida por la fitohemaglutinina (lectina linfoproliferativa). La tabla No. 2 presenta los porcentajes de linfoproliferación y los datos estadísticos obtenidos a partir de ambos extractos para las concentraciones que presentaron actividad.

Tabla No. 2: Concentraciones con actividad linfoproliferativa de los extractos de *G. frondosa*

Extracto Acuoso*	Media	Desv st.	C.V	Max.	Min.
1000 ug/ml	124.50	6.55	5.26%	138	115
500 ug/ml	85.40	11.34	13.27%	106	71
Extracto etanólico	Media	Desv st.	C.V	Max.	Min.
1000 ug/ml	156.40	6.24	3.99%	164	146
500 ug/ml	125.10	5.09	4.07%	131	116

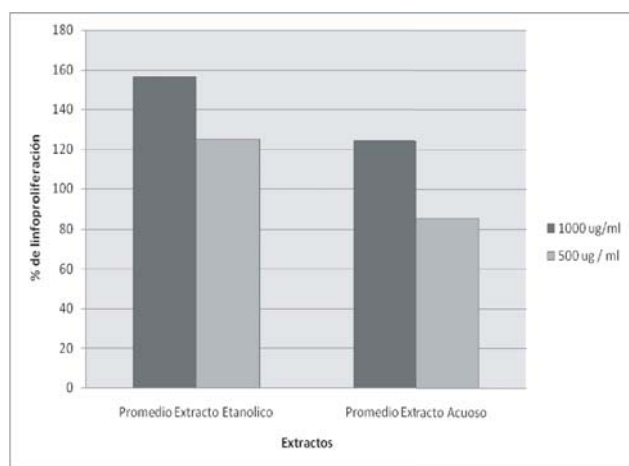
* Actividad únicamente en concentración 1000 µg/ml

En esta tabla se puede observar que a concentraciones de 1000 µg/ml, el extracto etanólico muestra 56 % de linfoproliferación por encima del control positivo, mientras que el extracto acuoso muestra 24%. A una concentración de 500 µg/ml, el extracto etanólico muestra un 25 % de linfoproliferación sobre el control positivo. Los valores de dispersión de estos datos prueban que para estas concentraciones el ensayo tiene validez estadística. Por otra parte, el extracto acuoso, a una concentración de 500 µg/ml,

muestra un 15 % de linfoproliferación por debajo del control positivo, pero sus parámetros de dispersión son muy elevados, por lo que no se puede validar dichos resultados

La gráfica No. 1 muestra las diferencias entre las medias de ambos extractos, a las concentraciones descritas anteriormente.

Gráfica No. 1 Medias de extractos etanólico y acuoso, a concentraciones de 1000 y 500 g/ml.



Se resalta la línea base, que es la obtenida por el control positivo.

Fuente: Datos experimentales

Determinación de actividad sobre el sistema de complemento

Fueron realizados dos ensayos para determinar la actividad de los extractos etanólico y acuoso del hongo sobre la vía clásica y la vía alterna del complemento. En cada una de las vías se corrieron cuatro repeticiones utilizando 7 diluciones (1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729 y 1:2187), con una concentración inicial del extracto de 500 g/mL.

El porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en la vía clásica del complemento no alcanzó el 50% para ninguno de los dos extractos

en sus distintas diluciones. En ambos extractos se observó que la actividad hemolítica aumentó conforme fue disminuyendo la concentración del hongo. Para la vía clásica la actividad hemolítica del suero sin la adición del extracto etanólico fue de 51.3%, y para el extracto acuoso fue de 35.6% (Tablas No.3 y 4)

Tabla No.3

Ensayo hemolítico de la vía clásica del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto etanólico del hongo *Grifola frondosa*

Dil	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
1:3	13,45	8,34	12,60	17,88
1:9	24,01	26,39	26,73	24,01
1:27	30,48	32,86	29,11	27,24
1:81	33,03	36,61	36,78	34,22
1:243	38,14	38,48	40,52	37,63
1:729	38,65	36,44	37,46	35,93
1:2187	43,76	41,03	39,33	35,93

Fuente: Datos experimentales

Tabla No.4

Ensayo hemolítico de la vía clásica del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto acuoso del hongo *Grifola frondosa*

Dil	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
1:3	18,21	17,90	16,82	18,83
1:9	27,16	28,70	23,77	24,23
1:27	28,86	29,78	30,25	31,33
1:81	32,72	31,33	31,48	31,33
1:243	35,96	36,42	36,27	36,11
1:729	34,72	37,96	36,88	35,96
1:2187	39,20	35,49	39,04	34,88

Fuente: Datos experimentales

En la vía alterna los resultados fueron parecidos, aunque en ésta el porcentaje de hemólisis del suero activo en presencia del hongo superó el 50%, no duplicó el porcentaje de actividad del suero sin el hongo. Para la vía alterna la actividad hemolítica del suero sin la adición del extracto etanólico fue de 56.9%, y para el extracto

acuoso fue de 61.1%. Las tablas No.5 y 6, muestran que la actividad del suero aumenta conforme se reduce la concentración del hongo en ambas vías.

Muchas investigaciones han reportado que *G. frondosa* y sus extractos poseen una remarcada actividad antitumoral por activación del sistema inmune. En esta investigación se demostró el efecto *in vitro* de los extractos sobre los linfocitos humanos y sobre el sistema de complemento. Ambos extractos indujeron la proliferación de linfocitos e inhibieron la actividad hemolítica del complemento.

Tabla No.5

Ensayo hemolítico de la vía alterna del complemento
Porcentaje de hemólisis con el extracto etanólico de *G. frondosa*

Dilución	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
1:3	59,73	58,36	55,89	62,88
1:9	61,78	62,19	63,29	68,77
1:27	64,93	64,11	64,25	71,51
1:81	65,75	66,58	66,99	72,88
1:243	68,77	68,36	69,86	75,34
1:729	70,41	72,05	74,47	76,03
1:2187	75,75	78,36	79,73	81,92

Tabla No. 6

Ensayo hemolítico de la vía alterna del complemento
Porcentaje de hemólisis de los eritrocitos en presencia del extracto acuoso del hongo *Grifola frondosa*

Dilución	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
1:3	51,10	52,61	53,12	54,76
1:9	55,14	57,42	55,78	60,08
1:27	62,10	61,72	61,72	66,27
1:81	64,00	66,15	64,50	66,02
1:243	69,18	71,21	69,06	71,59
1:729	72,34	73,99	73,10	75,13
1:2187	78,41	78,04	75,51	80,56

Fuente: Datos experimentales

Los resultados aquí expuestos, concuerdan con una serie de hallazgos publicados por otros investigadores. En los estudios realizados con animales por Hishida y colaboradores, y por

Yamada y colaboradores, se demostró que la fracción D posee actividad antitumoral debido al aumento en la concentración de IL-1, así como por el incremento en la producción de macrófagos, linfocitos T que exhiben citotoxicidad específica contra antígeno y células NK. Por otra parte, en este estudio se observó un detrimento en la respuesta hipersensible, la cual fue asociada a la supresión del crecimiento tumoral (3, 4).

Adachi y colaboradores realizaron investigaciones sobre como uno de los compuestos extraídos a partir del cuerpo fructífero de este hongo, una glucoproteína denominada MT – 2, aumenta la actividad de células del sistema inmune en ratones. Estos investigadores descubrieron que la administración intraperitoneal de dicho compuesto incremento entre 50% y 80% la cantidad de linfocitos T, y de un 80 % a un 200 % la cantidad de células NK (5).

Se publicó que la fracción D, al ser administrada por vía oral a pacientes con SIDA, indujo a un incremento en las células T, mientras que en otros se interrumpió la disminución de estas células. Shidima y colaboradores usaron la fracción D como terapia complementaria para perros con cáncer tratados con cirugía y/o quimioterapia. En este estudio, la fracción D condujo, en el 59 % de los casos, al incremento de la fracción linfocítica en sangre periférica, induciendo la producción de citokinas relacionadas a la activación de la respuesta inmune celular. En 85% de los casos con un incremento en la fracción linfocítica, no se observó recurrencia durante un período de 10 meses de observación. En contraste, en los casos sin aumento de la fracción linfocítica, en la mayoría se observó recidivas (6, 7).

Este estudio logró determinar que los extractos de *G. frondosa* aumentan la proliferación de linfocitos *in vitro*, entre 1.2 y 1.6 veces. Esto

concuera con los datos reportados por Namba y colaboradores en 2000, en un estudio realizado para evaluar el efecto de la fracción D en pacientes con VIH. A pacientes confirmados con VIH se les monitoreó el conteo de CD4, medición de carga viral, síntomas de infección por VIH, estatus de enfermedades oportunistas, y sensación de bienestar. Después de administrar fracción D por 360 días, se reportó en 20 pacientes un incremento en el conteo de CD4 de entre 1.4 y 1.8 veces, así mismo, se reportó en 10 pacientes un descenso en la carga viral. En adición, el 85% de los pacientes reportaron un incremento en su sensación de bienestar, con respecto a varios síntomas y enfermedades secundarias causados por el VIH (8).

Nosotros encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de ambos extractos, siendo el extracto etanólico el que mostró mayor actividad. Varios investigadores, como Kato en 1983, Ohno en 1986, Suzuki en 1984, Iino en 1985 y Mizuno en 1986, utilizaron diferentes solventes orgánicos para extraer los polisacáridos contenidos en el cuerpo fructífero de *G. frondosa*, logrando purificar varios tipos de compuestos con actividad antitumoral e inmunomoduladora (2).

En cuanto a su actividad sobre el sistema de complemento, los resultados demuestran que la presencia del hongo *Grifola frondosa* está fuertemente ligada a una acción inhibitoria del en ambas vías (clásica y alterna). Debido a que ambas vías del complejo de ataque a la membrana (CAM) se ven inhibidas, es posible que la regulación del complemento ocurra a partir del complejo C3 común para ambas vías. La acción reguladora del hongo puede estar relacionada con la activación de la proteína de unión C4 (C4bp) y el factor I, encargados de la regulación de C4b o bien, otro punto de regulación puede estar relacionado con la activación de las proteínas vitronectina, clusterina o el factor J, que interactúan con el complejo C5b67 evitando su

unión a las membranas biológicas, inhibiendo la lisis de los eritrocitos. Sin embargo para demostrar esto debe hacerse evaluaciones por medio de otro tipo de ensayo (9).

Reconociendo la limitante de que se trabajó con extractos crudos, el presente trabajo aporta datos suficientes para justificar investigaciones posteriores dirigidos por un lado a determinar los principios activos y sus mecanismos de acción, y por otro realizar ensayos *in vivo* necesarios para establecer la actividad del hongo en modelos animales, así como el diseño de ensayos clínicos.

REFERENCIAS

1. Hobbs C. Medicinal Mushrooms an Exploration of Tradition, Healing, and Culture. 2 ed. Londres: Botanica Press, 1995. 208p.
2. Zhunag C, Solomon PW. Medicinal Value of Culinary – Medicinal Maitake Mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (Aphyllphoromycetideae). Review. Int J Med Mushr 2004; 6:287 – 313.
3. Hishida I., Nanba H., Kuroda H. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). Chem Pharm Bull 1988; 36: 1819 – 1827.
4. Yamada Y., Nanba H., Kuroda H. Antitumor effects of orally administered extracts from fruit body of *Grifola frondosa*. Chemoterapy 1990; 38:790 – 796.
5. Adachi K., Nanba H., Korouda H. Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by Beta – glucan obtained from *Grifola frondosa* (Maitake). Chem Pharm Bull 1987; 35: 262 – 270.

6. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. 3 ed. Canada: Ten Speed Press, 2000. 555p
7. Shidima T., Shnidman E., Shirota M. Usefulness of anti – cancer complementary immune therapy with DVM fraction. J Amer Holstic Vet Med Assoc 2004; 23:17 – 20.
8. Namba H., Kodama N., Schar D., Turner D. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV – infected patients. Mycoscience 2000; 41: 293 – 295.
9. Berrón P, *et al.* El Sistema del Complemento, Vías clásica y de la Lectina que se une a la Manosa. Alergia e Inmunología Pediátrica 2003; 12:46