

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



---

“Evaluación de las actividades biológicas de compuestos bioactivos del hongo *Agaricus blazei*”

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Autor:** Gabriela Viviana Hidalgo Vaca

**Tutor:** Orestes Darío López Hernández, PhD.

**Ambato - Ecuador**

**Diciembre - 2018**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Orestes Darío López Hernández

### **CERTIFICA:**

En calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “Evaluación de las actividades biológicas de compuestos bioactivos del hongo *Agaricus blazei*”, modalidad proyecto de Investigación, realizado por la señorita Gabriela Viviana Hidalgo Vaca, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación de la Comisión Calificadora designada por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato 18 de octubre del 2018



---

PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Gabriela Viviana Hidalgo Vaca, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniería Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



---

Gabriela Viviana Hidalgo Vaca

C.I. 1804567871

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

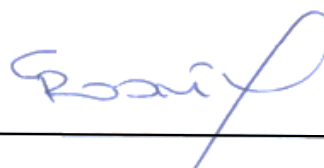
Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



---

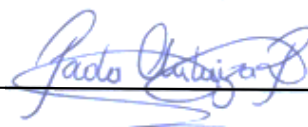
**Presidente del Tribunal**



---

**Carlos Alberto Rodríguez Meza, PhD**

**C.C. 1802166502**



---

**Paola Cristina Chiluiza Ramos, Mg**

**C.C. 0603341330**

Ambato, 03 de diciembre del 2018

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



---

Gabriela Viviana Hidalgo Vaca

C.I. 1804567871

**AUTORA**

## DEDICATORIA

*Quiero dedicar este trabajo y logro personal a la personita que día a día me ayuda a ser mejor, quien es mi fuerza y mi motor desde el día en que nació, a mi hija Luciana quien ha pasado junto a mi este largo camino, esta meta cumplida no es solo mía sino de las dos por el amor y apoyo que me ha dado desde antes de hablar y ahora con sus palabras de aliento a pesar de ser tan pequeña.*

*Así como a mis padres Geovanna y Jorge que me han brindado su apoyo incondicional en todos los aspectos en todo momento, muchas gracias por todos sus esfuerzos y a mi hermano José Ignacio.*

*Y por último a mis abuelitos Gladys y una persona que marco mi vida y se convirtió en mi ejemplo a seguir así ya no este conmigo, mi abuelito Jaime.*

## AGRADECIMIENTO

Para empezar, quiero agradecer nuevamente a mis padres por ser mi guía y mi soporte en este camino, a todos los familiares que de una u otra manera ayudaron a que yo pueda concluir de manera exitosa con mi carrera con sus palabras de aliento.

Agradezco a mi tutor, el Doctor Orestes López por su apoyo y guía en la elaboración del actual proyecto, además de todos los conocimientos impartidos como docente en las aulas de la facultad.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Yenddy Carrero por su desprendida ayuda y entrega a más de los conocimientos brindados para la elaboración de la investigación en los campos de su especialización, y proporcionarme los materiales necesario para el trabajo en cultivo de células eucariotas.

Así mismo al Dr. Carlos Rodríguez muchas gracias por darme parte de su tiempo y por los conocimientos aportados al trabajo de titulación y a Mg. Paola Chiluzza por su colaboración, dedicación y tiempo para que sea posible concluir con este gran sueño de ser una mujer profesional, por otro lado, un agradecimiento a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y a la Universidad Técnica de Ambato por haberme acogido a lo largo de la carrera.

Finalmente, aunque no menos importante le doy las gracias a Dios por darme la salud, las capacidades, y el apoyo espiritual para poder cumplir con un objetivo más en mi vida.

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## A. PÁGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR .....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	IV
DERECHOS DE AUTOR.....	V
DEDICATORIA .....	VI
AGRADECIMIENTO.....	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS .....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	XIII
RESUMEN .....	XV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUCCIÓN .....	XVII

## B. TEXTO

CAPÍTULO I .....	1
EL PROBLEMA .....	1
1.1 Tema.....	1
1.2 Justificación.....	1
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General .....	3
1.3.2 Objetivos Específicos .....	4
CAPÍTULO II .....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Antecedentes investigativos .....	5
2.1.1 <i>Agaricus blazei Murill (ABM)</i> .....	6
2.1.1.1 Historia y nomenclatura.....	6
2.1.1.2 Taxonomía.....	6
2.1.1.3 Características morfológicas.....	7
2.1.1.4 Composición química: .....	8



2.1.2 Compuestos bioactivos de <i>A. blazei</i> .....	8
2.1.2.1 Polisacáridos.....	9
Actividad biológica de polisacáridos de AbM.....	10
2.1.2.2 Compuestos fenólicos.....	12
2.1.2.3 Relación del cáncer con ABM .....	15
2.2 Hipótesis.....	16
2.2.1 Hipótesis Nula ( $H_0$ ) .....	16
2.2.2 Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ) .....	16
2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis.....	17
2.3.1 Variable Independiente.....	17
2.3.2 Variable Dependiente .....	17
CAPÍTULO III.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
3.1 Material .....	18
3.2 Métodos.....	19
3.2.1 Extracción de compuestos bioactivos de <i>Agaricus blazei</i> .....	19
3.2.2 Caracterización de compuestos bioactivos de AbM.....	21
3.2.2.1 Determinación de sólidos totales .....	21
3.2.2.2 Cuantificación de fenoles totales: Método Folin – Ciocalteu en microplato .....	21
3.2.2.3 Cuantificación del contenido total de flavonoides: Ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio en microplato.....	22
3.2.2.4 Cuantificación de polisacáridos: Método fenol – sulfúrico.....	23
3.2.2.5 Espectroscopia IR .....	23
3.2.3 Evaluación de las actividades biológicas de los compuestos bioactivos de <i>A. blazei</i> .....	24
3.2.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante: DPPH Método en microplaca .....	24
3.2.3.2 Evaluación de la actividad inmunomoduladora: Ensayo de viabilidad celular en linfocitos de sangre periférica humana .....	25
3.2.3.3 Evaluación de actividad citotóxica: Método colorimétrico MTT en líneas celulares de cáncer. ....	27
3.2.3.4 Pruebas Inmunocitoquímicas .....	30
3.3 Diseño experimental.....	31
CAPÍTULO IV .....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
4.1 Análisis y discusión de los resultados.....	32
4.1.1 Caracterización de compuestos bioactivos de <i>A. blazei</i> .....	32
4.1.2 Optimización del proceso de extracción de componentes bioactivos de <i>A. blazei</i> .....	37
4.1.3 Análisis espectro FTIR .....	43

4.1.4 Actividad Antioxidante de extracto acuoso (T1) de ABM.....	45
4.1.5 Actividad inmunomoduladora de ABM.....	45
4.1.6 Actividad citotóxica de ABM en células cancerígenas .....	49
4.1.7 Pruebas inmunocitoquímicas de cuantificación de estrés oxidativo.....	53
4.1.8 Discusión general .....	60
4.2 Verificación de hipótesis .....	64
CAPÍTULO V .....	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	65
5.1 Conclusiones .....	65
5.2 Recomendaciones.....	66

## C. MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas .....	67
ANEXOS .....	87
ANEXO A. Fotografías de extractos con los cuatro tratamientos.....	87
ANEXO B. Curva de calibración de fenoles totales .....	88
ANEXO C. Curva de calibración de flavonoides .....	89
ANEXO D. Curva de calibración de polisacáridos.....	90
ANEXO E. Concentración de compuestos bioactivos de los 4 tratamientos de <i>A. blazei</i> ..	91
ANEXO F. Tablas ANOVA de concentraciones de compuestos bioactivos de extractos de <i>A. blazei</i> .....	92
ANEXO G. Datos y Curva de calibración para evaluación de Actividad Antioxidante (AA) .....	93
ANEXO H. Datos MTT de Linfocitos .....	94
ANEXO I. Datos MTT de células HeLa.....	95
ANEXO J. Datos MTT de células MCF - 7 .....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación sistemática de <i>A. blazei</i> .....	7
Tabla 2. Condiciones de extracción de compuestos activos de <i>A. blazei</i> .....	20
Tabla 3. Porcentaje de sólidos totales .....	32
Tabla 4. Concentración de compuestos bioactivos .....	33
Tabla 5. Concentraciones de compuestos bioactivos de extracto diluido .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías del hongo <i>Agaricus blazei</i> .....	8
Figura 2. Estructura de $\beta$ -glucanos en hongos. ....	10
Figura 3. Principio de acción de $\beta$ - glucanos en el sistema inmunológico.. ....	12
Figura 4. Estructura de polifenoles hidrogenoicos.. ....	13
Figura 5. Método de polifenoles de bloqueo o supresión en diferentes etapas de carcinogénesis. ....	14
Figura 6. Estructura básica de flavonoides.....	15
Figura 7. Diagrama de aislamiento de linfocitos con Histopaque® -1077.....	26
Figura 8. Comparación de la concentración de compuestos bioactivos.....	36
Figura 9. Análisis de los factores óptimos para el proceso de extracción de fenoles totales de <i>A. blazei</i> .....	38
Figura 10. Análisis de los factores óptimos para el proceso de extracción de flavonoides de <i>A. blazei</i> . ....	39
Figura 11. Análisis de los factores óptimos para el proceso de extracción de polisacáridos de <i>A. blazei</i> .....	41
Figura 12. Condiciones óptimas de extracción en función de la concentración de fenoles totales, flavonoides y polisacáridos. ....	42
Figura 13. Espectro FT/IR del extracto acuoso (T1) de <i>Agaricus blazei</i> .....	43
Figura 14. Ensayo de proliferación celular de linfocitos de sangre periférica humana con extracto de ABM .....	47
Figura 15. Linfocitos tratados con ABM, teñidos con MethylGreen observados al microscopio ( 100x). ....	49
Figura 16. Ensayo de citotoxicidad en células HeLa (ATCC® CCL-2™) tratadas con ABM.....	50
Figura 17. Ensayo de citotoxicidad en células MCF - 7 (ATCC® HTB-22™) tratado con ABM.....	52
Figura 18. Expresión de especies reactivas de oxígeno de acuerdo a la concentración de ros en función de la intensidad de fluorescencia por campo 630x en líneas celulares tratadas con ABM a diferentes concentraciones mediante CellRox® oxidative stress reagents.....	54

Figura 19. Correlación en la producción de ROS de acuerdo a las diferentes concentraciones de ABM aplicadas en líneas celulares .....	55
Figura 20. Fotos microscopia de fluorescencia para la expresión de ROS a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los filtros DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X en linfocitos humanos...	56
Figura 21. Fotos microscopia de fluorescencia para la expresión de ROS a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X en células de HeLa (ATCC® CCL-2TM).....	57
Figura 22. Fotos microscopia de fluorescencia para la expresión de ROS a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X en células MCF - 7 (ATCC® HTB-22TM).....	58

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**AA** Actividad Antioxidante

**ABM** *Agaricus Blazei* o *A. blazei*

**AlCl<sub>3</sub>** Cloruro de aluminio

**CD3** Moléculas marcadoras de la superficie celular propio del sistema inmune de mamíferos

**CD4** Moléculas que se expresan en la superficie de ciertas células T y en células dendríticas.

**CMN** Células Mononucleares

**DAPI** 4', 6-diamidino-2-fenilindol, tinción de ADN fluorescente azul

**DMEM** Medio basal para cultivo de células de mamíferos Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DPPH** 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

**DS** Desviación estándar

**EC<sub>50</sub>** Concentración efectiva media máxima

**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético

**FBS** Fetal Bovine Serum (Suero Fetal Bovino)

**FL** Flavonoides

**FT** Fenoles Totales

**FTIR** Espectroscopia de transmisión de infrarroja con transformada de Fourier

**IC<sub>50</sub>** Concentración inhibitoria máxima media

**IR** Infrarrojo

**GFP** Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde), marcador biológico

**GLUC** Glucosa

**Mg GAE** Miligramos equivalentes de ácido gálico

**Mg QE** Miligramos equivalentes de quercetina

**MHC II** Complejo de Histocompatibilidad II

**MTT** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo), ensayo de viabilidad celular

**NO** Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno

**P/S** Antibiótico penicilina estreptomicina

**PBS** Phosphate Buffered Saline (Tampón Fosfato Salino)

**PLSC** Polisacáridos

**PMNC** Células Mononucleares Periféricas Humanas

**R<sub>2</sub>** Coeficiente de correlación

**RNS** Reactive Nitrogen Species (Especies Reactivas del Nitrógeno)

**ROS** Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas del Oxígeno)

**RPMI 1640** Medio para cultivo de células de mamíferos Roswell Park Memorial Institute 1640

**SDS** Dodecil sulfato sódico

**SI** Sistema Inmunitario

**ST** Sólidos Totales

**TNF** Factor de Necrosis Tumoral

**TLR** Receptor de linfocito T

**UV-VIS** Ultravioleta visible

## RESUMEN

El hongo *Agaricus blazei Murill*, es un macromiceto comestible utilizado en la cultura oriental desde la antigüedad por sus propiedades fisiológicas. En el presente estudio se busca ampliar los conocimientos sobre las moléculas bioactivas y actividades biológicas de la seta.

A partir de una muestra de un hongo entero seco y molido de una cepa de *A. blazei*, se evaluaron los parámetros óptimos para el proceso de extracción de componentes bioactivos, los cuales fueron: agua como disolvente en proporción 1:15 por 1 hora a temperatura de ebullición. Mediante métodos de espectrofotometría UV-VIS se determinaron las concentraciones de los principales compuestos activos de 4 extractos, destacándose T1, con las concentraciones: polifenoles 21,27 mg GAE/g, flavonoides 2,34 mg QE/g y polisacáridos 192,41 mg GLUC/g, tratamiento seleccionado para la evaluación de las actividades biológicas.

Se conoce que existe una estrecha relación entre el metabolismo oxidativo, la respuesta inmunitaria y el proceso de carcinogénesis, razón por la que se evaluaron tres de las propiedades del hongo. Inicialmente la actividad antioxidante por ensayo de DPPH con un consumo de 13,01 % de DPPH con 84,81  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . La actividad inmunomoduladora se cuantificó a través de la proliferación celular de linfocitos sanguíneos, por la técnica colorimétrica MTT con  $EC_{50}$  igual a 0,30 mg/ml. Y la actividad citotóxica se evaluó a través de ensayos de MTT, para células HeLa (ATCC® CCL-2™) se obtuvo un  $IC_{50}$  de 0,0024 mg/ml, y para MCF - 7 (ATCC® HTB-22™) un  $IC_{50}$  0,0023 mg/ml. El análisis de resultados evidenció que el extracto rico en polisacáridos, polifenoles, flavonoides poseen las actividades biológicas en estudio.

**Palabras clave:** polifenoles, flavonoides polisacáridos, antioxidante, inmunomodulador, anticancerígeno.

## ABSTRACT

The *Agaricus blazei Murill* mushroom, is an edible macromycete used in the oriental culture since ancient times for its physiological properties. The present study seeks to expand knowledge on the bioactive molecules and biological activities of the mushroom.

From a sample of a dry and ground whole fungus of a strain of *A. blazei*, the optimal parameters for the extraction process of bioactive components were evaluated, What were: water as solvent in a relation 1:15, during 1 hour at boiling temperature. Using UV-VIS spectrophotometry methods, the concentrations of the main active compounds of 4 extracts were determined, highlighting T1, concentrations: polyphenols 21,27 mg GAE/g, flavonoids 2,34 mg QE/g and polysaccharides 192,41 mg GLUC/g, treatment that was selected for the evaluation of biological activities.

It is known that there is a close relationship between oxidative metabolism, the immune response and the carcinogenesis process, which is why the antioxidant, immunomodulatory and cytotoxic properties of the ABM extract are evaluated. In the case of antioxidant activity by the DPPH assay, it was identified that the aqueous extract of ABM had the capacity to consume 13,01 % DPPH with 84,81  $\mu\text{mol Trolox/g}$ . The immunomodulatory activity was quantified through the cell proliferation of blood lymphocytes isolated by the MTT colorimetric technique with  $\text{EC}_{50}$  equals to 0,30 mg/ml. For the cytotoxic activity the inhibition of cell growth in two cancer cell lines was evaluated by MTT assay, for HeLa cells (ATCC® CCL-2TM) an  $\text{IC}_{50}$  of 0,0024 mg/ml, and for MCF-7 cells (ATCC® HTB-22TM) an  $\text{IC}_{50}$  0,0023 mg/ml. The analysis of results showed that the extract rich in polysaccharides, polyphenols, flavonoids possess the biological activities under study.

**Key words:** polyphenols, flavonoids, polysaccharides, antioxidant, immunomodulator, anticancer



## INTRODUCCIÓN

El ritmo y condiciones de vida del mundo actual han llevado a las autoridades sanitarias de todo el mundo a considerar el uso de alimentos funcionales y nutracéuticos que promueven beneficios a la salud y contribuyen al tratamiento de enfermedades crónicas (**Figueiredo & Régis, 2017**).

La medicina oriental se basa principalmente en la regulación de la homeostasis del organismo para encontrar una salud plena, sin embargo estos procesos se ven alterados por la exposición a ciertos factores ambientales estresantes, mala alimentación, patologías y acumulación de radicales libres que llevan al estrés oxidativo, principal causa de enfermedades crónicas y degenerativas como el cáncer, enfermedad con altos índices de muerte en la actualidad (**Daba & Ezeronye, 2003**). Según **Baena & Salinas (2014)** la dieta abarca hasta un 35 % de los factores de riesgo que conllevan su desarrollo, lo que ha conducido a la búsqueda de alimentos y sus componentes con un alto potencial medicinal.

Existen diversos alimentos a los cuales se les ha atribuido propiedades terapéuticas, de este grupo sobresalen las setas, las mismas que forman parte de la dieta humana desde hace miles de años hasta en las más importantes civilizaciones especialmente del continente asiático, por sus propiedades y la enorme cantidad de moléculas con actividades biológicas tanto en el micelio como en el cuerpo fructífero (**Suárez Arango & Nieto, 2013**). *Agaricus blazei* contiene una amplia gama de compuestos bioactivos con distintas actividades y propiedades destacándose los  $\beta$  glucanos, proteínas, compuestos enzimáticos, ácidos grasos insaturados, fenoles, flavonoides y terpenos, por ello para los científicos es de suma importancia hallar los parámetros de extracción para cada uno de sus metabolitos o su conjunto, para el desarrollo de técnicas rentables y eficientes de aislamiento de compuestos bioactivos (**Ma et al., 2018**).

Las moléculas antioxidantes naturales de *A. blazei* son los polifenoles y flavonoides, los cuales son compuestos que por su naturaleza química mantienen el equilibrio REDOX en los procesos celulares mediante la donación de electrones para estabilizar radicales libres (**Carneiro et al., 2013, Sánchez, 2013**). De igual manera se ha encontrado que los polisacáridos presentes en los hongos influyen en el proceso de

inmunomodulación. Dichos polímeros pueden estimular el sistema inmunitario al conectarse con receptores como Dectin, CR3, CD4, TLR mediante la inducción de la proliferación de macrófagos y células dendríticas (**Abia Heras, 2015**). Además se ha descrito que estas moléculas poseen actividad antitumoral teniendo como mecanismo principal la respuesta inmunitaria (**Chatattiku & Choabchalard, 2013**). Se ha evidenciado que este hongo puede tener actividad antitumoral a través de la activación del sistema inmunitario del huésped y no únicamente por citotoxicidad directa. Es por ello que el sistema inmunitario y el desarrollo del cáncer tienen una relación directa, debido a que la respuesta inmunitaria tiene la capacidad de destruir específicamente células tumorales sin dañar células y tejidos sanos, por lo que inhibe el crecimiento de tumores malignos, misma propiedad empleada como fundamento para la inmunoterapia oncológica (**Velázquez, López, & Quintana, 2017**). Según **Daba & Ezeronye (2003)** este metabolito es compatible con la quimioterapia y la radioterapia, por lo que ofrece altas esperanzas de vida para los pacientes de cáncer y quienes padecen enfermedades degenerativas o depresión del sistema inmunitario.

**Patel & Goyal (2012)**, sugieren que el macromiceto actúa como anticancerígeno controlando la proliferación de células malignas mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno, que conduce a la apoptosis de células malignas.

Por lo anteriormente mencionado y tomando en cuenta las características y propiedades que posee el ABM, las cuales brindan la oportunidad del desarrollo de alimentos funcionales que además de un alto potencial nutricional posean otras propiedades biológicas que puedan ser estudiadas a profundidad, y que permitan en un futuro desarrollar medicamentos alternativos con capacidad antioxidante, anticancerígena, antitumoral e inmunopotenciadora.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1 Tema

“Evaluación de las actividades biológicas de compuestos bioactivos del hongo *Agaricus blazei*”

### 1.2 Justificación

En la actualidad los hongos son considerados muy importantes dentro de la industria alimenticia por su alto contenido de minerales, aminoácidos, fibra y baja cantidad de calorías (**Firenzuoli, Gori, & Lombardo, 2008**), adicionalmente poseen una gran variedad de biomoléculas con propiedades nutritivas y medicinales, dentro de las cuales se han descrito compuestos fenólicos, polisacáridos, terpenos, proteínas y esteroides (**Orsine et al., 2012**), su consumo es considerado beneficioso a la salud, motivo por el cual han sido incluidos en la dieta desde tiempos inmemoriales principalmente en países orientales los cuales los han usado como alimento y como parte importante de la medicina tradicional por más de 2000 años (**Moradili, Mostafavi, Ghods, & Hedjaroude, 2007**), sin embargo en la última década se ha incrementado su interés científico, convirtiéndolo en una fuente importante para el desarrollo de nuevos productos en el ámbito farmacéutico (**Kalac, 2013**).

Diversos estudios que han identificado y han dado a conocer los usos medicinales de los hongos, dentro de los cuales se menciona su potencial como: antioxidantes, antidiabéticos, antitumorales, inmunomoduladores, antialérgicos, hipocolesterolémicos, antiinflamatorios, antibacterial y antiviral (**Bederska-Łojewska, Świątkiewicz, & Muszyńska, 2017**). Así mismo, es importante señalar su empleo en terapias contra el cáncer en el que se destacan los hongos del género *Agaricus*. Dentro de este género *Agaricus Blazei Murill* ha sido empleado convencionalmente como un alimento saludable para la prevención y tratamiento del

cáncer debido a sus propiedades inmunomoduladoras, anticancerígenas y antimutagénicas (**Delmanto et al., 2001**), en esta especie se destaca el contenido de polisacáridos, los cuales pudiesen tener una participación importante en el tratamiento y prevención de algunas patologías y ha sido aprovechado en la industria alimenticia. Si bien se ha mencionado su gran aporte nutritivo, el ámbito de mayor aplicación de esta especie es el medicinal, clínico y farmacéutico por su vasto espectro de actividades biológicas, que se emplean en el tratamiento de enfermedades oncológicas, algunos de tipos de esclerosis, en las hiperlipemias, control de diabetes, coadyuvante en el tratamiento de virus como el VIH y la estimulación del sistema inmunitario (**Dang et al., 2013**). Existen otras biomoléculas importantes como los ácidos fenólicos, los cuales influyen en la actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y se destacan por su actividad antioxidante específicamente en la reducción de especies reactivas del oxígeno dentro del organismo tras su ingesta, actividad que deriva en reducir el riesgo de muchas enfermedades incidentes en la actualidad como enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas y oncológicas (**Kumar D., Arya, Kaur, Ali Bhat, & Gupta, 2012**).

Según estadísticas de la Organización Panamericana de Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer constituye una de las principales causas de muerte y morbilidad alrededor del mundo, en el año 2012 se reportaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 8,2 millones de muertes por esta causa, para el año 2016 aumentaron a 9 millones de muertes, sin embargo estas alarmantes cifras se estima incrementarán para el año 2030 hasta más de 22 millones de nuevos casos y 4 millones de muertes (**Bray, Jemal, Grey, Ferlay, & Forman, 2011**).

En la mujer las enfermedades oncológicas de más alta incidencia son el cáncer de mama (CaMa) y el cáncer cervicouterino (CaCu). Se estima que en el mundo más de un millón de mujeres padecen de CaCu, de los cuales se ha proyectado que en 10 años se podrán incrementar hasta un 25 % (**Broutet, 2014**). Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) CaMa tiene incidencia de 23,5 por cada 100000 mujeres de 20 a 59 años, habiéndose reportado para el año 2016, 638 muertes por este tipo de cáncer en el Ecuador.

El presente estudio está enfocado en el análisis de *Agaricus blazei* como una fuente importante de biomoléculas que sean capaces de estimular el sistema inmunitario, así

como inhibir la proliferación de células cancerígenas en modelos *in vitro*, tomando en cuenta la alta incidencia y las tasas elevadas de mortalidad ocasionadas por el cáncer, en gran parte inducido por la constante exposición del hombre a numerosos agentes tóxicos o mutagénicos físicos, químicos y biológicos que pueden conducir al desarrollo de dicha enfermedad (Bellini et al., 2006).

Por lo antes expuesto y tomando en consideración la importancia de la búsqueda de nuevas fuentes alternativas para el tratamiento del cáncer, aunado a que la magnitud de los efectos biológicos del extracto difiere de su fuente y proceso de extracción (Hetland et al., 2008), un mayor conocimiento de los hongos aportaría información valiosa de su utilización en el área médica como tratamiento para esta fatal enfermedad y de esta manera reducir los niveles de incidencia de cáncer de diversa índole, tomando en consideración estudios previos en los cuales se ha estudiado *en vivo* e *in vitro* en ciertos tipos de cáncer como el cáncer de mama (Gu & Leonard, 2006; Standish et al., 2008; Yang et al., 2011), leucemia linfocítica aguda (Akiyama et al., 2011 & Jeong et al., 2011), leucemia mieloide aguda (J Kim et al., 2004), sin embargo es necesario incrementar el número de investigaciones que tomen en consideración no solo diferentes líneas celulares como modelo cancerígeno, sino que incluyan otros posibles efectos inmunomoduladores y específicos para otro tipo de patologías (Patel & Goyal, 2012) para así incrementar la evidencia científica de la efectividad de dichos compuestos en el tratamiento de enfermedades humanas (Money, 2016).

### 1.3 Objetivos

#### 1.3.1 Objetivo General

Evaluar las actividades biológicas de compuestos bioactivos del hongo *Agaricus blazei*.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Determinar las condiciones óptimas del proceso de extracción de compuestos bioactivos de *Agaricus blazei*.

Cuantificar el contenido de polifenoles totales, flavonoides y polisacáridos del extracto.

Evaluar la actividad antioxidante, inmunomoduladora, y citotóxica de los compuestos bioactivos del basidiomicete.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

Se estima que el Reino Fungi consiste en 1,5 millones de especies de las cuales solo se han descrito 70 000, de ellas 650 tienen propiedades farmacológicas (**Blackwell, 2011**). Dentro de este amplio grupo sobresalen los basidiomicetos (macromicetos) con prometedoras actividades biológicas, debido a una vasta gama de metabolitos secundarios que actúan como sustancias inmunomoduladoras, antitumorales, citostáticos, antivirales, antimicrobianos y más (**Weis & Wasser, 1999**).

Dentro de este amplio reino están los hongos comestibles que en diversas regiones del mundo son altamente consumidos por sus elevadas propiedades nutricionales y medicinales especialmente en el continente asiático, sin embargo, su popularidad los ha llevado a difundirse mundialmente. Dentro de este grupo sobresale el shitake (*Lentinula edodes*) empleado en sus inicios en la medicina tradicional asiática como tónico para contrarrestar dolores, enfermedades del corazón, enfermedades pulmonares y lombrices intestinales (**Money, 2016**), *Ganoderma lucidum*, otro hongo importante posee beneficios amplios para tratar el cáncer, diabetes, convulsiones y problemas cardiovasculares (**Wachtel-Galor, Yuen, Buswell, & Benzie, 2011**), *Hericiium erinaceus* conocido como melena de león se destaca por su utilización para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas (**Ma et al., 2010**), y *Agaricus blazei* por sus propiedades anticancerígenas, antimutagénicas e inmunoestimulantes (**Delmanto et al., 2001**).

### **2.1.1 *Agaricus blazei* Murill (ABM)**

#### **2.1.1.1 Historia y nomenclatura**

Este hongo en sus inicios fue cultivado en América de Norte y descubierto por primera vez en Florida, Estados Unidos en el año 1944, con cultivos desde Florida hasta el sur de California (**Fukuda, Ohno, & Kato, 2003**), sin embargo su hábitat natural está en Brasil, en el área de Piedade en São Paulo. En 1960 Takatoshi Furomoto investigador y observador notó la baja incidencia de enfermedades graves en adultos en esta región por el consumo de dicho hongo y lo importó a Japón en 1965. En 1967 el botánico Heinemann lo identificó como *Agaricus blazei* Murill (ABM) (**T. Mizuno, 1995**), estudiando así sus propiedades medicinales, posteriormente se expandió su consumo hacia otros países, en los años 90 Corea, China, Taiwán y Estados Unidos empezaron a producirlo de manera comercial (**Therkelsen, Hetland, Lyberg, Lygren, & Johnson, 2016**).

Es conocido tradicionalmente en Brasil como Cogmelo de Deus, "Seta de Dios", Cogmelo do Sol, "Seta del sol", hongo de la almendra, en Japón como Himematsutake, Kawarahiratake o como Agarikusutake, en China como Ji Song Rong (**Tilmanis, 2010**), también se le conoce como *Agaricus brasiliensis* (**Kerrigan, 2005**) además nuevos datos indican que este hongo puede ser biológica y filogenéticamente la misma especie *Agaricus subfrufescens* Peck de América del Norte (**Firenzuoli et al., 2008**).

#### **2.1.1.2 Taxonomía**

Es un hongo perteneciente a la división de los *Basidiomycetes* característico por su gran tamaño y producción de basidios con basidiosporas (**Lima, Gris, & Karnikowski, 2016**), de la familia *Agaricaceae*, orden *Agaricales*, cabe recalcar que de las 918 especies de esta familia únicamente un reducido número ha sido evaluado por sus aplicaciones en el ámbito nutricional y medicinal, adicionalmente al pertenecer al género *Agaricus* tiene la característica de ser un hongo saprófito (**Didukh, Wasser,**



& Nevo, 2003; Geml, Geiser, & Royse, 2004). En la tabla 1 se puede observar la clasificación sistemática del hongo.

**Tabla 1**

*Clasificación sistemática de A. blazei*

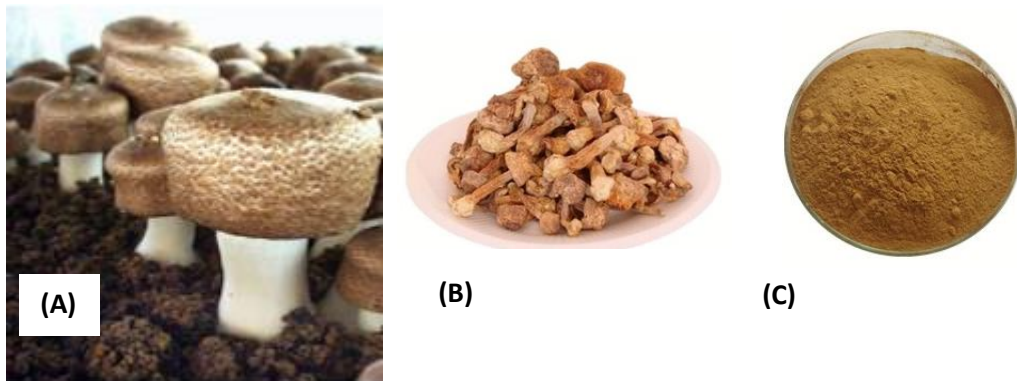
Clasificación	Descripción
Reino	Fungi
División	Basidiomycota
Clase	Homobasidiomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Agaricaceae
Género	Agaricus
Especie	blazei

Fuente: (Alave, 2008)

### 2.1.1.3 Características morfológicas

Dentro de sus características morfológicas se destacan 2 partes principales, el pilei (sombrero) que corresponde al cuerpo fructífero con la lamela y las esporas; y el estípite (pie) siendo este la parte inferior de la fruta formado por las hifas (Zied, Pardo, Tomaz, Miasaki, & Pardo-Giménez, 2017). El sombrero o gorro color marrón oro tiene una forma semiglobosa y truncada en la parte superior con un diámetro entre 5 a 11 cm, con pequeñas escamas blancas de aproximadamente 3 mm que sobresalen del mismo, cabe mencionar que durante sus etapas de madurez el gorro cambia su estructura, en su fase inmadura el gorro está cerrado y en su fase madura el mismo se abre. El pie se va estrechando en la unión con el sombrero, con un diámetro de 1 a 3 cm y una longitud de 4 a 13 cm con una base bulbosa de color blanco (Figura 1) (Cunha, Pardo, Pardo, & Teixeira, 2012). Su usual forma de reproducción es la sexual mediante esporas, posee basidios de tipo tetraspórico en forma de lanza, con basidiosporas lisas de color marrón chocolate con dimensiones de 5 por 10  $\mu\text{m}$  (Firenzuoli et al., 2008; Wisitrassameewong et al., 2012). Crecen en una variedad

de hábitats, regiones geográficas desde trópicos hasta regiones boreales, desde prados alpinos hasta costas arenosas y bosques de coníferas (Geml et al., 2004).



**Figura 1. Fotografías del hongo *Agaricus blazei*.** (A) hongo entero y fresco previo a su cultivo, (B) setas secas, (C) setas secas y molidas. Fuente: (Tilmanis, 2010)

#### **2.1.1.4 Composición química:**

Químicamente el macromiceto está conformado en su mayoría por agua, aproximadamente el 90 %, mientras que su composición en materia seca se distribuye en: proteínas 40 - 45 %, carbohidratos 38 - 45 %, fibra 6 - 8 % y grasa 3 - 4 %. Además posee pequeñas cantidades de sales, metales, minerales como potasio, fósforo, calcio, zinc, magnesio, cadmio, vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y ergosterol (precursor de la vitamina D<sub>2</sub>) (Firenzuoli et al., 2008; Györfi, Geösel, & János, 2010; T. Mizuno, 1995)

#### **2.1.2 Compuestos bioactivos de *A. blazei***

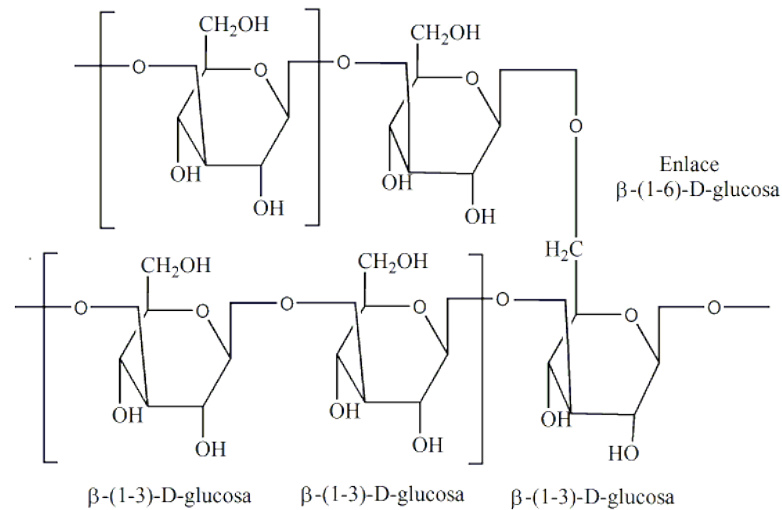
La seta también conocida como hongo del sol, tiene una abundante cantidad de polisacáridos, además contiene otros compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, esteroides, tocoferoles, terpenos, derivados de ácido benzoico, ácido oxálico, péptidos, proteínas, alcaloides y quininas (Carvajal et al., 2012 & Lima et al., 2016).

La concentración de estos compuestos puede tener muchas variantes considerando la cepa, el cultivo, la etapa de desarrollo del hongo, las condiciones de almacenamiento y conservación (**Mishra et al., 2013**), pero sobretodo el método de extracción que puede ir desde extracción con disolventes como agua, alcohol, éter o compuestos alcalinos hasta procedimientos más específicos como columnas cromatográficas, Extracción Asistida por Microondas (MAE ) o Extracción Ultrasónica Asistida (UAE) (**Z.-Y. Zhu et al., 2016**).

### **2.1.2.1 Polisacáridos**

Los polisacáridos son los principales componentes bioactivos de los hongos, cuya actividad biológica varía en dependencia de sus monosacárido, su peso molecular, el tipo y grado de ramificación (**Zhang et al., 2018**), en su estructura posee glucosa, galactosa, xilosa, manosa, fucosa, arabinosa, trehalosa, manitol (**Valverde, Hernández-Pérez, & Paredes-López, 2015**)

Sin embargo el grupo más representativo de estos polímeros son los  $\beta$  – glucanos que corresponden a carbohidratos de alto peso molecular presentes de manera natural en las paredes celulares de hongos, bacterias, levaduras, en algunos cereales plantas y algas (**Rahar, Swami, Nagpal, Nagpal, & Singh, 2011**), este polisacárido está formado por monómeros de D– glucosa, unidos por enlaces glucosídicos beta, su estructura difiere de su origen variando el grado de ramificación y los tipos de enlace entre los monómeros. En el caso de los hongos, los  $\beta$  – glucanos en su mayoría están conformados por una cadena principal lineal con enlaces  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) y con ramificaciones de tipo  $\beta$  (1  $\rightarrow$  6), estructura que se puede observar en la Figura 2 (**Abia Heras, 2015**).



**Figura 2. Estructura de  $\beta$ -glucanos en hongos.** Monómeros de glucosa unidos por enlaces beta. Fuente: (Volman, Ramakers, & Plat, 2008)

### Actividad biológica de polisacáridos de AbM

Estos polisacáridos brindan la oportunidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos con beneficios a la salud del hombre, actuando como inmunomoduladores, anticancerígenos, cardioprotectores, hepatoprotectores, y antimicrobianos. (Khan, Gani, Khanday, & Masoodi, 2017). Una alta cantidad de estudios han demostrado que esta molécula ha tenido actividades biológicas: en la reducción de crecimiento tumoral (Fukuda et al., 2003; Gonzaga, Ricardo, Heatley, & Soares, 2005; Kaneno et al., 2004; I. S. Kang et al., 2015; Xu, Yasuda, Mizuno, & Ashida, 2012; Ziliotto, Pinheiro, Barbisan, & Rodrigues, 2009), actividad como antibacteriano (Hetland et al., 2008) efectos inmunoestimulantes (Alzamora et al., 2007; Chan, WK, & Sze, 2009; Humberto et al., 1999; Kaneno et al., 2004; Kimura, Kido, Takaku, Sumiyoshi, & Baba, 2004; Liu & Sun, 2011; M. Mizuno, Morimoto, Minato, & Tsuchida, 1998; Sui et al., 2010; Tang et al., 2014), potencial antigenotóxico (Bellini et al., 2006; R. Delmanto et al., 2001), y capacidad antioxidante (Ishii et al., 2011; Müller, Gnoyke, Popken, & Böhm, 2010).

Los polisacáridos de las setas en estudio poseen una actividad antitumoral al activar la respuesta inmunitaria del huésped mas no atacan las células cancerígenas directamente (Therkelsen et al., 2016). Los  $\beta$  – glucanos extraídos de hongos o levaduras a

diferencia de los contenidos en cereales, tienen la capacidad de regular el sistema inmunitario estimulando receptores de membrana de células dendríticas, células M, enterocitos y mejorando la actividad fagocítica de macrófagos o la actividad antimicrobiana de neutrófilos y células mononucleares mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en una mayor proporción (**Pizarro C, Ronco M, & Gotteland R, 2014; Wang, Zhang, Li, & Zeng, 2004; Xu et al., 2012**), es decir mejoran la respuesta inmunitaria innata y mediada por células (**Khan et al., 2017**).

Pueden activar directamente los leucocitos, actividades fagocíticas, citotóxicas y antimicrobianas, en Japón *Lentinan* es un  $\beta$ - (1/3) -D-glucano en las paredes celulares de las masas de hifas que forman la fruta shitake (**Wang et al., 2004**), un hongo perteneciente a la misma familia de *Agaricus* fue aprobado para el tratamiento clínico del cáncer gástrico (**Du, Lin, Bian, & Xu, 2015**).

En el caso de acción a la presencia de beta glucanos en el organismo, se produce el reconocimiento por el receptor de membrana Dectin -1, Receptor 3 de complemento (CR3) y otros. Para Dectin – 1 los  $\beta$  – glucanos particulados son más fuertes que los solubles (**Sahasrabudhe & Dokter-Fokkens, 2016**). Después de su ingestión y liberación en la médula ósea esta sustancia es reconocida por células con CR3, monocitos granulocitos o macrófagos dicha unión produce respuesta inmunitaria: secreción de citoquinas o fagocitosis. Sin embargo, Dectin – 1 es el principal receptor del polisacárido influenciando en el SI innato y se expresa en células dendríticas, eosinófilos, monocitos, así como en linfocitos T y B (**Kanjan, Sahasrabudhe, de Haan, & de Vos, 2017**)

Esta sustancia extraña activa tanto al sistema inmunitario innato como al adaptativo, en la activación del SI innato se genera fagocitosis y producción de citoquinas, en mayor proporción TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) activando la secreción de interleuquinas, incrementando la liberación de NO y aumentando las inmunoglobulinas y la producción de células T y B (**Mizuno & Nishitani, 2013**). La activación del sistema inmunitario adaptativo se da por el reconocimiento de  $\beta$  – glucanos por las células presentadoras de antígenos y por linfocitos los cuales reaccionan con MHC II (Complejo de Histocompatibilidad II) y la consecuente secreción de citoquinas que activan las células B, y macrófagos (**Pérez-Guisado,**

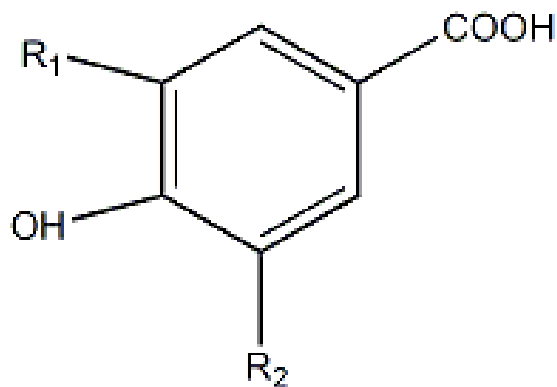
2007). En estudios realizados se ha demostrado que los  $\beta$  - glucanos son un regulador inmunitario para los receptores TLR2 y TLR4 (Kanjan et al., 2017). En la Figura 3 se esquematiza la acción del Sistema Inmunitario en contacto con los polisacáridos.



**Figura 3. Principio de acción de  $\beta$ - glucanos en el sistema inmunológico.** Una vez ingerido los polisacáridos llegan al intestino delgado y de allí pasan a los órganos del sistema inmunológico en donde son digeridos para formar moléculas más pequeñas las que son reconocidas como patógenos en donde el sistema inmunitario y adaptativo actúan para eliminarlas. Fuente: (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015; Pizarro C et al., 2014).

### 2.1.2.2 Compuestos fenólicos

También denominados polifenoles son compuestos aromáticos hidroxilados (Figura 4) formado por uno o más grupos hidroxilo y anillos aromáticos que representan un extenso grupo de metabolitos secundarios con estructuras químicas y actividades diferentes, no son comunes en bacterias hongos y algas debido a los escasos esqueletos hidroxilados de estos grupos al compararlo con las plantas en donde los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para su crecimiento y reproducción (Ferreira & Barros, 2009; María et al., 2007).



**Figura 4. Estructura de polifenoles hidrobenczoicos.** Formada por unidades fenólicas metiladas o esterificadas. Fuente: (Ferreira & Barros, 2009).

Los polifenoles se clasifican y subclasifican dependiendo su número de anillos fenólicos y los elementos estructurales asociados a este, destacan: ácidos fenólicos, lignanos, estibenos, flavonoides y alcoholes fenólicos. **(Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).**

En los hongos los ácidos fenólicos representan el porcentaje más alto de compuestos fenólicos **(Karaman, Jovin, Malbasa, Matavuly, & Popovic, 2010).**

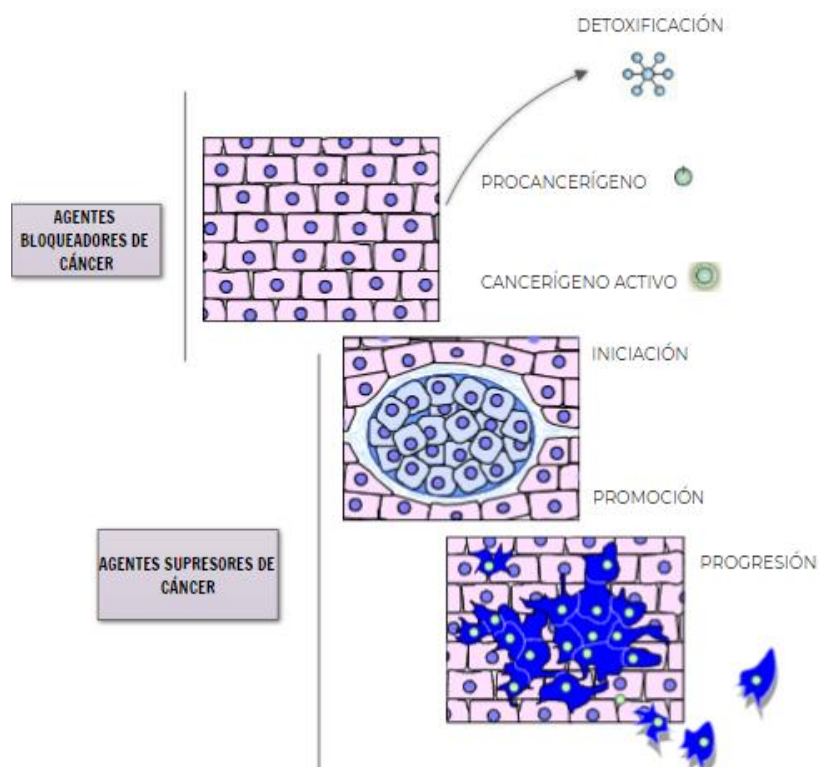
#### **Actividad biológica de compuestos fenólicos de AbM**

En los hongos se ha evidenciado la presencia de ácido gálico, ácido protocatéquico, y ácido p-hidroxibenzoico a los que se le atribuyen propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, y antiinflamatorias **(Ferreira & Barros, 2009).**

Una carga elevada de especies reactivas de oxígeno en el organismo puede generar una iniciación tumoral, los antioxidantes como los polifenoles en la etapa temprana de desarrollo del cáncer pueden evitar el daño oxidativo al ADN por dichas especies **(Granado, 2010).**

Es por ello que su actividad más importante radica en la actividad antioxidante, mediante varios mecanismos. El primero se basa en la donación de electrones para neutralizar las especies reactivas de oxígeno ROS (ion oxígeno, radicales libres y

peróxidos), el segundo mecanismo se basa en la capacidad de quelar los metales generados por las especies reactivas del oxígeno (Bederska-Łojewska et al., 2017), y por último mediante la modulación de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en las células (Granado, 2010). En la Figura 5 se esquematiza como los polifenoles con su capacidad antioxidante y antitumoral pueden interferir en distintas etapas del proceso del cáncer, ya sea inhibiendo la activación metabólica de los pro carcinógenos o su posterior interacción con el ADN.



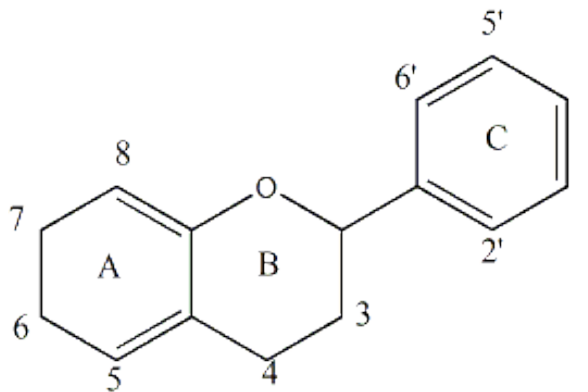
**Figura 5. Método de polifenoles de bloqueo o supresión en diferentes etapas de carcinogénesis.** Fuente: (Surh, 2003).

La subclase más abundante de los polifenoles son los flavonoides, estas moléculas de peso molecular bajo están constituidas por un esqueleto difenilpirano y dos anillos fenilo unidos por un anillo de pirano heterocíclico como se observa en la Figura 6. Estos a su vez se subclasifican de acuerdo al número y posición de grupos hidroxilo y



pueden ser flavonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

Este compuesto en el organismo actúa como una sustancia tampón, capaz de capturar radicales libres formando el radical flavínico el cual es menos reactivo, debido a que los electrones desapareados están más deslocalizados (Quiñones et al., 2012).



**Figura 6. Estructura básica de flavonoides.** Anillos aromáticos unidos por una cadena carbonatada. Fuente: (Manach et al., 2004).

### 2.1.2.3 Relación del cáncer con ABM

La OMS define al cáncer como “Un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo”, provocado por modificaciones en los genes encargados de controlar el crecimiento, división y otras funciones celulares. Existen más de 100 tipos de cáncer en base al lugar donde se localizan. El cáncer de cuello de útero o cervicouterino es una enfermedad provocada por la formación de células malignas en los tejidos del cuello uterino, como el cáncer de mama que es provocada por células cancerosas que diseminan en los tejidos de la mama (Instituto Nacional del Cáncer, 2017).

Los alimentos funcionales son una gran alternativa para contrarrestar enfermedades oncológicas, se especula que los polisacáridos de hongos previenen el cáncer y pueden tratar este tipo de enfermedad, estudios realizados por Tang et al. (2014) sugieren que

extractos de *Agaricus* llegan a ser citotóxicos para las células tumorales e inhiben el crecimiento de células cancerígenas humanas.

La mayoría de los compuestos antitumorales en hongos se atribuyen generalmente a sus polisacáridos (**Yamanaka et al., 2012**), se cree que un fitocomplejo de sus hidratos de carbono es el responsable de sus propiedades inmunoestimulantes y antitumorales. **Smith, Rowan, & Sullivan, (2002)** indican que la actividad anticancerígena puede actuar por dos vías, bien por la acción directa sobre las células malignas o mediada por *el sistema inmunitario. En cuanto a su mecanismo citotóxico directo* **Shimizu et al. (2016)** propone que *A. blazei* induce la propiedad tumoricida por el mecanismo apoptótico en las células cancerosas sin embargo el modo de acción del hongo es poco conocido. En relación a la actividad inmunomoduladora se considera a los interferones como posibles agentes anticancerosos por su capacidad anti proliferativa, citotóxica, y su eficacia para activar células del sistema inmunitario como los linfocitos (**Firenzuoli et al., 2008**).

## **2.2 Hipótesis**

La concentración de compuestos bioactivos incide en las actividades biológicas de *A. blazei*.

### **2.2.1 Hipótesis Nula (H<sub>0</sub>)**

La concentración de compuestos bioactivos no incide en las actividades biológicas de *A. blazei*.

### **2.2.2 Hipótesis Alternativa (H<sub>1</sub>)**

La concentración de compuestos bioactivos incide en las actividades biológicas de *A. blazei*.

## **2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **2.3.1 Variable Independiente**

Concentración de compuestos bioactivos

### **2.3.2 Variable Dependiente**

Actividades biológicas de *A. blazei*

## CAPÍTULO III

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### Reactivos

Agua destilada estéril, Etanol 96% ( $C_2H_5OH$ ), Fenol ( $C_6H_6O$ ), Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), Glucosa anhidra ( $C_6H_{12}O_6$ ), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Alemania), Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) (Merck, USA), Ácido gálico monohidratado ( $C_6H_2(OH)_3COOH.H_2O$ ) (Fisher Scientific, USA), Cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ), Acetato de sodio ( $NaC_2H_3O_2$ ), Quercetina, DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) (Sigma- Aldrich, USA), Metanol ( $CH_3OH$ ) (Scharlab SL, España), Trolox (Sigma- Aldrich, Alemania), Methyl Green (Sigma Aldrich 198080-10G), CellROX® Oxidative Stress Reagents (Life Technologies), Paraformaldehído 4%, Tritón 100X, DMSO (Invitrogen™), SDS (Invitrogen™), Aqueous Mounting (Ultra Cruz).

##### Material de cultivo celular

Histopaque® -1077 (Sigma- Aldrich, Alemania), azul tripán (Invitrogen), PBS 1X, FBS (Gibco™), RPMI Roswell Park Memorial Institute (Gibco™), Antibiótico penicilina/estreptomina, MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio (Invitrogen™), Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco™), DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco™)

## **Material de laboratorio**

Balones de aforo 10, 25, 100 ml, pipeta serológica 5ml, tubos de vidrio de 10ml con tapa, vasos de precipitación 25, 50, 100 ml, platos de aluminio, matraces de 250 ml, gradilla plástica, agitadores magnéticos, pipeta pasteur, microplacas 96 pocillos fondo plano 400ul, microplacas 96 pocillos fondo redondo 200 µl, pipetas descartables 5, 10 y 25 ml, tubos EDTA (Vacuette ®), Jeringuilla 1, 5 y 10 ml, tubos cónicos para centrífuga Falcon 15, 50 ml, pipeta multicanal, micropipetas, puntas estériles para micropipetas, tubos eppendorf 0,5, 1 y 2 ml, filtro 0,22 micras (Thermofisher).

## **Equipos**

Balanza analítica (Ohaus, México), plancha de calentamiento (Fisher Scientific, USA), Rota evaporador (IKA RU8, USA), equipo de filtración al vacío, balanza de humedad (Mettler Toledo, España), espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany), vórtex (Labnet, USA), espectrofotómetro UV-VIS para micro placas (accuSkan GO UV/VIS Microplate Fisher Scientific, Finlandia), espectrofotómetro IR (JASCO IR/FT 3200), lector de micro placas (Víctor X3, PerkinElmer), centrífuga (Hettich Zentrifugen, Alemania), Baño María (IKA, USA) Cámara de flujo (Thermo Fisher, USA), Incubadora de CO<sub>2</sub> (Panasonic, Japón), Microscopio óptico (SCOPE, USA), cámara de Neubauer, microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Extracción de compuestos bioactivos de *Agaricus blazei***

Se realizaron los estudios a partir del cuerpo fructífero seco y molido de *Agaricus blazei*, adquirido como producto de una marca comercial, de un cultivo en Tabacundo, provincia de Pichincha. La presentación de la muestra no implicó riesgo alguno de

contaminación al ser un producto seco y mantuvo de esta manera sus cualidades y propiedades durante los ensayos.

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción con la mayor concentración de compuestos bioactivos, se evaluó el tiempo de extracción y el tipo de disolvente manteniendo constante la proporción materia-disolvente de 1/15, y temperatura de ebullición en base a datos de investigaciones anteriores (**Camelini et al., 2005; Carbonero et al., 2012; Y. W. Kim, Kim, Choi, & Lee, 2005**).

En la Tabla 2 se muestran las condiciones de los 4 tratamientos en estudio para extraer la mayor cantidad de compuestos bioactivos de *Agaricus blazei*.

**Tabla 2**

*Condiciones de extracción de compuestos activos de A. blazei*

Variable Tratamiento	Temperatura (°C)	Materia/ Disolvente	Tiempo (min)	Disolvente
T1	100	1/15	60	Agua destilada
T2	100	1/15	120	Agua destilada
T3	100	1/15	60	Agua:Etanol (50 % v/v)
T4	100	1/15	120	Agua:Etanol (50 % v/v)

Para cada uno de los tratamientos se pesaron 10 g de hongo seco en polvo en una balanza analítica (Ohaus, México), a los tratamientos 1 y 2 se mezclaron con 150 ml de agua destilada, mientras que a los tratamientos 3 y 4 se los mezclaron con 150 ml de una solución agua etanol (50 % v/v) dentro de matraces de 250 ml. A estos se los sometió a calor en una plancha de calentamiento (Fisher Scientific, USA) con una temperatura interior de 100 °C ± 5 °C, a los tratamientos 1 y 3 por 1 hora y a los tratamientos 2 y 4 por dos horas.

Transcurrido el tiempo se filtraron al vacío para eliminar los residuos sólidos, y se obtuvieron 4 soluciones líquidas, T1 y T2 con un disolvente acuoso y T3 y T4 con disolvente etanólico.

De las soluciones con etanol fue necesaria su eliminación para evitar que intervengan en los próximos análisis de cuantificación de sus compuestos.

Este proceso se lo realizó colocando la muestra en un balón de 200 ml en un rota evaporador (IKA RU8, USA), con una temperatura de 60 °C, y una rotación de 100 rpm hasta la eliminación del alcohol contenido en la muestra por aproximadamente 15 minutos.

### **3.2.2 Caracterización de compuestos bioactivos de ABM**

#### **3.2.2.1 Determinación de sólidos totales**

Para determinar los sólidos totales en las muestras, se midió el porcentaje de humedad con una balanza de infrarrojo (Mettler Toledo, España), una vez encendida la balanza se colocó un plato de aluminio para medición y se taró el peso de la misma, se colocaron 3 g de muestra de cada uno de los tratamientos y por triplicado se midió la humedad. Por diferencia se determinó el porcentaje de sólidos totales como lo muestra la Ecuación 1.

$$\% \text{ SÓLIDOS TOTALES} = 100 - \% \text{ HÚMEDAD} \quad [Ec. 1]$$

#### **3.2.2.2 Cuantificación de fenoles totales: Método Folin – Ciocalteu en microplato**

El método se fundamenta en la reducción del reactivo de Folin por los compuestos fenólicos que llevan a la formación de un complejo azulado capaz de ser detectado por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 - 760 nm (**Carvajal de Pabón et al., 2011**). En un pH básico los compuestos fenólicos reaccionaron con el wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico contenidos en el reactivo de Folin, esto provocó el viraje de su característico color amarillo a un color azul intenso, por la reducción de  $W^{6+}$  y  $Mo^{6+}$  a  $W^{5+}$  y  $Mo^{5+}$  (**García, Fernández, & Fuentes, 2015**). Se empleó el método de **Al-Duais, Müller, V, & G (2009)** y **Müller, Gnoyke, Popken, & Böhm (2010)** con modificaciones de **Bobo-García et al. (2015)**.

En una placa de 96 pocillos de fondo plano de 400 µl se adicionaron 20 µl de cada solución diluida en proporción 1:40 de los extractos T1, T2, T3 y T4 de manera individual y de las soluciones estándar, a cada uno de estos se añadieron 100 µl de Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Alemania) en proporción 1:4 y se agitó por 60 segundos, se dejó en reposo por 240 segundos, transcurrido el tiempo se adicionaron 75 µl de una solución de carbonato de sodio 100 g/l (Merck, USA) y nuevamente se agitó la placa por 60 s, se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, y se midió su absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro para micro placas (accuSkan GO UV/VIS Microplate Fisher Scientific, Finlandia) y se procesaron los datos con la ayuda del software Skanit Software 4.1 for Microplate Readers.

Las soluciones estándar utilizadas para la elaboración de la curva de calibración se realizaron en concentraciones de 10, 20, 50, 100 y 200 mg/L de ácido gálico (Fisher Scientific, USA).

### **3.2.2.3 Cuantificación del contenido total de flavonoides: Ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio en microplato**

La determinación de la cantidad de flavonoides fue posible debido a la propiedad del compuesto de formar complejos estables con el catión aluminio en una solución de metanol, intensificando la absorción con un desplazamiento de longitudes de onda mayores detectadas a 415 nm en un lector de micro placas. Se empleó el método establecido por **Chatattikun, M, Choabchalard (2013) y Sandip, Shreewardhan, Sandeephan, Abhay, & Debjani (2014)** con modificaciones de **Sembiring, Elya, & Sauriasari (2018)**.

En una placa de 96 pocillos de fondo plano de 400 µl se colocaron 50 µl de los extractos de los 4 tratamientos previamente diluidos en una relación 1:40 en etanol 96 %, soluciones estándar de quercetina a diferentes concentraciones diluidos en etanol y como blanco etanol al 96 %, sobre esto se colocaron 10 µl de cloruro de aluminio al 10 % y sobre esta 150 µl de etanol al 96 %, seguido de 10 µl acetato de sodio 1 mol/l, a esta mezcla se la dejó en incubación a temperatura ambiente por 40 minutos protegido de la luz. Finalizada la incubación se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro lector de micro placas (accuSkan GO UV/VIS Microplate Fisher



Scientific, Finlandia) con ayuda del software Skanit Software 4.1 for Microplate Readers.

La reacción se provocó debido a que el cloruro de aluminio formó complejos ácido lábiles con los grupos hidroxilo en el anillo de los flavonoides (**Sembiring et al., 2018**). La curva de calibración se realizó con concentraciones equivalentes de quercetina en concentraciones de 30, 40, 50, 60 y 100 µg QE/ml.

#### **3.2.2.4 Cuantificación de polisacáridos: Método fenol – sulfúrico**

Para la cuantificación de los polisacáridos en el extracto se aplicó el método fenol – sulfúrico establecido inicialmente por **Taylor (1995)**, para la cuantificación de carbohidratos totales con modificaciones, para el ensayo se preparó una disolución al 1 % de los extractos acuosos y etanólicos de *A. blazei*, en tubos de ensayo de 10 ml con rosca, se agregó 1ml de la solución a cada tubo, 1 ml de fenol 5 % v/v y 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se sometió a una agitación vigorosa en un Vortex Mixer (Labnet, USA), generando una reacción exotérmica con un compuesto idóneo para ser leído por triplicado en un espectrofotómetro UV-VIS a 490 nm (A<sub>490</sub>)(HACH DR 5000, Alemania), en una cubeta de cuarzo de 3ml. Previamente bajo las mismas condiciones de lectura se elaboró una curva de calibración con soluciones estándar de glucosa con 5 diferentes concentraciones: 10, 40, 60, 80 y 100 µg/ml.

#### **3.2.2.5 Espectroscopia IR**

Para la obtención de información de la composición del extracto con la concentración más alta de moléculas bioactivas mediante el análisis de los grupos funcionales se empleó espectroscopia IR por transformada de Fourier. (FTIR)

Previo al análisis de la muestra se limpió el cristal de Seleniuro de Zinc del ATR (Attenuated Total Reflection) de un espectrofotómetro IR (JASCO IR/ FT 3200) con alcohol antiséptico y se eliminó el fondo con la ayuda del software Spectra Analysis

Jasco, posteriormente con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocó una gota de la muestra y se observó el espectro con el software mencionado, con un intervalo de frecuencia de barrido de 580 a 4150 nm.

### **3.2.3 Evaluación de las actividades biológicas de los compuestos bioactivos de *A. blazei***

#### **3.2.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante: DPPH Método en microplaca**

El método se basó en el procedimiento establecido por **Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995)**. Se disolvieron 1,15 mg de DPPH (Sigma- Aldrich, USA) en 100 ml de metanol (Scharlab SL, España) al 80 % y se aforó a 100 ml con el mismo disolvente para la solución de DPPH. En una placa de 96 pocillos de fondo plano con capacidad de 400 µl primero se añadieron para el blanco, y el blanco reactivo 20 µl de agua y para la muestra 20 µl de cada tratamiento diluido en agua/etanol (50:50), sobre el blanco se agregaron 180 µl de metanol al 80 % mientras que para el blanco reactivo y las muestras se añadieron 180 µl de DPPH en el menor tiempo posible, se realizó una agitación media y se incubó en oscuridad por 40 minutos. Después de la reacción se midió la absorbancia a 515 nm en un lector de micro placas (accuSkan GO UV/VIS Microplate Fisher Scientific, Finlandia) con el software Skanit Software 4.1 for Microplate Readers. Para la curva de calibración se empleó como solución estándar de Trolox (Sigma- Aldrich, Alemania) en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 µmol/l. Para determinar el porcentaje de inhibición de DPPH se aplicó la Ecuación 2.

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = \left(1 - \left(\frac{Abs_{muestra}}{Abs_{blanco reactivo}}\right)\right) \times 100 \quad [Ec. 2]$$

Previo a la evaluación inmunomoduladora y citotóxica de ABM fue necesario resuspender al tratamiento 1 en una solución de buffer debido a que el medio acuoso lisa las células eucariotas al ser aplicado directamente, para ello se eliminó el agua de

T1 mediante evaporación en un rota evaporador (IKA RU8, USA), con una temperatura de 60 ° C y 100 rpm y se resuspendió en PBS 1X (Gibco TM).

### **3.2.3.2 Evaluación de la actividad inmunomoduladora: Ensayo de viabilidad celular en linfocitos de sangre periférica humana**

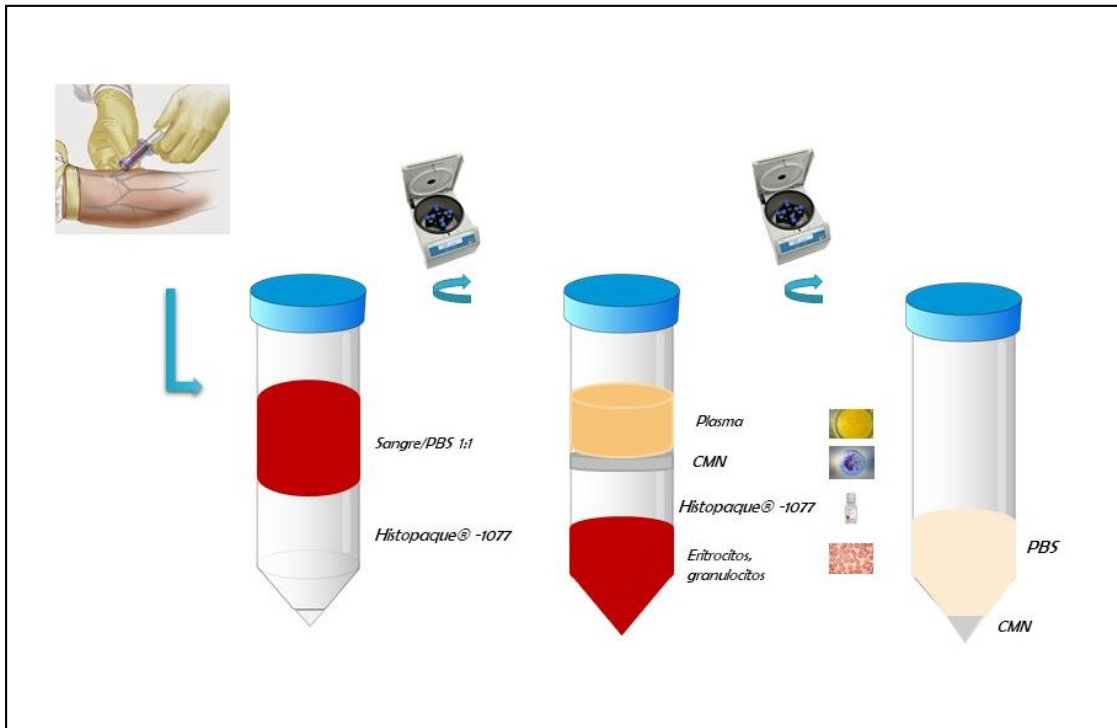
**Aislamiento de linfocitos:** El aislamiento de linfocitos se realizó mediante separación por gradientes de densidad empleando Histopaque® -1077 (Sigma- Aldrich) para la segregación de las células sanguíneas aplicando la metodología de la casa comercial del producto **Sigma-Aldrich (2002)** e indicaciones complementarias de **Alzamora et al. (2007)** y **Juárez Vázquez, Josabad, & Castro (2013)**

Se recolectaron 10 ml de sangre periférica humana de un paciente sano, y se los colocó en tubos de 4 ml con EDTA (Vacuette ®) con una suave agitación para evitar la coagulación de la sangre.

El volumen de 10 ml de sangre se mezclaron con 10 ml de PBS 1X (Gibco TM) para formar una solución menos densa dentro de un tubo FALCON de 50 ml. A la vez en 4 tubos FALCON de 15 ml se colocaron sin tocar las paredes 5 ml de Histopaque® - 1077, y sobre estos con mucho cuidado se vertieron 5ml de sangre diluida en PBS 1X en proporción 1:1, evitando que se mezclen ambas fases. A los cuatro tubos se los centrifugó por 30 minutos a 1500 rpm para separar por densidad las células mononucleares, en cada tubo se observó la formación de 4 fases, en la parte inferior del tubo precipitaron las células de mayor densidad sobre esta capa se suspendieron restos del reactivo y después un halo opaco con las células mononucleares, y en la parte superior de un color amarillento se separó el plasma sanguíneo

Después de la centrifugación se separaron 4 fases: el precipitado estaba compuesto por las células más densas los granulocitos de 1,087 - 1,092 g/ml y eritrocitos 1,092 a 1,093 g/ml en color rojo, sobre esta el reactivo Hystopaque con una densidad de 1,077 g/ml, en color marrón se observó un pequeño halo con las células mononucleares monocitos y linfocitos con una densidad en poco superior a 1,077 g/ml y finalmente la fase menos densa el plasma 1,025 a 1,029 g/ml. Se separó el halo con los linfocitos y se resuspendieron en PBS 1X para realizar dos lavados con centrifugación de

10 minutos a 1200 rpm. Al eliminar las células o partículas no deseadas se resuspendió a las células en medio RPMI 1640 (Gibco™) con glutamina, rojo fenol y enriquecido con FBS 10 % y P/S 1 %. El procedimiento se resume en la Figura 7 a continuación.



**Figura 7. Diagrama de aislamiento de linfocitos con Histopaque® -1077. (Hidalgo, 2018).**

Del volumen resuspendido se tomaron 50  $\mu$ l que se mezclaron con 50  $\mu$ l de azul tripán diluido (Invitrogen), en un eppendorf, para ser observados y contabilizados en la cámara de Neubauer.

**Crecimiento de células en micro placa de 96 pocillos 200  $\mu$ l:** Una vez determinada la densidad celular se sembró una placa de 96 pocillos con una concentración de  $1 \times 10^5$  células por pozo y se la dejó en incubación por 72 horas en incubadora (Panasonic, USA), de CO<sub>2</sub> 15 %, 37 ° C y atmósfera húmeda para que proliferen y se adhieran a la superficie de la placa.

**Preparación y aplicación de tratamientos:** Al igual que en la determinación de la actividad citotóxica se empleó el ensayo de MTT para verificar la proliferación celular, por ello transcurridas las 72 horas se aplicaron las diluciones seriadas de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-11}$  de manera descendente del extracto de ABM suspendido en PBS previamente esterilizado por filtración con micro filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  (Thermofisher),

**Método colorimétrico MTT:** Después de la exposición de los linfocitos a los tratamientos con el hongo se realizó el mismo procedimiento descrito en el método colorimétrico de la actividad citotóxica.

**Coloración de Methyl Green para Linfocitos:** Con el fin de evidenciar la morfología celular se subcultivaron linfocitos obtenidos por aislamiento con Histopaque® -1077 (Sigma Aldrich) en una placa de 6 pocillos con medio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado con 10 % FBS (Gibco™), 100  $\mu\text{g/ml}$  penicilina y 100 U/ml estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda por 24 horas sobre cubre objetos, transcurridas las 24 horas se aplicó el tratamiento en una concentración 5 mg en 2 ml por 48 horas. Para el control se realizó el mismo procedimiento sin la adición del tratamiento, seguidamente se fijaron con Paraformaldehído al 4 % por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó con PBS 1X y se tiñeron con Methyl Green (Sigma Aldrich 198080-10G) al 2 % diluido en agua destilada.

### **3.2.3.3 Evaluación de actividad citotóxica: Método colorimétrico MTT en líneas celulares de cáncer.**

Para detectar la acción citotóxica del extracto de *Agaricus blazei* en células cancerígenas se empleó el ensayo de MTT, mediante la cuantificación de la proliferación celular, el ensayo se basó en la reducción del MTT (bromuro de 3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolio), una sal de tetrazolio (amarilla) soluble en agua en un formazano insoluble (azul), cambio producido por la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas que para ser detectados a

una longitud de onda de 570 nm requieren disolverse en un disolvente orgánico (**Berridge & Tan, 1993; Van Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011**).

El ensayo consta principalmente de: la siembra y crecimiento de células en microplacas de 96 pocillos, la aplicación de tratamientos y la reacción con MTT. La metodología se basó en las especificaciones de la casa comercial del producto y protocolos de **Vaikundamoorthy, Krishnamoorthy, Vilwanathan, & Rajendran (2018)** y **Sathishkumar et al. (2015)** con modificaciones.

**Descongelación de células:** Se descongelaron 2 tipos de líneas celulares de cáncer: células HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), y células MCF - 7 (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>), las cuales se conservaban en FBS (Gibco<sup>™</sup>) con DMSO (Invitrogen<sup>™</sup>) al 10% en un criovial dentro de una atmósfera de nitrógeno líquido con una temperatura de -196°C.

Para el proceso de descongelación se resuspendieron a las células de cada línea celular individualmente en 5 ml de medio DMEM (Gibco<sup>™</sup>) suplementado con FBS (Gibco<sup>™</sup>) 5 % y 1 % antibiótico P/S, a 37°C dentro de un tubo cónico para centrífuga (Falcon<sup>™</sup>), el mismo que se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el botón celular obtenido en medio DMEM, completando un volumen aproximado de 12 ml se transfirieron las células a una frasca de 75 ml para que las células puedan crecer adheridas al fondo de la misma por 48 horas dentro de una Incubadora (Panasonic, USA), con una atmósfera húmeda, 5 % de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37 °C.

**Recuperación y crecimiento de células en placa de 96 pocillos:** A las células de HeLa y de MCF - 7 se las sometieron a un proceso de tripsinización para desprender las células de cada frasca, para ello se agregaron 3 - 4 ml de Tripsina EDTA 0,25 % con rojo fenol (Gibco<sup>™</sup>), se incubaron por 5 min, se agregaron inmediatamente de 6 a 8 ml de medio DMEM y se centrifugaron bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se recogieron los pellets y a cada uno se resuspendió en 3 ml de medio.

Para determinar el número de células viables se empleó el método de **Louis & Siegel, (2011)**, de cada suspensión celular se tomaron 50 µl y se mezclaron

con 50 µl de azul tripán (Invitrogen), de la mezcla se tomó 10 µl para cargar cada pozo del hemocitómetro y se contabilizó por triplicado el número de células viables (células no teñidas del colorante azul) en el microscopio óptico (SCOPE, USA) con el objetivo 40x.

Una vez conocida la cantidad de células por mililitro de cada suspensión celular, se cargaron 100 µl con una proporción de  $1 \times 10^4$  células en cada pozo de las micro placas de 96 pocillos con la ayuda de una micropipeta multicanal. Se dejaron las placas con cada tipo celular en incubación por 24 horas bajo las mismas condiciones mencionadas para que se adhirieran a la superficie de la placa.

**Preparación y aplicación de tratamientos:** Para eliminar sustancias extrañas y esterilizar el extracto de ABM diluido en PBS 1X, se difundió a través de un filtro estéril de 0,22 µm (Thermofisher), ejerciendo presión con una jeringa de 5 ml. Una vez estéril se realizaron diluciones seriadas de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-11}$ , empleando como disolvente medio DMEM suplementado. Se elimina el medio de las placas de 96 pocillos manteniendo adheridas las células, se realizaron 2 lavados con PBS y se añadieron los tratamientos de ABM previamente diluidos a partir de la segunda columna con un volumen de 100 µl por pocillo, mientras que en la primera columna se colocó como control negativo 100 µl de medio DMEM suplementado. Con los tratamientos añadidos se dejaron las placas en incubación por 48 horas.

**Método colorimétrico MTT:** Tras la incubación de células y aplicación de tratamientos se aplicó MTT (Invitrogen <sup>TM</sup>), para determinar cuantitativamente la proliferación celular.

Inicialmente se retiró el medio con los tratamientos de ambas placas y se las lavó por duplicado con PBS 1X para eliminar interferencias durante la lectura de resultados. Se diluyeron 5 mg de MTT (Invitrogen <sup>TM</sup>) en 1 ml de PBS 1X, y se agregaron 10 ml de medio DMEM suplementado y sin rojo fenol, de esta solución se añadió en cada pocillo de la placa de HeLa y MCF - 7 110 µl y se las dejó incubar por 4 horas, una vez transcurrido el tiempo se agregaron 100 µl de SDS (Invitrogen <sup>TM</sup>) 10 % - HCl 0,01 %, nuevamente se incubaron las microplacas toda la noche y al día siguiente en

un lector de microplacas (Perkin Elmer Victor X3), se determinó su absorbancia a 570 nm.

### **3.2.3.4 Pruebas Inmunocitoquímicas**

Para la expresión de ROS se subcultivaron  $5 \times 10^5$  células HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), células MCF7 (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>) y linfocitos aislados de sangre periférica humana, por pozo en placa de 6 pocillos con medio DMEM para HeLa, MCF-7, RPMI para linfocitos, suplementados con 10 % FBS, 100 µg/ml Penicilina y 100 U/ml estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda sobre cubre objetos; una vez transcurrido el tiempo de incubación de 24 horas se aplicó el tratamiento en diferentes concentraciones, durante 48 horas. Para el control se realizó el mismo procedimiento sin la adición del tratamiento, seguidamente se fijaron con Paraformaldehído al 4 % por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS 1X y se permeabilizaron con una solución de TRITON 100X. (Buffer 1X PBS 20mM Glicina 0,5 % Tritón 100X) se empleó la técnica inmunocitoquímica para el marcaje de ROS mediante el kit CellROX<sup>®</sup> Oxidative Stress Reagents (Life Technologies). Con una concentración final de 5 µmol/l, se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se lavó con PBS 1X transcurrido el tiempo de incubación, posteriormente se secaron y fueron montadas sobre un portaobjetos con Aqueous Mounting (Ultra Cruz). Para su visualización se empleó un microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania) empleando los filtros DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X.

Las imágenes microscópicas se capturaron en fotografías digitales a través del software Leica Application Suite (LAS X) y se cuantificó la intensidad de la fluorescencia de células positivas a través de un valor que se obtiene en relación a los pixeles de la fotografía y los que son considerados positivos.



### **3.3 Diseño experimental**

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción se aplicó un diseño factorial  $2^2$ , siendo los 2 factores de estudio tiempo de extracción y tipo de disolvente. Adicionalmente se empleó el programa Instat y Prisma Graphpad Versión 6, para realizar un análisis de varianza (ANOVA) entre los diferentes tratamientos aplicados con Post Test de Tukey, se consideró como nivel de confianza un 95 % y significativo todo valor  $p < 0,05$ .

Para el análisis de la actividad inmunomoduladora se empleó  $EC_{50}$  (Mitad de la Concentración Efectiva Máxima) y para la actividad citotóxica se empleó  $IC_{50}$  (Mitad de la Concentración Inhibitoria Máxima) con el software Prisma Graphpad Versión 6.

Para el análisis estadístico de la Inmunocitoquímica se cuantificó la intensidad para cell ROX y los resultados se presentaron como promedio  $\pm 1$  desviación estándar y se realizó el análisis estadístico comparando Control vs. Tratamiento.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis y discusión de los resultados

##### 4.1.1 Caracterización de compuestos bioactivos de *A. blazei*

Una vez obtenidos los extractos acuosos e hidroetanólicos del hongo *Agaricus blazei* en el cual se aplicaron 4 métodos diferentes de extracción denominados con las siglas T1 a T4 (Tabla 2) y previo a la cuantificación de los compuestos bioactivos se determinó la humedad y sólidos totales. Los ensayos para cada uno de los extractos se realizaron por triplicado.

La Tabla 3 muestra los porcentajes correspondientes a sólidos totales para los cuatro tratamientos.

**Tabla 3**

*Porcentaje de sólidos totales*

Tratamiento	%ST ( $\bar{X}$ )	DS
T1	3,63	0,15
T2	5,71	0,02
T3	15,24	0,22
T4	22,60	0,22

El promedio del porcentaje de sólidos totales se representa como % ST, junto con su respectiva desviación estándar DS.

En la Tabla 3 se evidencia menor cantidad de sólidos totales en T1 y T2 por lo que los extractos están menos concentrados que los extractos T3 y T4 de los cuales se eliminó por evaporación el etanol del medio de extracción.

Para la caracterización de los extractos se tomó en cuenta tres de las moléculas descritas con mayor actividad biológica: los fenoles totales, los flavonoides y los polisacáridos, aplicando protocolos con UV-VIS por triplicado.

La determinación de la concentración de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu se calculó a partir de la ecuación de regresión lineal de una curva de calibración con ácido gálico en concentraciones en un intervalo de 10 a 200 mg/l (Anexo B). Mientras que la determinación de la cantidad de flavonoides presentes en los extractos se realizó por el método colorimétrico de cloruro de aluminio, al igual que las otras biomoléculas se determinó su concentración partiendo de la ecuación de regresión lineal de una curva de calibración con quercetina en un intervalo de 30 a 100 mg/ml (Anexo C). Se cuantificó la concentración de polisacáridos por el Método Fenol Sulfúrico, la determinación de su concentración se realizó a partir de la ecuación de regresión lineal con una curva de calibración elaborada a partir de estándares de glucosa con concentraciones en un rango de 20 a 100 µg/ml (Anexo D). Cabe mencionar que para análisis posteriores se estandarizaron todas las concentraciones de las moléculas bioactivas a una sola unidad de expresión, en mg/g de materia seca mediante la relación con el porcentaje de sólidos totales (Anexo E).

En la Tabla 4 se muestran las medias de las concentraciones halladas para cada uno de los compuestos bioactivos de los 4 tratamientos aplicados.

**Tabla 4**

*Concentración de compuestos bioactivos*

Compuestos Bioactivos	Tratamientos	$\bar{X}$	DS
<b>Fenoles Totales</b> (mg GAE / g)	<b>T1</b>	21,27	0,28
	<b>T2</b>	16,67	0,06
	<b>T3</b>	14,84	0,19
	<b>T4</b>	16,23	0,02
<b>Flavonoides</b> (mg QE / g)	<b>T1</b>	2,34	0,11
	<b>T2</b>	2,21	0,07
	<b>T3</b>	1,50	0,04
	<b>T4</b>	1,85	0,01
<b>Polisacáridos</b> mg GLUC / g	<b>T1</b>	192,41	0,53
	<b>T2</b>	133,38	0,33
	<b>T3</b>	82,09	0,73
	<b>T4</b>	59,73	0,53

Contiene las medias (X) y desviación estándar (DS) de las concentraciones en mg/g de materia seca de los 3 componentes bioactivos evaluados en los extractos de *A. blazei*: fenoles totales, flavonoides y polisacáridos, para los 4 tratamientos cuyos valores resaltados son los de más alta concentración en cada grupo.

Se encontró una mayor cantidad de polisacáridos en todos los procesos de extracción mientras que los flavonoides se encontraron en menor proporción en los 4 tratamientos, en cuanto a los hidratos de carbono es importante señalar que la mayor concentración se registró en T1 con un valor de  $192,41 \pm 0,53$  mg GLUC/g, al igual que las otras dos moléculas, en fenoles totales una concentración de  $21,27 \pm 0,28$  mg GAE/g y en flavonoides una media de  $2,34 \pm 0,11$  mg QE/g.

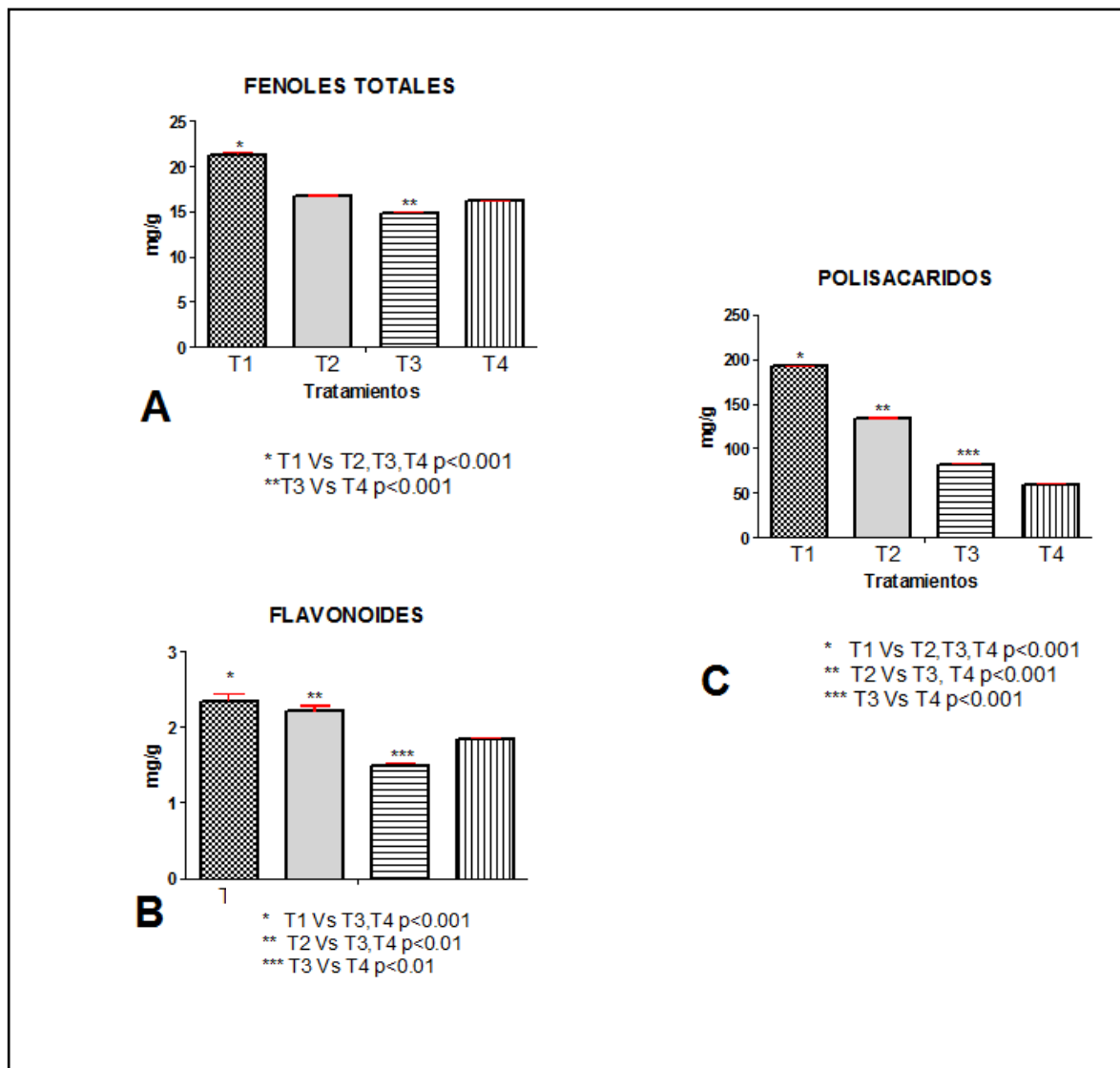
Se compararon los valores de la concentración de polifenoles en los tratamientos analizados con investigaciones previas bajo diferentes condiciones de extracción y en otras especies de hongos, en donde se observa que los valores obtenidos en el estudio son similares a otro tipo de extracciones. Cabe destacar el trabajo de **Boonsong, Klaypradit, & Wilaipun (2016)** quien analizó el contenido de polifenoles de Shitake, un hongo ampliamente estudiado, en la extracción acuosa se obtuvo una concentración de 36,19 mg GAE/g un valor más elevado que los encontrados en el presente estudio de 21,27 y 16,67 GAE/g, en el caso de la extracción con etanol al 50 % una concentración de 24,25 mg GAE/g en comparación a las concentraciones obtenidas de 14,84 y 16,23 GAE/g. Estudios a partir de la misma especie *A. blazei* como los de **Ferreira & Barros (2009)** obtuvieron concentraciones inferiores de 8,95 mg GAE/g, mientras que **Carneiro et al. (2013)** y **A. Carvajal, Koehnlein, Soares, Eler, & Nakashima, (2012)** obtuvieron valores superiores de concentración de polifenoles, 31,98 mg GAE/g y 20,00 mg GAE/g respectivamente. Las variaciones considerables se pudieron haber generado por distintos factores especialmente por las condiciones de extracción, purificación, cuantificación, sin dejar de lado la fuente del material fúngico.

En cuanto a la cantidad de flavonoides de los extractos con los tratamientos aplicados se obtuvieron valores de 2,34 y 2,21 mg QE/g para extractos acuosos y 1,50 y 1,85 mg QE/g para extractos con etanol (50 %). Como en el caso de polifenoles se comparó con estudios previos con valores cercanos a los encontrados, en este caso la extracción en disolventes acuosos brinda un mayor porcentaje de la molécula en la muestra en relación a disolventes como el etanol. **A. Carvajal, Koehnlein, Soares, Eler, & Nakashima, (2012)** halló un valor de 1,8 mg QE/g en extractos hidroalcohólicos al igual que en el ensayo realizado. **Boonsong, Klaypradit, &**

**Wilaipun, (2016)** para *Lentinus edodes* en agua caliente obtuvo una concentración de 3,75 mg QE/g y en etanol 50 % 1,64 mg QE/g.

El metabolito con mayor concentración al ser parte constitutiva de los hongos fueron los polisacáridos con concentraciones entre 50 y 200 mg/g, con mayores concentraciones en extracciones con agua caliente que extracciones etanólicas 50 %. En el caso de las cuantificaciones de polisacáridos de ABM realizadas por Jia et al. (2013) se hallaron concentraciones elevadas de carbohidratos debido a que se cuantificaron sustancias concentradas de polisacáridos a partir de procesos de purificación, no extractos semipuros, con un valor de 452,50 mg/g para una extracción con agua caliente cuantificado por el método fenol-sulfúrico valores aún mayores se evidenciaron en experimentaciones realizadas por **Liu & Sun, (2011)**, **Wu, Cui, Zhang, & Li, (2012)** y **Ferreira & Barros, (2009)** con concnetraciones de 934 mg/g, 946 mg/g y 949 mg/g en extractos puros de polisacáridos de ABM respectivamente. Sin embargo **Carvajal et al., (2012)** obtuvo valores dentro del rango hallado en la presente evaluación 121,20 mg/g para extracción hidroetanólica y **Gonzaga, Ricardo, Heatley, & Soares, (2005)** obtuvo una concentración en agua caliente únicamente de 47 mg/g.

Para la comparación de las concentraciones por moléculas en cada tratamiento, a continuación, se muestran las figuras obtenidas a través del análisis de varianza con Post Test de Tukey, tomando en cuenta un nivel de confianza del 95 % y se consideró significativo todo valor  $p \leq 0,05$ .



**Figura 8. Comparación de la concentración de compuestos bioactivos.** La Figura contiene las concentraciones de los extractos de ABM para los 4 tratamientos aplicados: (A) Fenoles Totales expresado en mg GAE/g, cuantificado por el método Folin – Ciocalteu en microplato, (B) Flavonoides por el método colorimétrico de cloruro de aluminio en microplato expresado en mg QE/g, (C) Polisacáridos por el método fenol-sulfúrico expresado en mg GLUC/g.

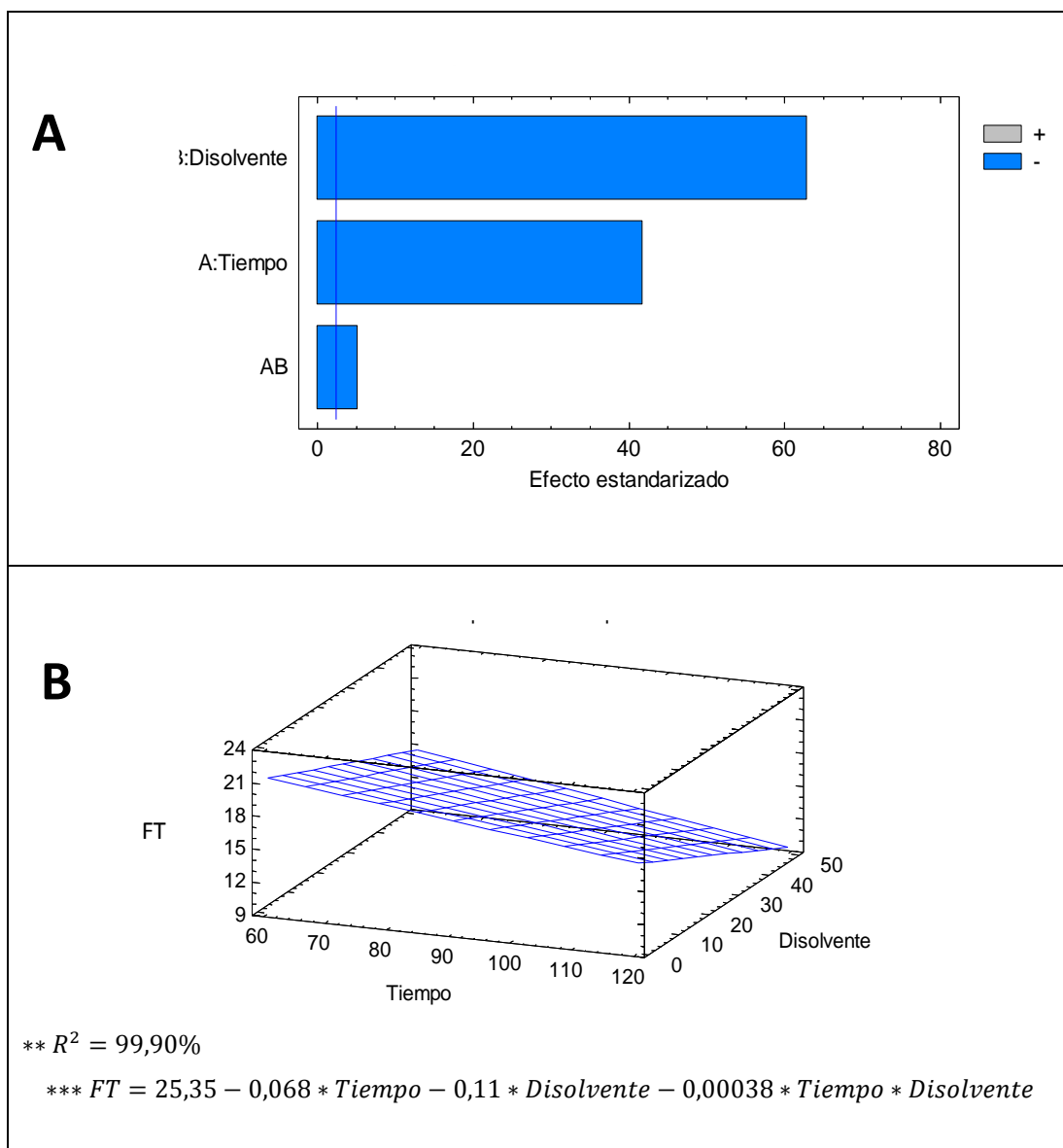
En la Figura 8, panel A se observa la concentración de fenoles totales para cada uno de los tratamientos, encontrándose diferencias significativas  $p > 0,001$  entre T1 vs T2 T3 Y T4 y entre T3 y T4. En el panel B se expresa la concentración de flavonoides para los 4 tratamientos, se evidenció diferencias significativas  $p > 0,001$  entre de T1 con T3, T4, de T2 con T3, T4 y finalmente T3 con T4. En el apartado C se expresa la

concentración de polisacáridos, hallándose diferencias significativas  $p > 0,001$  entre T1 con todos los demás tratamientos, T2 con T3 y T4, y T3 con T4.

#### **4.1.2 Optimización del proceso de extracción de componentes bioactivos de *A.***

##### ***blazei***

Para la optimización del proceso de extracción de los metabolitos secundarios de *A. blazei* con actividad biológica se evaluó un diseño factorial  $2^n$ , específicamente  $2^2$ , los factores analizados fueron: FACTOR A el tiempo con nivel bajo (-) 60 min y nivel alto (+) 120 min y FACTOR B: disolvente con nivel bajo (-) agua, y nivel alto (+) agua:etanol 50%. A través de diagrama de Pareto estandarizado y diagrama de superficie de respuesta estimada se analizaron los dos factores con sus dos niveles en las figuras a continuación para cada uno de los componentes bioactivos de ABM.

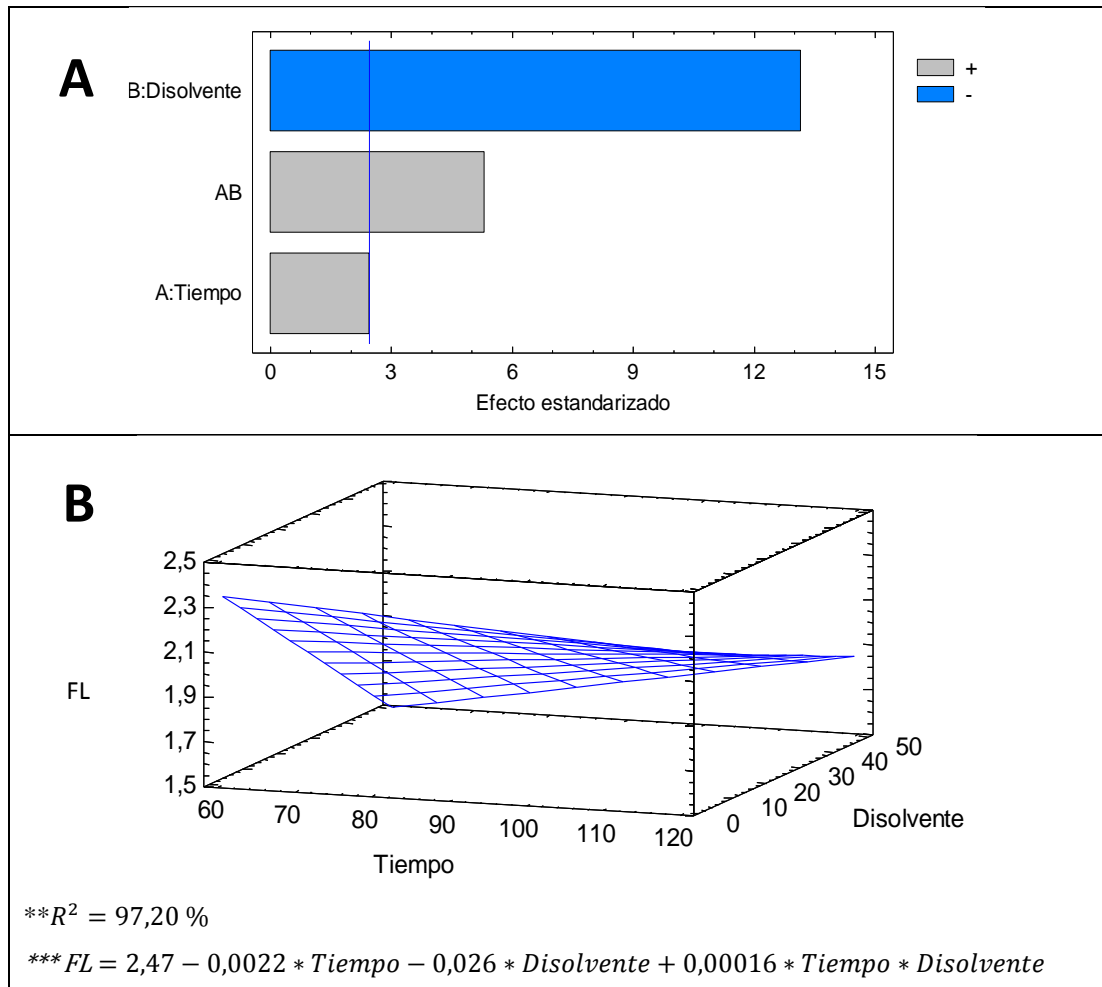


**Figura 9. Análisis de los factores óptimos para el proceso de extracción de fenoles totales de *A. blazei*.** (A) Diagrama de Pareto estandarizado para Fenoles Totales, en donde A corresponde al tiempo, B simboliza el disolvente y AB representa la interacción tiempo y disolvente de la extracción. (B) Superficie de respuesta estimada compara en 2 niveles los 2 factores analizados Tiempo (60 y 120 min) y Disolvente (Agua, Etanol 50 %) en base a la concentración de fenoles totales (polifenoles), además contiene el coeficiente de correlación (\*\*) y la ecuación del modelo ajustado para fenoles totales (\*\*\*).

El diagrama de Pareto estandarizado a partir de la tabla ANOVA de fenoles totales (Anexo F, Tabla F1) de la Figura 9, panel A indica una diferencia significativa,  $p < 0,05$  con un 95 % de confianza entre los factores de extracción: tiempo (60 min, 120 min), y disolvente (Agua, Etanol 50 %) y su interacción, así como una diferencia significativa entre los niveles de los factores en análisis en relación a la concentración de polifenoles de los extractos, cuyo grafico de superficie de respuesta estimada



(Figura 9B) corrobora que los niveles bajos 60 minutos en tiempo de extracción y agua como disolvente son los que dan mejores resultados para extracción de fenoles totales del macromiceto.

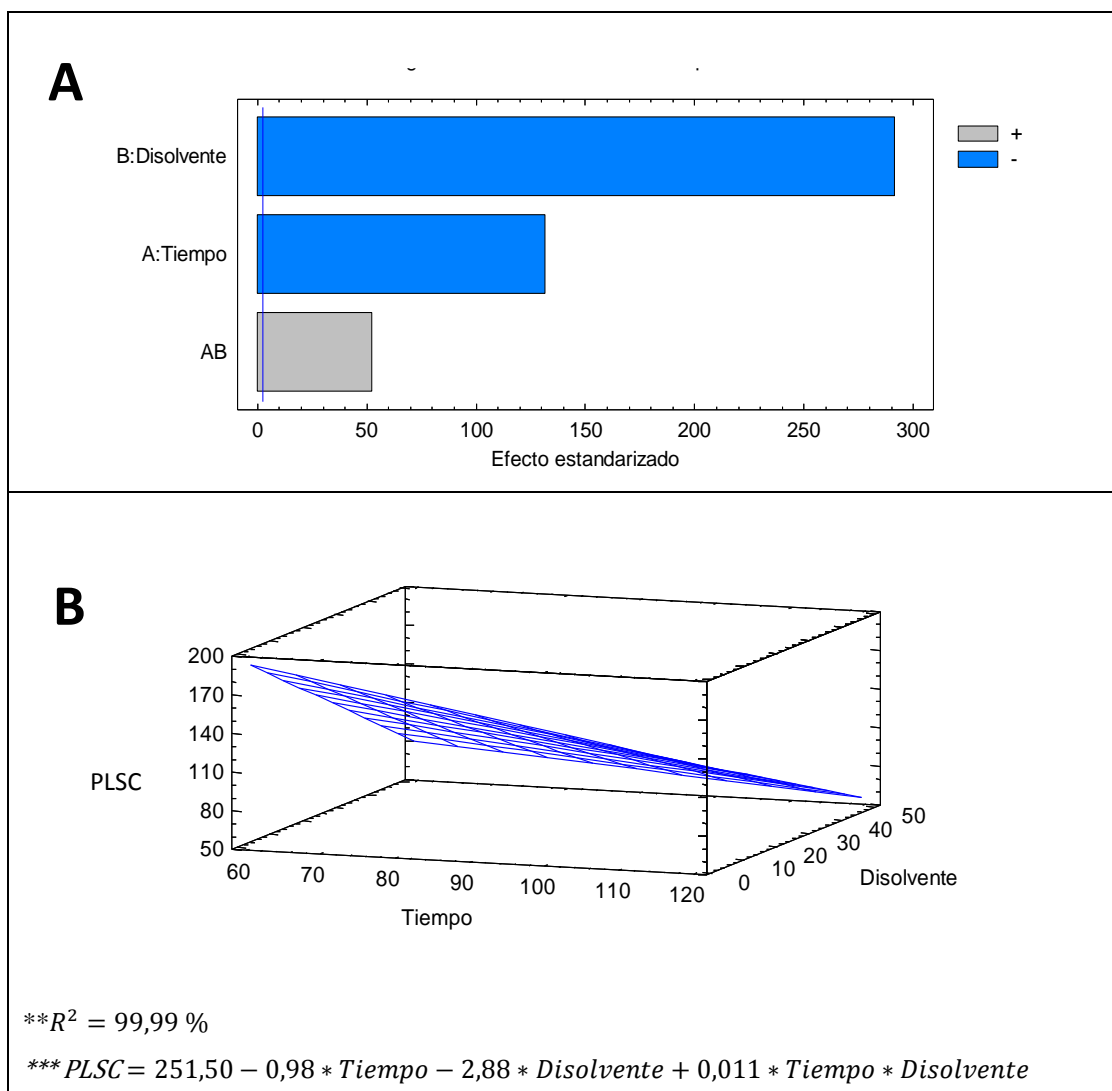


**Figura 10. Análisis de los factores óptimos para el proceso de extracción de flavonoides de *A. blazei*.** (A) Diagrama de Pareto estandarizada para Flavonoides, en donde A corresponde al tiempo, B simboliza el disolvente y AB representa la interacción tiempo y disolvente de la extracción. (B) Superficie de respuesta estimada compara en 2 niveles los 2 factores analizados Tiempo (60 y 120 min) y Disolvente (Agua, Etanol 50%) en base a la concentración de flavonoides, además contiene el coeficiente de correlación (\*\*) y la ecuación del modelo ajustado para flavonoides (\*\*\*).

El diagrama de Pareto estandarizado para flavonoides muestra diferencia significativa,  $p < 0,05$  con un 95 % de confianza entre los factores tiempo y disolvente de extracción (Anexo F, Tabla F2) así como su interacción, demostrando que el disolvente con mayor

influencia sobre la cantidad de flavonoides es el agua mientras que el factor tiempo influye de manera negativa, así como la interacción de sus factores y se puede observar en el diagrama de superficie de respuesta como 60 minutos y disolvente agua son los niveles que se destacan para la extracción.

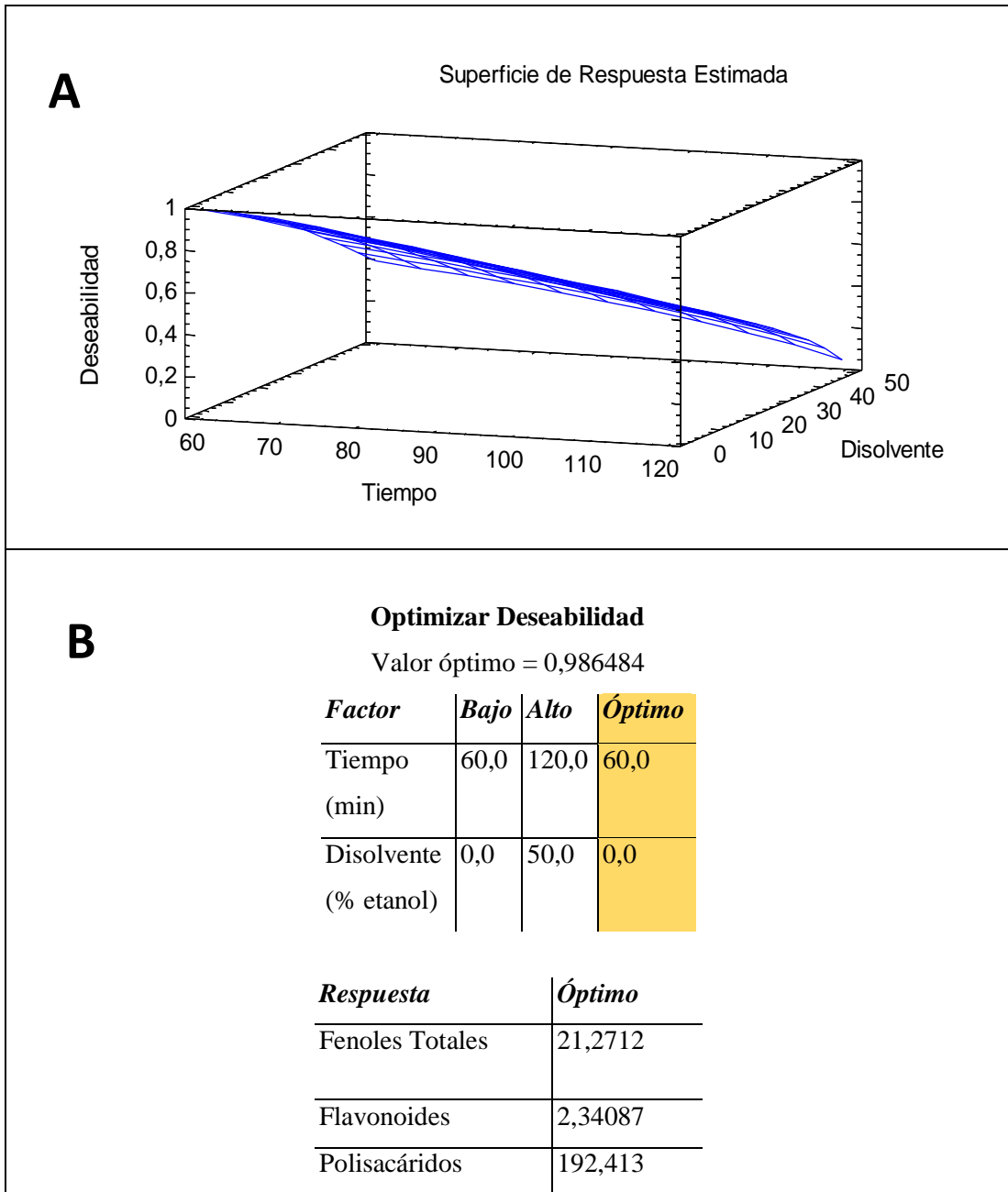
Generalmente para extracción de compuestos fenólicos polifenoles y flavonoides se emplean soluciones acuosas de acetona, metanol o etanol (**Pilar-Rojas & Martínez, 2014**), sin embargo la polaridad del agua también permite la extracción de este tipo de moléculas. **Paladino & Zuritz,(2011)** asegura que el agua tiene la capacidad de extraer con mayor eficiencia en relación a soluciones de acetona una mayor concentración de compuestos fenólicos, la influencia del disolvente es crucial así como la elección del tiempo de extracción que varía en respecto al disolvente y la fuente. **Ferreira & Barros (2009)** menciona que pese a que un tratamiento térmico puede influenciar en las propiedades de los polifenoles, el incremento de temperatura puede lograr que estos metabolitos puedan liberarse de su materia prima de una forma más eficaz.



**Figura 11. Análisis de los factores óptimos para el proceso de extracción de polisacáridos de *A. blazei*.** (A) Diagrama de Pareto estandarizada para Carbohidratos totales (polisacáridos), en donde A corresponde al tiempo, B simboliza el disolvente y AB representa la interacción tiempo y disolvente de la extracción. (B) Superficie de respuesta estimada compara en 2 niveles los 2 factores analizados Tiempo (60 y 120 min) y Disolvente (Agua, Etanol 50%) en base a la concentración de polisacáridos, además contiene el coeficiente de correlación (\*\*) y la ecuación del modelo ajustado para polisacáridos (\*\*\*).

Según el Diagrama de Pareto a partir de tabla de análisis de varianza para polisacáridos (Anexo F, Tabla F3), existió una diferencia significativa  $p < 0,05$  y 95% de confianza entre los factores tiempo, disolvente e interacción tiempo disolvente, Pareto y Superficie de respuesta estimada evidencian que el nivel (-), de ambos factores son los que dieron mejores resultados para concentración de carbohidratos en los extractos. Varios autores (Carbonero et al., 2012; Jaecheol Kim, Lee, Hwang, & Yoo, 2004;

Y. W. Kim et al., 2005; Santos-Neves et al., 2008) establecen que el agua es el mejor disolvente para extracción de polisacáridos de hongos, característica atribuible a la naturaleza hidrofílica de los glucanos.

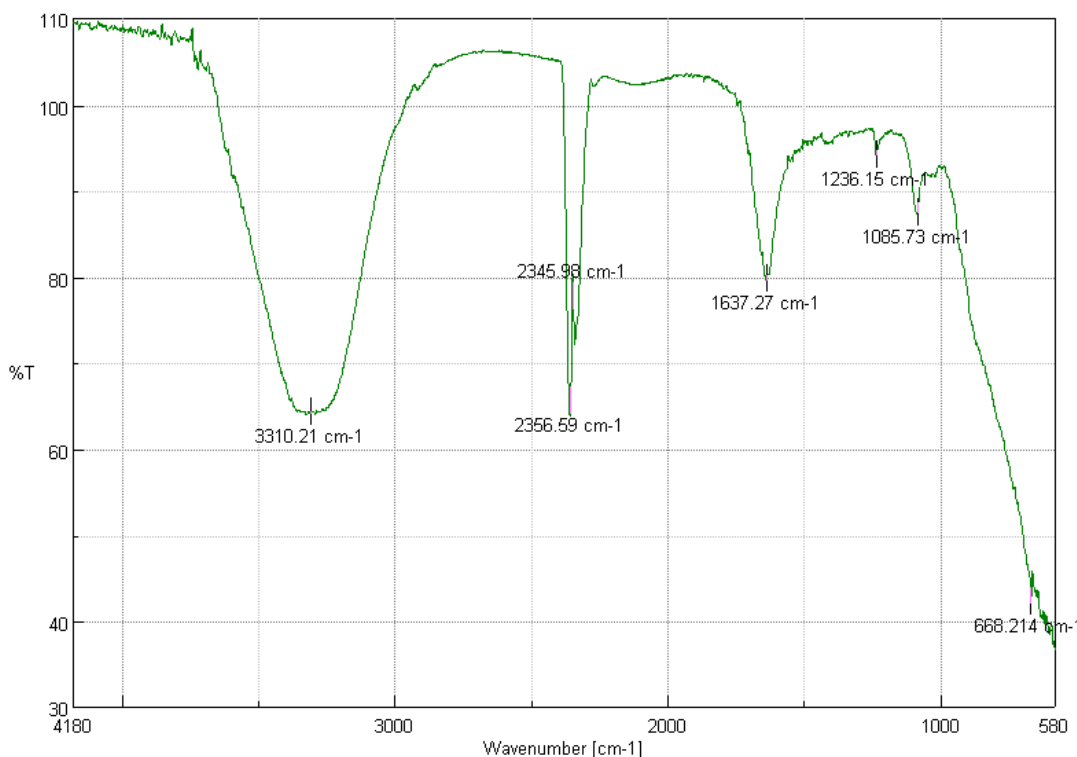


**Figura 12. Condiciones óptimas de extracción en función de la concentración de fenoles totales, flavonoides y polisacáridos.** (A) Superficie de respuesta estimada compara en 2 niveles los 2 factores analizados Tiempo (60 y 120 min) y Disolvente (Agua, Etanol 50%) en base a la concentración de los tres compuestos bioactivos analizados. (B) Valores óptimos de extracción de los factores A y B y mejores concentraciones de compuestos bioactivos para dichos parámetros.

Mediante el gráfico de superficie de respuesta del panel A, de la Figura 12 se determinó que las mejores condiciones de extracción en base a las concentraciones de las tres biomoléculas en análisis corresponden a los niveles inferiores de los 2 factores de extracción como lo indica el panel B de la Figura 12 el tiempo de extracción óptimo fue 60 minutos y el disolvente efectivo para los tres casos fue el agua, parámetros que corresponden al tratamiento 1, por ello se seleccionó dicho extracto para la evaluación de las actividades biológicas.

#### 4.1.3 Análisis espectro FTIR

Mediante espectrofotometría infrarroja se evaluaron los grupos funcionales relevantes de los componentes del extracto acuoso de *A. blazei* obteniendo el espectro representado en la Figura 13.



**Figura 13. Espectro FT/IR del extracto acuoso (T1) de *Agaricus blazei*.** Representa la extracción realizada con agua en proporción 1:15 a una temperatura de 100 °C por 60 min, en el eje de las abscisas se indica el número de onda en cm<sup>-1</sup> y en el eje de las ordenadas el porcentaje de transmitancia, en un intervalo de frecuencia de barrido de 580 a 4180 cm<sup>-1</sup>.

Debido a que en mayor proporción la concentración de polisacáridos sobresale sobre fenoles totales y flavonoides se consideró dicha molécula para el análisis el espectro de un polisacárido. La banda más representativa con un pico ancho e intenso está en número de onda  $3310,21\text{ cm}^{-1}$ , seguido de una banda a  $2356,59\text{ cm}^{-1}$  y otro en  $2345,98\text{ cm}^{-1}$ , se pueden observar picos con número de onda  $1637,27\text{ cm}^{-1}$ ,  $1236,15\text{ cm}^{-1}$ ,  $1085,73\text{ cm}^{-1}$  y  $1236,15\text{ cm}^{-1}$ , cada banda evidencia la presencia de distintos grupos funcionales.

Como se observa en la Figura 13 varios son los picos que sobresalen en el espectro sin embargo en el rango de  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  observa una banda intensa la cual corresponde a grupos hidroxilo (OH), por el gran número de OH en los residuos de **azúcar (Khan, Gani, Masoodi, Kousar, & Ahmad, 2014)** y las vibraciones causadas por las fuertes interacciones OH entre los polisacáridos, **(Maja Kozarski et al., 2015)**. Junto a esta banda aproximadamente a una longitud de onda de  $2900\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda pequeña generada por la vibración del estiramiento de C-H **(Ahmad, Gani, Shah, Gani, & Masoodi, 2016)**. Los valores entre  $2300\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$  representan el estiramiento C-H del anillo de azúcar **(Khan et al., 2015)**. Los enlaces en la zona de  $1600\text{ a }1650\text{ cm}^{-1}$  indican la presencia de enlace Carbono Oxígeno C-O, mientras que los picos entre  $1200\text{ y }950\text{ cm}^{-1}$  se relacionan a la presencia de enlaces C-O-C y C-O-H **(Jia et al., 2013)**, además **Y. Zhu et al., (2016)** sugiere la presencia de monosacáridos en el rango de  $1000\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$ .

Pese a que las últimas bandas del espectro no se expresan en alta intensidad, tienen suma importancia para la determinación de polisacáridos y el tipo de los mismos en el extracto acuoso analizado. El valor de  $1085,73\text{ cm}^{-1}$  propone la presencia de enlaces glucosídicos de tipo  $\beta$  al compararlo con el valor de  $1079$  hallado por Maja Kozarski et al. (2011) y de  $1080\text{ cm}^{-1}$  de la experimentación de **(Kozarski, Klaus, & Niksic, 2009)**.

Por otro lado **Pereira et al. (2015)** mantiene que valores cercanos a  $1242\text{ cm}^{-1}$  sugieren la presencia de complejos proteína- glucano y **Ren et al. (2014)** que las bandas cercanas a  $920\text{ y }1032\text{ cm}^{-1}$  son indicativas del enlace tanto  $\alpha$  como  $\beta$ . Análogamente otros autores proponen que los enlaces glucosídicos  $\alpha$  se expresan en una banda alrededor de  $1024\text{ cm}^{-1}$  y los enlaces  $\beta$ -glucosídicos a  $890\text{ cm}^{-1}$  **(Gonzaga, Menezes, De Souza, Ricardo, & Soares, 2013; Khan et al., 2017; Li et al., 2016)**

Al analizar el espectro se observó que contiene las bandas representativas de un polisacárido por lo que tomando en consideración lo propuesto por Kozarski se sugiere la presencia de glucanos con enlaces glucosídicos de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  en el extracto acuoso T1, basándose en el hecho que no se analizó un concentrado puro sino un extracto con varios tipos de moléculas.

#### **4.1.4 Actividad Antioxidante de extracto acuoso (T1) de ABM**

Se consideró de gran importancia la determinación de la propiedad antioxidante, la cual se realizó a partir de la determinación de la capacidad del extracto acuoso de ABM para eliminar radicales libres por donación de protones en el radical libre DPPH para formar moléculas estables. Dicha reacción generó una disminución en la absorbancia cuantificada a 515 nm, valores que se compararon con la curva de calibración (Anexo G) con relación directamente proporcional en  $\mu\text{mol Trolox/l}$  con el porcentaje de DPPH a partir de la una ecuación de la recta y un coeficiente de correlación 0,9952.

El extracto acuoso de ABM presentó menores resultados en su capacidad antioxidante a los esperados, con  $84,81 \pm 16,49 \mu\text{mol Trolox/g}$  de materia seca únicamente se eliminó el 13,01% de radicales de DPPH.

Estudios similares en extractos acuosos de *A.blazei* evidenciaron una mayor propiedad antioxidante, **Oliveira et al. (2007)** secuestró el 50 % de radicales libres con  $2,53 \mu\text{mol Trolox/g}$ , los extractos de **Kozarski et al. (2011)** lograron eliminar de un 80-90 % DPPH. Mientras que Jia et al. (2013) ensayó en extractos hidroalcohólicos con una capacidad de barrido de 94 – 97 % en concentraciones de 5 -20 mg/ml y en extractos acuosos calientes un 45,6 a 52,6 % con el mismo intervalo de concentración.

#### **4.1.5 Actividad inmunomoduladora de ABM**

Una vez analizadas las condiciones de extracción se determinó que el T1 contenía la mayor cantidad de compuestos bioactivos, motivo por el cual se empleó para evaluar

la capacidad inmunomoduladora que poseen los metabolitos en linfocitos extraídos a partir de sangre periférica humana.

Previo a la evaluación de la actividad inmunomoduladora y citotóxica se eliminó el disolvente de T1 y se resuspendió en PBS 1X, con lo que se obtuvo la disolución de concentración  $10^0$ , la Tabla 5 muestra las cantidades de compuestos bioactivos en dicha solución.

**Tabla 5**

*Concentraciones de compuestos bioactivos de extracto diluido*

Extracto Diluido	Concentración total	Polifenoles	Flavonoides	Polisacáridos
$10^0$	483 mg/ml	10,27 mg/ml	1,13 mg/ml	92,93 mg/ml

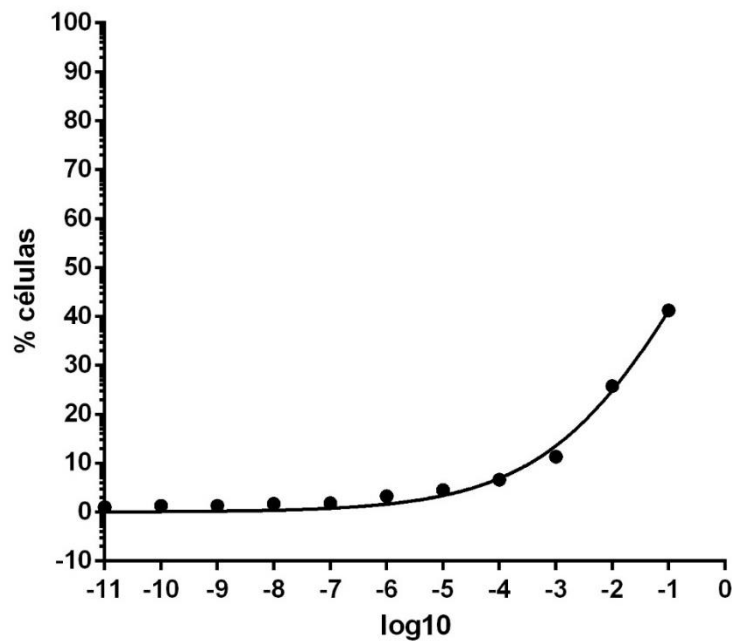
La tabla contiene la concentración general de gramos sobre mililitros de PBS 1X del extracto concentrado del extracto acuoso T1 de ABM, junto con sus concentraciones de compuestos bioactivos.

Diversas investigaciones han establecido que los metabolitos secundarios de ABM actúan sobre diferentes receptores biológicos del sistema inmunitario (SI), sin embargo **Firenzuoli et al. (2008)**, establece que la modulación del SI, se genera con la activación de linfocitos macrófagos y neutrófilos, de allí la importancia de evaluar la proliferación de dichas células sanguíneas (**Kakuta, Tanigawa, Kikuzaki, & Misaki, 2002**).

A través del ensayo de MTT se evaluó la viabilidad celular de linfocitos de sangre periférica humana para determinar si estimula o inhibe el crecimiento de células inmunitarias. A continuación en la Figura 14 a partir de los datos de Anexo H, se puede evidenciar el incremento del porcentaje celular a medida que se aumenta la concentración del compuesto, el incremento celular fue de un 41,25 %, expresada mediante una curva de viabilidad celular directamente proporcional a la concentración del tratamiento empleado en diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-11}$  en  $\log_{10}$  siendo la dilución de  $10^{-1}$  la que eleva en una mayor proporción la proliferación de células de linfocitos, se obtuvo un valor de  $EC_{50}$  de  $0,30 \pm 0,088$  mg/ml, sin descartar la efectividad del extracto en un rango de 0,18 a 0,47 mg/ml.



## MTT LINFOCITOS



**Figura 14. Ensayo de proliferación celular de linfocitos de sangre periférica humana con extracto de ABM**

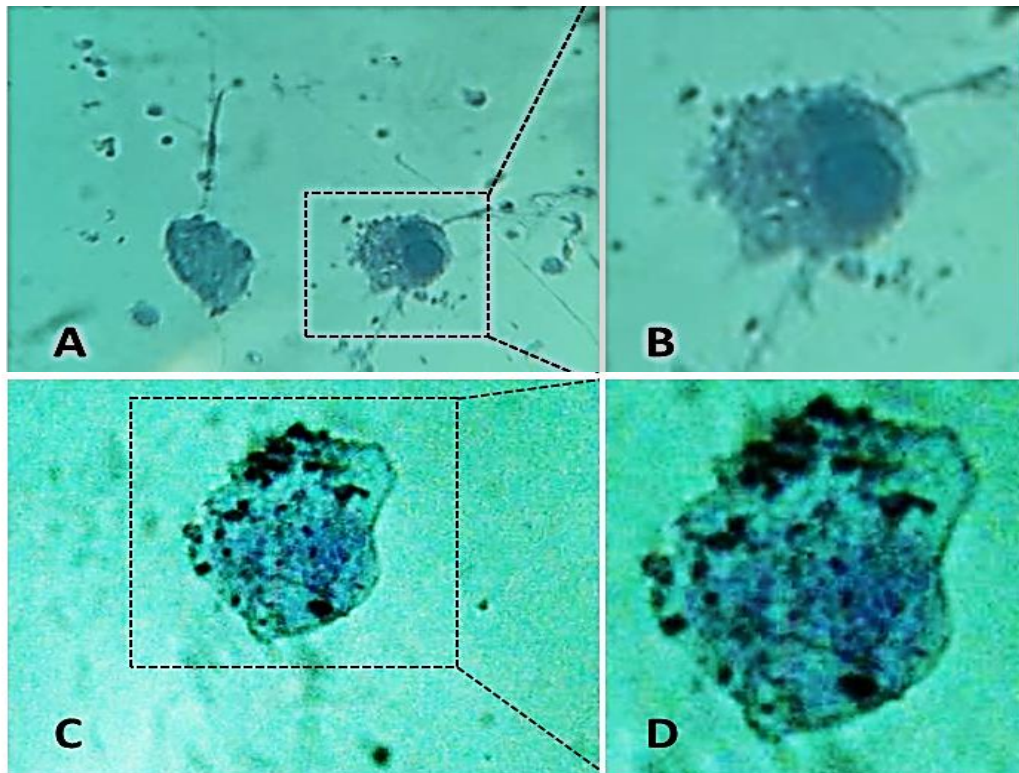
Los valores demostraron que *A. blazei* tiene la capacidad de estimular el crecimiento de linfocitos por lo tanto estimula la actividad del sistema inmunitario, no inhibe el crecimiento de este tipo celular, como lo asegura **Tangen, Holien, Mirlashari, Misund, & Hetland (2017)**, demostrando que los extractos de ABM no tienen efecto tóxico sobre células mononucleares periféricas humanas (PMNC). adicionalmente **Takimoto, Wakita, Kawaguchi, & Kumazawa (2004)** halló que extractos de *A. blazei* incrementaban el crecimiento de linfocitos T citotóxicos y células NK lo que indica que la estimulación del SI se da tanto en el Sistema inmunitario innato como en el adaptativo.

Pese a que no se encontraron experimentaciones bajo las mismas condiciones y ensayos que evalúen la proliferación de linfocitos, es bien conocido que los polisacáridos son el ingrediente biológicamente activo principal de la seta los cuales poseen la capacidad de estimular los linfocitos T (**Mizuno et al., 1998**). **Willment, Gordon, & Brown (2001)** indican que los polisacáridos pueden tener diferentes estructuras químicas sin embargo en su mayoría poseen actividades

inmunomoduladora. **Yamanaka et al., (2012)** identificó que para  $\beta$  – glucanos derivados de hongos *Agaricus* las células dendríticas son las encargadas de realizar la función efectora específica para la modulación del SI, mientras que **Mendiola, (2017)** realizó extracciones sucesivas con agua caliente a *Pleurotus sajor- caju* un tipo de hongo altamente consumido al igual que ABM por sus propiedades empleadas en la medicina tradicional el cual sugiere que los glucanos del hongo tienen un efecto inmunoestimulador.

La estimulación de las células del SI por polisacáridos de hongos se genera básicamente porque estas moléculas forman parte de ciertas bacterias y hongos patógenos que cuando entran en contacto con el organismo este genera el incremento de la defensa inmune mediante la activación de los sistemas de complemento, fagocitosis o la producción de citoquinas (**Akramien, Kondrotas, Did, & Egidijus; Yamanaka et al., 2012**). Reportes han demostrado uniones de los azúcares a sus receptores específicos se dan en Dectin - 1 del complemento tipo 3 (CR3) o bien en Lactoceramida. (**Huang et al., 2012**). ABM incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocitocinas (**Førland, Johnson, Tryggestad, Lyberg, & Hetland, 2010; Wisitrassameewong et al., 2012**).

Morfológicamente se hallaron cambios en la estructura de los linfocitos después de la exposición al tratamiento con ABM, mediante la tinción con Methyl Green observados en un microscopio óptico (SCOPE, USA), con un aumento 100X las fotografías a continuación muestran células de linfocitos aislados con y sin tratamiento aplicado.



**Figura 15. Linfocitos tratados con ABM, teñidos con MethylGreen observados al microscopio (100x).** Se observan linfocitos aislados y teñidos con MethylGreen: observados en un microscopio óptico (100X): (A, B) linfocitos sin tratamiento. (C, D) linfocitos tratados con ABM.

El apartado A y B de la Figura 15 contienen la fotografía de un linfocito sin aplicación de ABM con una morfología esférica característica con su núcleo definido, mientras que en las células tratadas con 5  $\mu$ l de ABM por 24 horas del panel C y D se observan cambios morfológicos de los linfocitos, con una superficie y la presencia de cúmulos irregulares en su estructura.

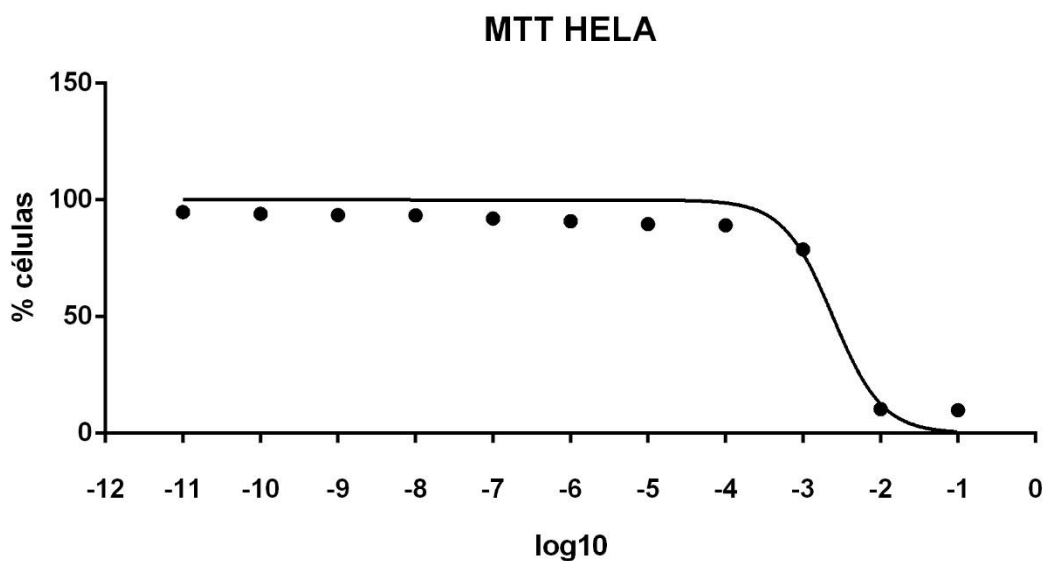
#### **4.1.6 Actividad citotóxica de ABM en células cancerígenas**

Se empleó el ensayo de MTT para determinar la Mitad de la Concentración Inhibitoria Máxima denominada  $IC_{50}$ , parámetro que indica la capacidad de inhibir la proliferación de las células cancerígenas.

En la medicina tradicional se ha considerado que los polisacáridos de *A. blazei* son los encargados de la prevención de la oncogénesis, por su actividad antitumoral directa o mediante la prevención de metástasis tumoral (**Wisitrassameewong et al., 2012**), esta actividad antitumoral de los polisacáridos está estrechamente relacionada con su

actividad inmunomoduladora e inmunoestimulante (He, Zhang, Ru, Dong, & Sun, 2014), factores que permiten la eliminación de células con alteraciones del ADN funcionando también como una sustancia preneoplásica (Ishii et al., 2011). posiblemente por el control de la inflamación a través de patrones inmunoestimuladores (Mo et al., 2017).

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad realizado en cultivo de células HeLa (ATCC® CCL-2™), tratadas con el tratamiento T1 del basidiomiceto resuspendido en PBS 1X.



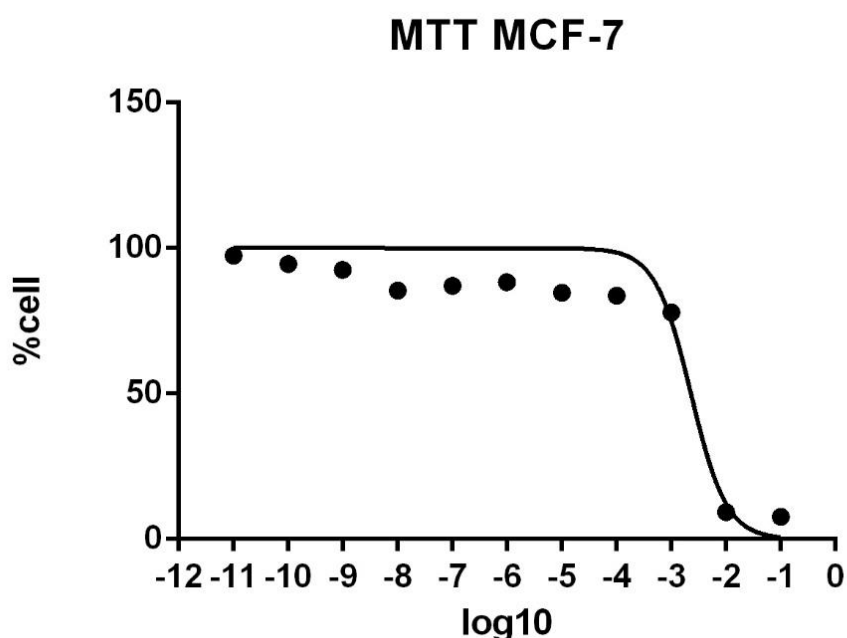
**Figura 16. Ensayo de citotoxicidad en células HeLa (ATCC® CCL-2™) tratadas con ABM.**

Se generó una curva de viabilidad celular inversamente proporcional a la concentración del tratamiento a partir de los datos del Anexo I, empleado en diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-11}$  en  $\log_{10}$ , cabe destacar que en la concentración de  $10^{-3}$  ocurrió una modificación drástica en la concentración celular reduciendo la población de un 100 % a un 9,93 %. El  $IC_{50}$  obtenido fue de 0,0024 mg/ml, con capacidad anti proliferativa en células HeLa en un rango de 0,0013 a 0,0047 mg/ml.

Otros hongos brasileños distintivos como *Lentinula edodes* y *Pleurotus sajor-caju* fueron evaluados por su capacidad antitumoral en células de carcinoma de cérvix, los extractos acuosos de dichos hongos en células HeLa demostraron un IC<sub>50</sub> equivalente a 0,0078 mg/ml y 0,0025 mg/ml respectivamente (Finimundy et al., 2013). En la misma línea celular otro tipo de polisacáridos de la cepa de *Fusarium* mostró un IC<sub>50</sub> de 0,0019mg/ml por ello el autor sugirió adición en la dieta como alternativa para combatir la generación tumoral (Salehi, Bayat, Dezfulian, Sabokbar, & Tabaraie, 2016). Es de relevancia mencionar uno de los hongos de elevado consumo mundial, *Agaricus bisporus* conocido también como hongo blanco, cuyo extracto acuoso expresó un valor de IC<sub>50</sub> de 0,037 mg/ml, la misma investigación mostró para extractos en agua caliente de los hongos *Lentinula edodes* *Pleurotus ostreatus* un IC<sub>50</sub> de 0,0179 y IC<sub>50</sub> 0,0391 (Younis et al., 2014).

Al comparar los valores de IC<sub>50</sub> de la exposición de *L. edodes* con extractos acuosos de la seta en estudio se observaron valores muy alejados, al igual que en experimentos similares de exposición de células HeLa a extractos acuosos de ABM, se sugiere que grandes variaciones en los datos se pueden producir por los cambios en la variación del tipo de hongo, las condiciones de extracción, y el tiempo de exposición de las células al tratamiento, cabe recalcar que para esta experimentación se mantuvo la exposición por 48 horas. Sin embargo, el bajo valor obtenido de IC<sub>50</sub> sugiere un alto potencial citotóxico de ABM en células de cáncer cérvico uterino.

Se analizó además la capacidad antiproliferativa en células de cáncer de mama, en la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad evaluado en cultivo de células MCF - 7 (ATCC® HTB-22™) tratadas con el extracto acuoso de ABM (T1) resuspendido en PBS 1X.



**Figura 17. Ensayo de citotoxicidad en células MCF - 7 (ATCC® HTB-22TM) tratado con ABM.**

A partir del ensayo de MTT (Anexo J) se generó una curva de viabilidad celular inversamente proporcional a la concentración del tratamiento empleado en diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-11}$  en  $\log_{10}$ , cabe destacar que en la concentración de  $10^{-3}$  se evidenció un cambio drástico con una disminución en la concentración celular del 100% a un 7,72 %. El  $IC_{50}$  para esta línea celular fue de 0,0023 mg/ml, con capacidad citotóxica de ABM en células de cáncer de mama en un intervalo de 0,00092 a 0,0057 mg/ml.

En estudios similares de *A.blazei*, testeado *in vitro* en células de MCF-7 su capacidad anticancerígena **Widyawaruyanti (2017)** demostró un  $IC_{50}$  de 0,024717 mg/ml para extractos con metabolitos de ABM en hexano y 0,21564 mg/ml empleando como disolvente de extracción el cloroformo. Del mismo modo **Ziliotto et al. (2009)** en extractos de ABM en hexano obtuvieron un  $IC_{50}$  DE 0,250 mg/ml. Para ambos casos resulto nula la actividad de extractos acuosos a diferencia de los resultados hallados en el presente estudio.

En contraste se han analizado los valores de  $IC_{50}$  para otros tipos de hongos con actividades biológicas en células de MCF-7 como en el caso de hongos degradantes de

madera con valor inhibitorio medio de 0,002 mg/ml (Matuszewska, Jaszek, Stefaniuk, Ciszewski, & Matuszewski, 2018).

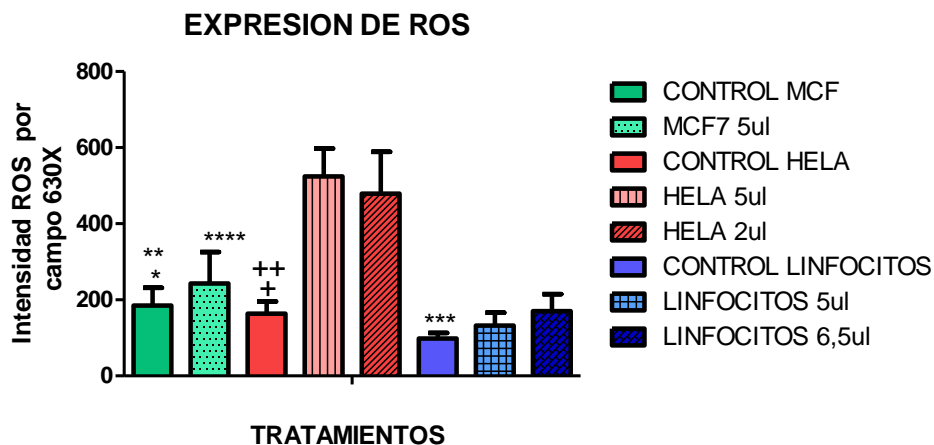
Al igual que en las células HeLa existen reportes sobre extractos acuosos de *Agaricus bisporus* sobre células de CaMa por ser uno de los hongos más consumidos a nivel mundial seguido de *Pleurotus ostreatus*, en MCF-7 mostraron una alta capacidad antiproliferativa en células cancerígenas lo que sugiere que dichas especies de hongos pueden actuar como quimiprotectores en este tipo de cáncer (**Martin & Brophy, 2010**).

Al igual que en células HeLa, al analizar los datos se observaron variaciones significativas entre los valores hallados y los reportados en literatura, estas diferencias pueden sugerir que en distintas condiciones de extracción y variaciones en tiempo y reactivos de MTT, sin embargo los valores de la concentración inhibitoria media máxima hallada para células MCF – 7 y células HeLa indican una alta capacidad antiproliferativa en células malignas para el organismo debido a que requieren menos cantidad de extracto para dar un resultado eficiente.

Cabe recalcar que fracciones de ABM han sido evaluadas en otro tipo de líneas celulares cancerígenas por ejemplo **Tung, Su, Kuo, & Sheen (2012)** mostró que ABM inhibió el crecimiento de en líneas celulares de adenocarcinoma hepático humano SK-Hep-1 y HA22T/VGH con IC<sub>50</sub> de 0,026 y 0,028 mg/ml respectivamente mediante una vía apoptótica en tratamientos de 48 horas. **Wu et al. (2012)** evaluó el efecto inhibitor en el crecimiento de células de osteosarcoma humano en células HOS tratadas con ABM mientras que **Gao et al. (2007)** demostró efectos antiproliferativos en células humanas de leucemia promielocítica aguda HL-60. Dichos estudios evidencian la elevada capacidad citotóxica de ABM en células cancerígenas con un amplio espectro de tipo de enfermedades oncológicas.

#### **4.1.7 Pruebas inmunocitoquímicas de cuantificación de estrés oxidativo**

Se evaluó la producción de ROS total a través de un ensayo inmunocitoquímico el cual se analizó de acuerdo a la cuantificación de la intensidad de expresión en tres líneas celulares: Linfocitos, HeLa y MCF-7. Como se observa en la figura a continuación.



- \*  $p < 0.05$  Control MCF7 vs Tratamientos 5ul MCF7 y linfocito 6,5ul
- \*\*  $p < 0,001$  Control MCF7 vs Tratamientos 2 y 5ul HELA, Linfocitos 5ul
- \*\*\*  $p < 0,01$  Control MCF7 vs control linfocitos
- \*\*\*\*  $p < 0,001$  Tratamiento 5ul MCF7 vs control HELA, 5ul HELA, 2ul HELA, control Linfocitos y linfocitos 6,5ul
- +  $p < 0.01$  Control HELA Vs tratamiento HELA 2 y 5 ul
- ++  $p < 0.05$  Control HELA Vs Control linfocito

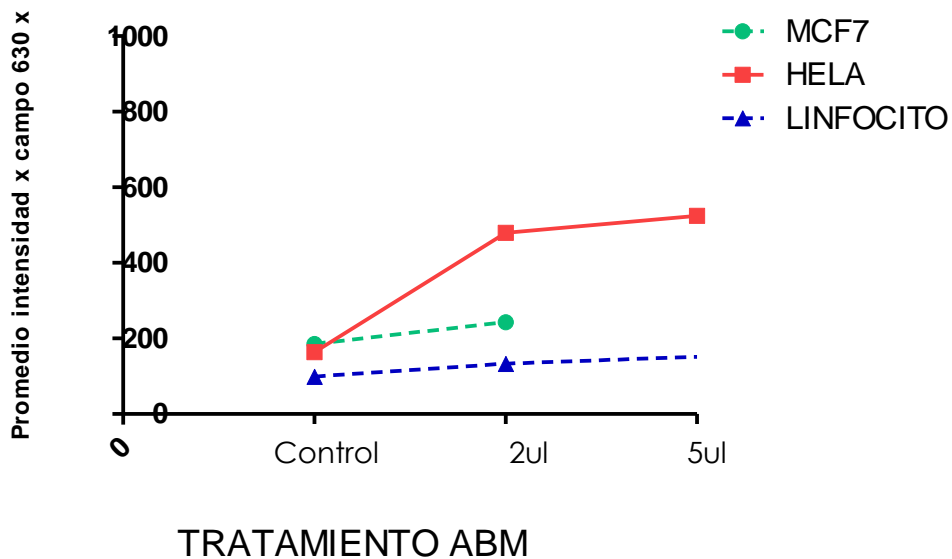
**Figura 18. Expresión de especies reactivas de oxígeno de acuerdo a la concentración de ros en función de la intensidad de fluorescencia por campo 630X en líneas celulares tratadas con ABM a diferentes concentraciones mediante CellRox® oxidative stress reagents.**

Los datos obtenidos a través de microscopía de fluorescencia fueron analizados a través de test de varianza con post test de TUKEY. En la Figura 18, se observa la expresión de ROS en tres líneas celulares con variaciones en la concentración de ABM, encontrándose diferencias significativas  $p < 0,05$  entre control MCF -7 con células del mismo tipo con tratamiento (5  $\mu$ l ABM) y linfocitos con tratamiento (6,5  $\mu$ l), además entre el control de células HeLa vs. control linfocitos. Se hallaron diferencia significativa  $p < 0,01$  entre control de linfocitos con control de MCF -7 y control de células HeLa vs la misma línea celular con las 2 concentraciones de tratamiento (2 y 5  $\mu$ l ABM). Mientras que se identificaron diferencias significativas  $p < 0,001$  entre MCF -7 con células HeLa en sus 2 concentraciones de tratamiento (2 y 5  $\mu$ l ABM) y linfocitos con ABM (5  $\mu$ l), MCF -7 en su única concentración de ABM vs el control de HeLa y HeLa con tratamientos y control linfocitos vs. linfocitos con tratamiento.



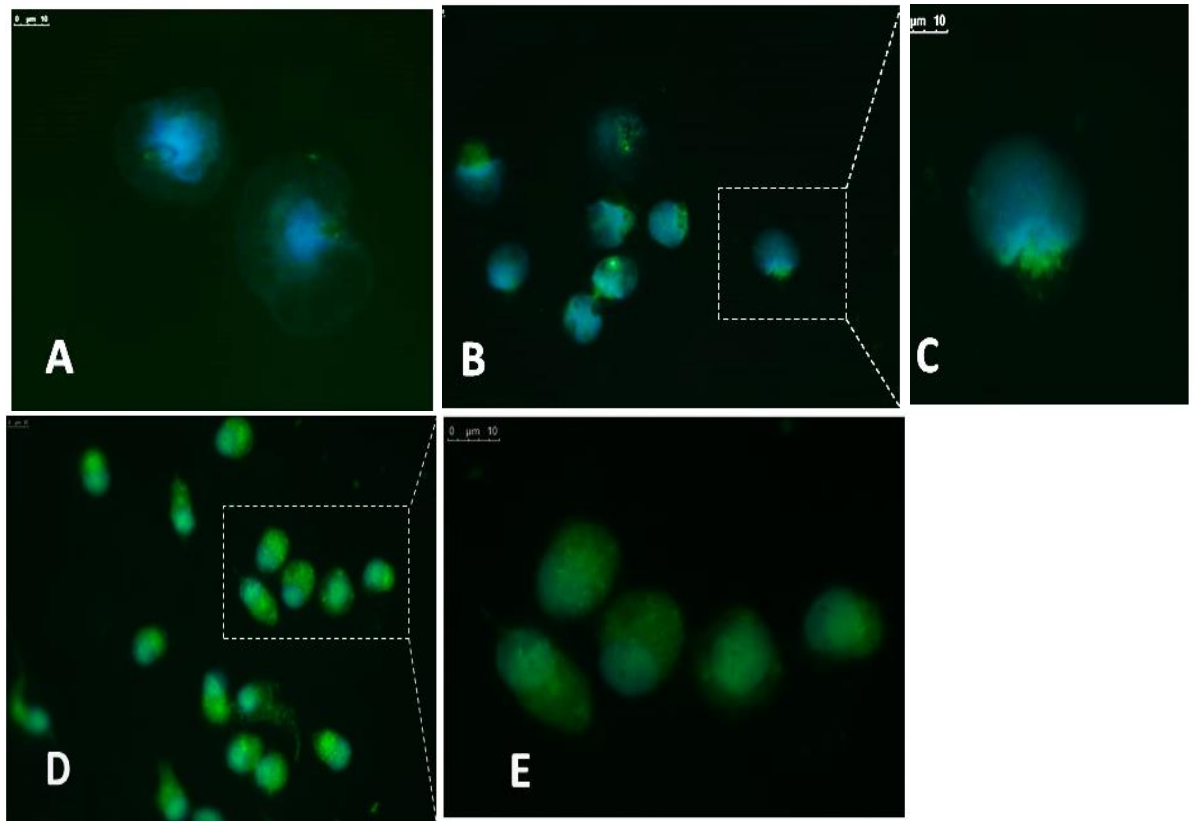
En resumen, se obtuvieron altas diferencias significativas entre las diversas líneas celulares al comparar los controles y células con tratamiento y diferentes tipos de células. Demostrándose que mediante la evaluación con CellRox® oxidative stress reagents, las células cancerígenas y células mononucleares del sistema inmunitario tratadas con ABM incrementan la concentración de especies reactivas del oxígeno en relación a las que no fueron tratadas con el extracto del hongo en estudio.

Se relacionaron los tres tipos de células en la Figura 19, mediante la comparación de la concentración del extracto con el promedio de la intensidad de expresión de ROS, se obtuvo un incremento representativo en células HeLa tratadas con 5  $\mu$ l de ABM, mientras que en las células MCF7 y linfocitos se mantuvo lineal.



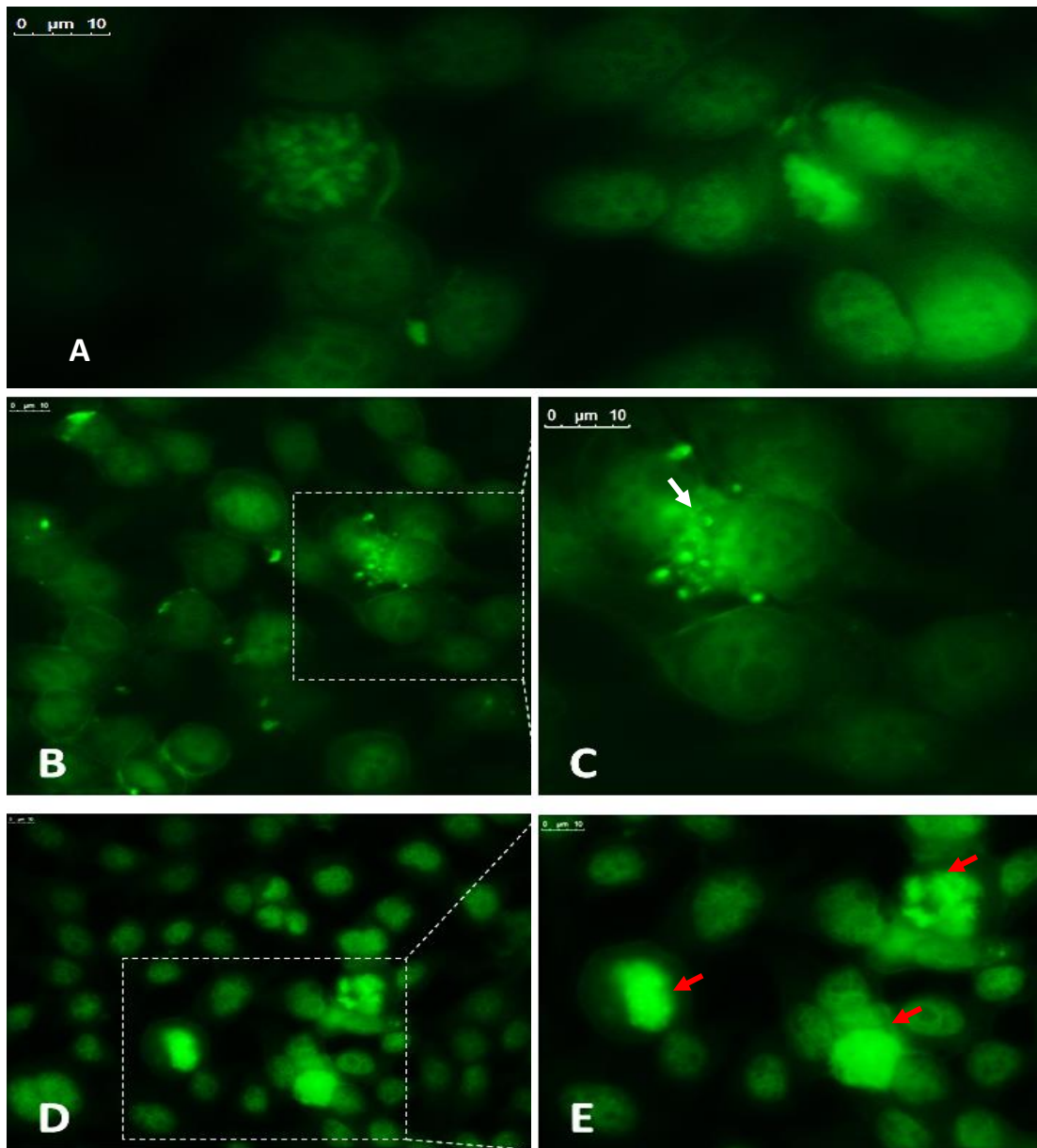
**Figura 19. Correlación en la producción de ROS de acuerdo a las diferentes concentraciones de ABM aplicadas en líneas celulares.**

Adicionalmente se obtuvieron fotografías de las células con el Microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania), evaluadas a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los filtros DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X.



**Figura 20. Fotos microscopia de fluorescencia para la expresión de ROS a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los filtros DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X en linfocitos humanos. Se observan células de linfocitos con tinción con CellRox® oxidative stress reagents (A) Células de control: Linfocitos. (B, C) Células con tratamiento: Linfocitos con 5  $\mu$ L ABM. (D, E) Células con tratamiento: Linfocitos con 6,5  $\mu$ L ABM.**

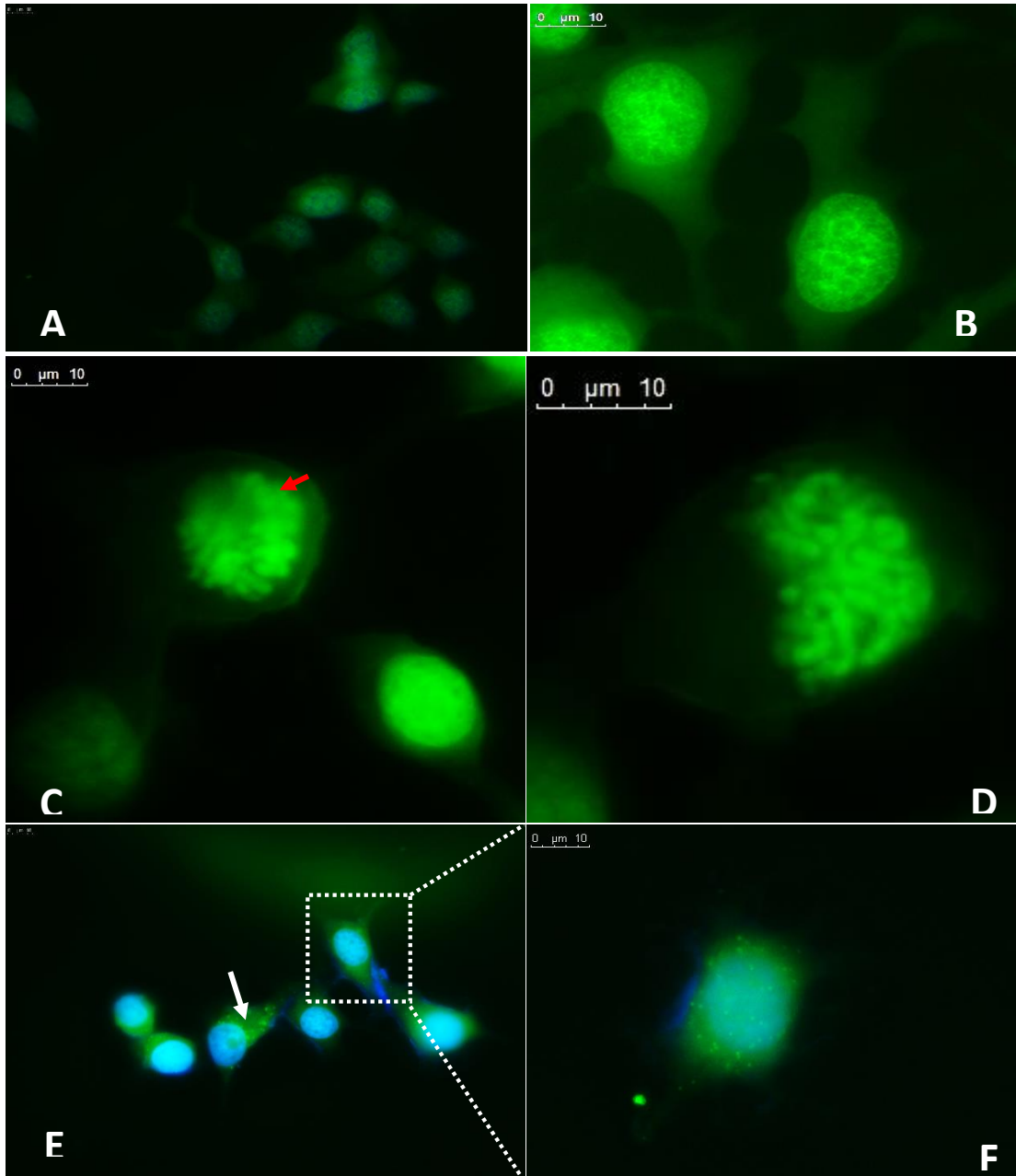
En la Figura 20A, se observan linfocitos aislados de sangre periférica humana, incubados por 24 horas en medio RPMI sin tratamiento adicionado, en donde se observa claramente con DAPI sus núcleos con una baja población celular, de las cuales se distingue su estructura, núcleo definido y mínima expresión de ROS en coloración verde, en los apartados B y C se observa de manera clara la expresión de ROS cercana al núcleo además de ver un incremento en la población celular en los linfocitos tratados con 5  $\mu$ l de ABM. En las células tratadas con 6,5  $\mu$ l correspondientes a D y E de la Figura 20 se observa mayor intensidad de expresión de ROS y elevado incremento celular.



**Figura 21. Fotos microscopia de fluorescencia para la expresión de ROS a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X en células de HeLa (ATCC® CCL-2TM). (A) Células de control: HeLa. (B, C) Células con tratamiento: HeLa con 2 μL ABM. (B, C) Células con tratamiento: HeLa con 5 μL ABM. La flecha roja indica núcleo apoptótico y la flecha blanca expresión de ROS.**

En la Figura 21A, se observan células HeLa (ATCC® CCL-2TM) cultivadas por 24 horas en medio DMEM sin tratamiento adicionado, de las cuales se ve su estructura y núcleo definido, en B y C de la Figura 21 se observa de manera clara la expresión de ROS en mayor intensidad en la parte externa de la célula sin embargo hay gran

expresión de ROS por la coloración verdosa en todas las células, mientras en los apartados D con aproximación de la imagen en E de la Figura 21 se observan claramente núcleos apoptóticos en las células tratadas con 5 $\mu$ L de la solución de *A. blazei*.



**Figura 22. Fotos microscopia de fluorescencia para la expresión de ROS a través de la tinción con CellRox® oxidative stress reagents empleando los DAPI (358-461 nm) y GFP (475-509 nm) con una magnificación de 630X en células MCF - 7 (ATCC® HTB-22TM). (A, B) Células de control: MCF - 7. (C, D, E, F) Células con tratamiento: MCF - 7 con 5  $\mu$ LABM. La flecha roja indica núcleo apoptótico y la flecha blanca expresión de ROS**

En la Figuras 22A y 22B, se observan células MCF - 7 (ATCC® HTB-22TM) cultivadas por 24 horas en medio DMEM sin tratamiento, de las cuales se observa claramente su estructura celular y expresión de ROS en color verde, en C, D, E, F de la Figura 22 se muestran las células de cáncer de mama tratadas 5µL de la solución de *A. blazei*, las imágenes evidencian la alta expresión de ROS en la célula, así como núcleos en procesos de apoptosis.

Con el análisis de MTT se demostró la propiedad antiproliferativa en células del tipo cancerígeno, mientras que las Figuras 21 y 22 con fotografías obtenidas en el microscopio Leica DMI8 (Leica Microsystems, Alemania), se mostró el efecto apoptótico en las 2 líneas celulares de cáncer al aplicar el extracto con compuestos bioactivos (polifenoles, polisacáridos, flavonoides) de *Agaricus blazei*. Pese a la capacidad antioxidante del extracto en estudio demostrada por el análisis de DPPH y el contenido de polifenoles y flavonoides, el incremento de la generación de especies reactivas del oxígeno puede estar asociada a que ABM para la inducción de apoptosis se asocia con la vía mitocondrial mediada por la generación de ROS.

**Kim et al. (2011)** evaluó los efectos apoptóticos en células leucémicas humanas y relacionó las elevadas producción de ROS por la vía mitocondrial mediada por la generación de ROS y activación prolongada de quimiocinas.

Al igual que **Pires et al. (2013)** determinó que los azúcares de los macro hongos comestibles son tóxicos para una línea celular de cáncer de hepatocitos por muerte apoptótica. Otros estudios realizados por **Kawamura & Kasai, (2007)** mostraron que los micelios y cuerpo fructífero del basidiomicete induce la vía apoptótica en diferentes líneas celulares tales como leucemia, linfoma, carcinoma cervical uterino, melanoma y cáncer de mama. Este proceso fisiológico de muerte celular, está programada y acompañada por respuesta no inflamatoria (**Schultz & Harrington, 2003**). Es importante señalar que en las figuras anteriormente expuestas se observan cambios morfológicos a nivel del núcleo en las células que fueron sometidas a tratamiento posiblemente debido a la condensación de la heterocromatina nuclear, contracción celular, formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN (**Samejima & Earnshaw, 2005**), lo que sugiere que pueden estar en un proceso apoptótico además estos cambios morfológicos incluyen cromatina condensada, formación de ampollas

en la membrana , pérdida de la disposición del citoesqueleto y del redondeo de las células. (Boukes, Koekemoer, van de Venter, & Govender, 2017)

#### 4.1.8 Discusión general

El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, cifras alarmantes de incidencia de cáncer han demostrado que para el 2030 serán diagnosticados 22 millones de casos nuevos alrededor del mundo (Boukes et al., 2017), es por tal motivo que la industria farmacéutica actual ha centrado su atención en productos o derivados naturales especialmente en hongos medicinales por su amplia gama de compuestos bioactivos útiles para el tratamiento de enfermedades oncológicas, dentro de los macromicetos sobresale *Agaricus blazei* principalmente por su capacidad inmunomoduladora y antitumoral, sus actividades biológicas han sido atribuidas a sus polisacáridos (glucanos), vitaminas, aminoácidos esenciales, ácido linoleico, compuestos fenólicos y otros (Bellini et al., 2006). Por este motivo el presente estudio pretende aportar información para evidenciar las actividades biológicas de *A. blazei* en líneas celulares humanas de diferentes tipos de carcinoma, así como el incremento de las células del sistema inmunitario.

En primera estancia fue necesario reconocer las condiciones óptimas de extracción (temperatura, tiempo de extracción, tipo de disolvente y proporción muestra disolvente) valorando tres de sus componentes principales, fenoles totales, polisacáridos y flavonoides; mediante un análisis estadístico de superficie de respuesta estimada para optimización de procesos, se llegó a la conclusión que las mejores condiciones de extracción fueron: agua destilada como disolvente, tiempo de extracción 60 minutos con las condiciones ya fijadas de temperatura 100 ° C y relación muestra disolvente 1:15.

En cuanto a la determinación del disolvente se consideró la extracción en agua y en etanol 50 % debido a su alta polaridad para la separación de polisacáridos y compuestos fenólicos, en su bajo costo y la facilidad de adquisición del mercado en relación a otro tipo de disolventes apolares como éter, cloroformo, hexano; soluciones alcalinas o métodos enzimáticos que representan un costo elevado. A partir de los

conocimientos de solubilidad de los polisacáridos en agua caliente y en soluciones alcalinas (**Y. W. Kim et al., 2005**), e investigaciones que demostraron la gran polaridad de los compuestos fenólicos (**Jayakumar, Philip, Sheu, & Pitchairaj, 2011; Lung & Chang, 2011**).

Como se ha mencionado *Agaricus blazei* se destaca por sus propiedades de inmunomodulación, sin embargo, la estrecha relación de esta propiedad con su capacidad antioxidante, antitumoral y la relación de esta enfermedad con el estrés oxidativo, llevaron a la evaluación conjunta de dichas propiedades.

Debido a que el estrés oxidativo conduce al incremento del riesgo de enfermedades crónicas, es un factor clave la determinación componentes naturales que inhiban dicho proceso, los hongos comestibles por su contenido de polifenoles polisacáridos vitaminas y minerales actúan como captadores de ROS en reacciones de óxido-reducción reversibles, (**Maja Kozarski et al., 2015**). La capacidad de reducción de radicales libres fue evaluado en el extracto acuoso de ABM (T1) por el método de DPPH el cual insinuó la capacidad de los componentes bioactivos del hongo de actuar como antioxidante, propiedad atribuida principalmente a los compuestos fenólicos incluido los flavonoides por su potencia de neutralizar especies reactivas del oxígeno (**M. Kang, Zhai, Li, Cao, & Han, 2017**), se ha demostrado que los flavonoides poseen una amplia variedad de efectos anticancerígenos y antienvjecimiento mediadas por la reducción del estrés oxidativo a través de la regulación del estado REDOX (**Pantavos et al., 2014**).

Por otro lado se ha conferido la capacidad inmunomoduladora y antitumoral a los polisacáridos que conforman la pared celular de basidiomicetes superiores (**N. Mizuno & Nishitani, 2013**), tras la cuantificación de carbohidratos totales se halló una elevada concentración de los mismos los cuales engloban gran variedad de monosacáridos y polisacáridos del hongo, lo que se confirmó por un análisis FTIR cuyas bandas evidenciaron la presencia de azúcares en la solución, con enlaces  $\alpha$  y  $\beta$  glucosídicos, factor que sugiere la presencia de  $\beta$  - glucanos en la muestra con una posible interacción con proteínas, como menciona **Akiyama et al. (2011)** la actividad indirecta de supresión de tumores por activación inmunológica lo generan los ingredientes

activos de *A. blazei*, los que pueden ser tanto polisacáridos como complejos proteína-polisacárido .

El ensayo de MTT permitió determinar mediante  $EC_{50}$  la capacidad de proliferación de los linfocitos con tratamiento, mientras que mediante  $IC_{50}$  se determinó la capacidad citotóxica del extracto rico en polisacáridos en líneas celulares cancerígenas HeLa y MCF-7. El incremento de la población de células mononucleares de sangre periférica humana permitió corroborar la capacidad de inmunomodulación el extracto de la seta, la inmunomodulación puede ser positiva al estimular o negativa al suprimir una actividad sin embargo la propiedad actuó como inmunoestimulador por su capacidad de promover la actividad del sistema inmunitario al proliferar linfocitos en una concentración efectiva máxima de 0,30 mg/ml de la solución  $10^0$ . Muy al contrario de la acción de estimulación en el crecimiento celular, el extracto actuó como un inhibidor del crecimiento y multiplicación de células de carcinoma, en el caso de cáncer cérvico uterino mediante las células HeLa se determinó un valor medio inhibitorio 0,0024 mg/ml y para las células de cáncer de mama de MCF-7 se obtuvo un  $IC_{50}$  de 0,0023 mg/ml. Dichos valores con mínima variación expresan un comportamiento parecido del extracto de ABM como antiproliferador en células cancerígenas de los 2 tipos, hecho del cual se puede inferir que la capacidad antitumoral y anticancerígena de extractos acuosos de la seta podrían emplearse para el tratamiento de ambas enfermedades con una amplia efectividad.

En la actualidad existe un auge de la medicina alternativa, el cual busca dar un valor a las plantas nativas y hongos de cada localidad para aprovechar sus químicos medicinales y de esta manera trascender a nivel mundial en la optimización de terapéuticas que generen calidad de vida y salud, los estudios acerca de las propiedades anticancerígenas de los hongos abren una ventana para el desarrollo de medicamentos alternativos (**Ramberg, Nelson, & Sinnott, 2010**) y su consumo como alimentos funcionales fresco o procesado (**Palencia Mendoza, 2011**) que ya han sido aprovechados desde años atrás por la medicina tradicional de países tanto asiáticos como del continente occidental. Por ello se ha desarrollado una nueva disciplina en la medicina denominada sintérgica la cual se basa en la medicina, tradicional y ancestral conjugada con la ciencia actual cuya visión objetiva tiene como principal fin



integrar estos campos para el desarrollo de herramientas y método en las ciencias bilógicas más específicamente en las ciencias de la salud (AIS, 2018).

Pese a estudios previos sobre la capacidad citotóxica de *Agaricus blazei Murill* en células cancerígenas en varias de sus etapas (Patel & Goyal, 2012), aún es necesario de un mayor conocimiento científico sobre el hongo principalmente en su empleo en la prevención y el tratamiento de enfermedades oncológicas, cabe mencionar que pacientes con CaMa y Cacu y otros tipos de cáncer sufren de depleción del sistema inmunitario por lo cual la administración de alimentos funcionales capaces de elevar los niveles de actividad del sistema inmunitario, influir en las funciones biológicas internas de células malignas para que ellas induzcan su propia muerte, y reducir los niveles de radicales libres en funciones normales, convierten a ABM en una fuente de compuestos fisiológicamente beneficiosos. Por lo que el incluir en la dieta esta especie de seta permitiría que este actúe como un agente quimiopreventivo sin embargo es poco conocido su mecanismo de acción por lo que la exploración de nuevas especies y conocidas permitiría mejorar la incidencia de cáncer en varias de sus etapas (Delmanto et al., 2001). Ishii et al. (2011) sugiere que *A. blazei* puede ser un método eficiente como tratamiento coadyuvante en la quimioterapia, de la misma manera C. F. Kim, Jiang, Leung, Fung, & Lau, (2009) promueve la utilización del hongo como coadyuvante por la variedad de componentes bioactivos. El empleo como coadyuvante ofrece la posibilidad de una alternativa para apaciguar una gama de efectos secundarios de la quimioterapia como la, alopecia, la astenia, la flebitis, y las fuertes deshidrataciones deterioran la calidad de física y emocional de los pacientes paciente (Santos et al., 2018).

Los resultados obtenidos sobre la capacidad de proliferación de linfocitos y anti proliferación de células HeLa y MCF7 *in vitro* sugieren la elevada eficiencia de extractos acuosos de ABM en el tratamiento contra estos dos tipos de cáncer a través de la activación del Sistema Inmunitario Innato y Adaptativo, así como mediante su capacidad citotóxica en células de cáncer de mamá y de cérvix lo que conllevaría a una notable reducción de células malignas tras su administración.

## 4.2 Verificación de hipótesis

Una vez analizados los resultados se determinó que el extracto acuoso de *A. blazei* fue positivo para las tres actividades biológicas en evaluación, es decir tiene propiedad antioxidante, citotóxica contra células cancerígenas y es inmunomoduladora al influir en la proliferación de linfocitos sanguíneos de sangre periférica humana, en el caso de la actividad antioxidante la concentración de compuestos activos especialmente de polifenoles influyó en el consumo del radical libre estable DPPH, en cuanto a los métodos de cuantificación demostraron que al variar la concentración de la solución inicial ( $10^0$ ) de ABM y por lo tanto variar la concentración de fenoles totales, flavonoides y polisacáridos para los ensayos de MTT de viabilidad celular el comportamiento de la población celular cambió, por lo que por los parámetros  $IC_{50}$  para células HeLa y MCF-7 y  $EC_{50}$  para linfocitos permitieron demostrar la concentración óptima del extracto para ser activa en las distintas líneas humanas celulares. Por lo tanto, se aceptó la hipótesis alternativa que indica que la concentración de compuestos bioactivos incide en las actividades biológicas de *A. blazei*.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Se evaluaron las actividades biológicas de compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides y polisacáridos) del hongo *Agaricus blazei* con ensayos químicos y biológicos *in vitro* en líneas celulares humanas, con ello se demostró que los extractos acuosos del hongo poseen propiedades antioxidantes, citotóxicas en células de cáncer cervicouterino y cáncer de mama y la más relevante, que actúa como inmunoestimulador.

Se cuantificó el contenido de moléculas bioactivas a través de ensayos espectrofotométricos UV-VIS para los 4 tratamientos evaluados, sin embargo, destacó el tratamiento uno por sus contenidos más altos de polifenoles, flavonoides y polisacáridos, para T1 se hallaron concentraciones de polifenoles 21,27 mg GAE/g, de flavonoides 2,34 mg QE/g y de polisacáridos 192,41 mg GLUC/g.

Se determinaron las condiciones óptimas del proceso de extracción de fenoles totales, flavonoides y polisacáridos de ABM, para la extracción de los tres metabolitos se identificó que los mejores parámetros fueron: disolvente agua, relación materia-disolvente 1:15, temperatura de ebullición ( $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ ) y tiempo de extracción 60 minutos.

Se evaluaron las actividades como antioxidante, inmunomodulador, y citotóxico de los compuestos bioactivos del extracto T1 del basidiomicete. La actividad antioxidante se expresó como la cantidad de Trolox necesaria para reaccionar con el radical libre 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, se obtuvo un valor de 84,81  $\mu\text{mol}$  Trolox/g para consumir el 13,01 % DPPH. En cuanto la actividad inmunomoduladora se obtuvo un  $\text{EC}_{50}$  igual a

0,3000± 0,08822 mg/ml con una proliferación celular de 41,25 %, al aplicar el tratamiento rico en polisacáridos de *A.blazei*. Para la actividad citotóxica, en células HeLa (ATCC® CCL-2™) se obtuvo un IC<sub>50</sub> de 0,0024 mg/ml con una reducción del total de la población celular a 9,93 %, mientras que en cultivo de células MCF - 7 (ATCC® HTB-22™) el extracto con polifenoles, flavonoides y polisacáridos de ABM inhibió su crecimiento del 100 al 7,72 %. Con un El IC<sub>50</sub> 0,0023 mg/ml.

## 5.2 Recomendaciones

Evaluar la actividad biológica *in vitro* de ABM mediante ensayos en linfocitos aislados de pacientes con deficiencias del sistema inmunitario, cáncer, procesos de quimioterapia para evaluar el poder de ABM como coadyuvante para el posible tratamiento de enfermedades

Identificar de manera más específica los tipos de polisacáridos, como sus monómeros y fenoles de los extractos de ABM mediante métodos cromatográficos.

Valorar la actividad biológica de ABM extraídos con disolventes alcalinos o métodos enzimáticos para comparar su efecto en relación a los disolventes utilizados.

Realizar ensayos de apoptosis tardía en líneas células cancerígenas para aclarar el mecanismo de ABM para inducir la muerte celular.

## C. MATERIAL DE REFERENCIA

### Referencias bibliográficas

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (8 va). Barcelona: Elsevier S.L.U.

Abia Heras, A. (2015). “ $\beta$ - Glucanos: Estructura química, fuentes biológicas y efectos inmunomoduladores.”

Ahmad, M., Gani, A., Shah, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2016). Germination and microwave processing of barley (*Hordeum vulgare L*) changes the structural and physicochemical properties of  $\beta$ -D-glucan & enhances its antioxidant potential. *Carbohydrate Polymers*, 153, 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.022>

AIS. (2018). Formación en Sintergética. Retrieved from <http://www.sintergetica.org/>

Akiyama, H., Endo, M., Matsui, T., Katsuda, I., Emi, N., Kawamoto, Y., Beppu, H. (2011). Agaritine from *Agaricus blazei Murrill* induces apoptosis in the leukemic cell line U937. *Biochim Biophys Acta*, 18(10), 519–525.

Akramien, D., Kondrotas, A., Did, J., & Egidijus, K. (2007). Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 43(8), 597–606.

Al-Duais, M., Müller, L., V, B., & G, J. (2009). Antioxidant capacity Processing:, and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *Eur Food Res Technol*, 228, 813–821.

Alave, P. (2008). Evaluación del crecimiento miceliar de hongos comestibles en tres cereales como sustrato. Universidad Mayor de San Andrés. Retrieved from <http://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/4419/T-1243.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Alzamora, L., Galvan, P., Alvarez, E., Torres, D., Colona, E., Aliaga, M., & Marcelo, A. (2007). Producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de linfocitos humanos por efecto de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*,

- Chacón (Brassicaceae). *Rev. Peru. Biol.*, 13(3), 207–209. Retrieved from <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Baena Ruiz, R., & Salinas Hernández, P. (2014). Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas*, 77(3), 202–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.11.010>
- Bederska-Łojewska, D., Świątkiewicz, S., & Muszyńska, B. (2017). The use of Basidiomycota mushrooms in poultry nutrition—A review. *Animal Feed Science and Technology*, 230, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.06.001>
- Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Matuo, R., Terezan, A. P., Ribeiro, L. R., & Mantovani, M. S. (2006). Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology in Vitro*, 20(3), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.009>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1993.1311>
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? 2011;98(3):426–438., *Bot. American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>

- Boonsong, S., Klaypradit, W., & Wilaipun, P. (2016). Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources*, 50(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.07.002>
- Boukes, G. J., Koekemoer, T. C., van de Venter, M., & Govender, S. (2017). Cytotoxicity of thirteen South African macrofungal species against five cancer cell lines. *South African Journal of Botany*, 113, 62–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.010>
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2011). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008– 2030): a population-based study. *Lancet Oncol*, 13(8), 790–801.
- Broutet, N. y cols. (2014). Control Integral del Cáncer Cervicouterino: Publicación Occasional : Guía de Prácticas Esenciales. <https://doi.org/ISBN 978-92-4-154895-3>
- Camelini, C. M., Maraschin, M., De Mendonça, M. M., Zucco, C., Ferreira, A. G., & Tavares, L. A. (2005). Structural characterization of  $\beta$ -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters*, 27(17), 1295–1299. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0222-6>
- Carbonero, E. R., Ruthes, A. C., Freitas, C. S., Utrilla, P., Gálvez, J., Silva, E. V. Da, ... Iacomini, M. (2012). Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 814–819. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.005>
- Carneiro, A. A. J., Ferreira, I. C. F. R., Dueñas, M., Barros, L., Da Silva, R., Gomes, E., & Santos-Buelga, C. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*, 138(4), 2168–2173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.036>
- Carvajal, A., Koehnlein, E., Soares, A., Eler, G., & Nakashima, T. (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus*

- brasiliensis (blazei) and their antioxidant. *LWT – Food and Technology*, 46, 493–499.
- Carvajal de Pabón, L. M., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L., Restrepo, S., Álvarez, Julie Maritza, Bonilla, Karla Cristina, Ochoa, C., & Sánchez, N. (2011). Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 354–363.
- Chan, G., WK, C., & Sze, D. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*, 2, 25–36.
- Chatattikun, M, Choabchalard, A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn) root crude extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.*, 5(4), 97–102.
- Cunha, D., Pardo, J., Pardo, A., & Teixeira, M. (2012). Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados 4. Actas de las V Jornadas Técnicas del Champiñón y otros Hongos Cultivados en Castilla la Mancha.
- Daba, a S., & O.U.Ezeronye. (2003). Anticancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(December), 672–678.
- Dang, Z., Feng, D., Liu, X., Yang, T., Guo, L., & Liang, J. (2013). Structure and antioxidant activity study of sulfated acetamido-polysaccharide from *Radix hedysari*. *Fitoterapia*, 89, 20–32.
- de Jesus Pereira, N. C., Régis, W. C. B., Costa, L. E., de Oliveira, J. S., da Silva, A. G., Martins, V. T., ... Coelho, E. A. F. (2015). Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 153, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.03.027>
- Delmanto, R. D., De Lima, P. L. A., Sugui, M. M., Da Eira, A. F., Salvadori, D. M. F., Speit, G., & Ribeiro, L. R. (2001). Antimutagenic effect of *Agaricus blazei*



- Murrill* mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496(1–2), 15–21. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00228-5)
- Didukh, M. Y., Wasser, S., & Nevo, E. (2003). Medicinal Value of Species of Family Agaricaceae Cohn (Higher Basidiomycetes): Current State of Knowledge and Future Perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5(2), 133–152.
- Du, B., Lin, C., Bian, Z., & Xu. (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends Food Sci. Technol*, 41, 49–59.
- Ferreira, I., & Barros, L. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med*, 16, 1543–1560.
- Figueiredo, L., & Régis, W. C. B. (2017). Medicinal mushrooms in adjuvant cancer therapies: an approach to anticancer effects and presumed mechanisms of action. *Nutrire*, 42(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s41110-017-0050-1>
- Finimundy, T. C., Gambato, G., Fontana, R., Camassola, M., Salvador, M., Moura, S., ... Roesch-Ely, M. (2013). Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutrition Research*, 33(1), 76–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.11.005>
- Firenzuoli, F., Gori, L., & Lombardo, G. (2008). The medicinal mushroom *Agaricus blazei murrill*: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(1), 3–15. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem007>
- Førland, D. T., Johnson, E., Tryggestad, A. M. A., Lyberg, T., & Hetland, G. (2010). An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei Murill* stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production in vitro. *Cytokine*, 49(3), 245–250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.09.002>

- Fukuda, M., Ohno, S., & Kato, M. (2003). Genetic variation in cultivated strains of *Agaricus blazei*. *Mycoscience*, 44(6), 431–436. <https://doi.org/10.1007/s10267-003-0136-x>
- Gao, L., Sun, Y., Chen, C., Xi, Y., Wang, J., & Wang, Z. (2007). Primary mechanism of apoptosis induction in a leukemia cell line by fraction prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 1545–1555. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2007001100015&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2007001100015&nrm=iso)
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universitat Politècnica de Valencia*, 2–8.
- Geml, J., Geiser, D., & Royse, D. (2004). Molecular evolution of *Agaricus* species based on ITS and LSU rDNA sequences. *Mycological Progress*, 3, 157–176.
- Gonzaga, M. L. C., Menezes, T. M. F., De Souza, J. R. R., Ricardo, N. M. P. S., & Soares, S. D. A. (2013). Structural characterization of  $\beta$  glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(2), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.005>
- Gonzaga, M. L. C., Ricardo, N. M. P. S., Heatley, F., & Soares, S. D. A. (2005). Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.022>
- Granado, A. (2010). Estudios De Los Mecanismos De Acción Molecular De Polifenoles De La Dieta En Cultivos Celulares Y Animales De Experimentación. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/11142/1/T31765.pdf>
- Gu, Y.-H., & Leonard, J. (2006). *In vitro* effects on proliferation, apoptosis and colony inhibition in ER-dependent and ER-independent human breast cancer cells by selected mushroom species. *Oncol Rep*, 15, 417–423.

- Györfi, J., Geösel, A., & János, V. (2010). Mineral Composition of Different Strains of Edible Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens* Peck. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1510–1514. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0244>
- He, J., Zhang, A., Ru, Q., Dong, D., & Sun, P. (2014). Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the fruiting bodies of *Agaricus bisporus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 787–797. <https://doi.org/10.3390/ijms15010787>
- Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Bernardshaw, S., Tryggestad, A. M. A., & Grinde, B. (2008). Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68(4), 363–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02156.x>
- Huang, T. T., Ojcius, D. M., Young, J. D., Wu, Y. H., Ko, Y. F., Wong, T. Y., ... Lai, H. C. (2012). The anti-tumorigenic mushroom *Agaricus blazei murill* enhances IL-1 $\beta$  production and activates the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *PLoS ONE*, 7(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041383>
- Humberto, L., Morris, J., Clara, L., Manrique, M., Roberto, L., & Díaz, T. A. (1999). *Adyuvantes Inmunológicos*, 18(2), 130–137.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2017). El cáncer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
- Ishii, P. L., Prado, C. K., Mauro, M. de O., Carreira, C. M., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., ... Oliveira, R. J. (2011). Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59(3), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.01.004>
- Jayakumar, T., Philip, T., Sheu, R., & Pitchairaj, G. (2011). *In-vitro and in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Research International - FOOD RES INT*, 44, 851–861.

- Jeong, J.-W., Jin, C.-Y., Park, C., Hong, S., Kim, G.-Y., Jeong, Y., Yoo YH, C. Y. (2011). Induction of apoptosis by cordycepin via reactive oxygen species generation in human leukemia cells. *Toxicol In Vitro*, 25, 817–824.
- Jia, S., Li, F., Liu, Y., Ren, H., Gong, G., Wang, Y., & Wu, S. (2013). Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.031>
- Juárez Vázquez, M. D. C., Josabad, Á., & Castro, A. (2013). Actividad inmunomoduladora *in vitro* de extractos y compuestos de plantas Mexicanas medicinales. Retrieved from [http://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis\\_juarez\\_vazquez.pdf](http://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_juarez_vazquez.pdf)
- Kakuta, M., Tanigawa, A., Kikuzaki, H., & Misaki, A. (2002). Isolation and chemical characterization of antioxidative substance and glucans from fruiting body of *Agaricus blazei*. *Biryō Eiyōso Kenkyū*, 17, 83–90.
- Kalac, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wildgrowing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 209–218.
- Kaneno, R., Fontanari, L. M., Santos, S. A., Di Stasi, L. C., Rodrigues Filho, E., & Eira, A. F. (2004). Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*, 42(6), 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.01.014>
- Kang, I. S., Kim, R. I., Kim, G. S., Kim, N. R., Shin, J. Y., & Kim, C. (2015). Effects of *Agaricus blazei* Murrill Water Extract on Immune Response in BALB/c Mice. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(11), 1629–1636. Retrieved from [www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=SPOOBG\\_2015\\_v44n11\\_1629](http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=SPOOBG_2015_v44n11_1629)
- Kang, M., Zhai, F. H., Li, X. X., Cao, J. L., & Han, J. R. (2017). Total phenolic contents and antioxidant properties of buckwheat fermented by three strains of

- Agaricus*. Journal of Cereal Science, 73, 138–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.12.012>
- Kanjan, P., Sahasrabudhe, N. M., de Haan, B. J., & de Vos, P. (2017). Immune effects of  $\beta$ -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. Journal of Functional Foods, 37, 433–440.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.061>
- Karaman, M., Jovin, E., Malbasa, R., Matavuly, M., & Popovic, M. (2010). Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. Phytother. Res, 24, 1473–1481.
- Kawamura, M., & Kasai, H. (2007). Delayed Cell Cycle Progression and Apoptosis Induced by Hemicellulase-Treated *Agaricus blazei*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4(1), 83–94.  
<https://doi.org/10.1093/ecam/nel059>
- Kerrigan, R. W. (2005). *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. Mycologia, 97(1), 12–24.  
<https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.12>
- Khan, A. A., Gani, A., Khanday, F. A., & Masoodi, F. A. (2017). Biological and pharmaceutical activities of mushroom  $\beta$ -Glucan discussed as a potential functional food ingredient. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.12.002>
- Khan, A. A., Gani, A., Masoodi, F. A., Kousar, S., & Ahmad, M. (2014). Antioxidant and Functional Properties of  $\beta$ -Glucan Extracted From Edible Mushrooms *Agaricus Bisporus*., 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 210–214.
- Khan, A. A., Gani, A., Shah, A., Masoodi, F. A., Hussain, P. R., Wani, I. A., & Khanday, F. A. (2015). Effect of  $\gamma$ -irradiation on structural, functional and antioxidant properties of  $\beta$ -glucan extracted from button mushroom (*Agaricus bisporus*). Innovative Food Science and Emerging Technologies. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.05.006>

- Kim, C. F., Jiang, J. J., Leung, K. N., Fung, K. P., & Lau, C. B. S. (2009). Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.025>
- Kim, G. Y., Kim, M. O., Moon, D. O., Jung, J. M., Lee, W. S., & Choi, Y. H. (2011). k extract induces apoptosis through ROS-dependent JNK activation involving the mitochondrial pathway and suppression of constitutive NF-κB in THP-1 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep176>
- Kim, J., Lee, J.-S., Song, K.-S., Kwon, C.-S., Kim, Y.-K., & Kim, J.-S. (2004). Polyozellin isolated from *Polyozellus multiplex* induces phase 2 enzymes in mouse hepatoma cells and differentiation in human myeloid leukaemic cell lines 52: *J Agric Food Chem*, 52, 451–455.
- Kim, J., Lee, K., Hwang, K. T., & Yoo, G. (2004). Total Phenolics and Beta-1, 3-Glucans Extracted from Medicinal Mushrooms ( *Ganoderma lucidum* , *Inonotus obliquus* , and *Phellinus linteus* ), 3318.
- Kim, Y. W., Kim, K. H., Choi, H. J., & Lee, D. S. (2005). Anti-diabetic activity of ??-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology Letters*, 27(7), 483–487. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2225-8>
- Kimura, Y., Kido, T., Takaku, T., Sumiyoshi, M., & Baba, K. (2004). Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murrill: its antitumor and antimetastatic actions. *Cancer Science*, 95, 758–764.
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., ... Van Griensven, L. (2015). Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489–19525. <https://doi.org/10.3390/molecules201019489>
- Kozarski, M., Klaus, A., & Niksic, M. (2009). Influence of structural features on immunostimulating activity of glucans extracted from *Agaricus blazei* mushroom. *Proceeding for Natural Science*, Matica Srpska Novi Sad, (116), 225–233. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0916225K>

- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & Van Griensven, L. J. L. D. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129(4), 1667–1675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.029>
- Kumar D., V., Arya, R., Kaur, Z., Ali Bhat, V., & Gupta, V. K. (2012). A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *Immunology and Infection*, 45, 165–184.
- Li, L., Li, H., Qian, J., He, Y., Zheng, J., Lu, Z., ... Shi, J. (2016). Structural and Immunological Activity Characterization of a Polysaccharide Isolated from *Meretrix meretrix* Linnaeus. *Marine Drugs*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/md14010006>
- Lima, C. U. J. O., Gris, E. F., & Karnikowski, M. G. O. (2016). Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(6), 780–786. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.013>
- Liu, J., & Sun, Y. (2011). Structural analysis of an alkali-extractable and water-soluble polysaccharide (ABP-AW1) from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 429–432. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.027>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In M. J. Stoddart, *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* (pp. 7–12). Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2)
- Lung, M.-Y., & Chang, Y.-C. (2011). Antioxidant Properties of the Edible Basidiomycete *Armillaria mellea* in Submerged Cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6367–6384. <https://doi.org/10.3390/ijms12106367>

- Ma, B.-J., Shen, J.-W., Yu, H.-Y., Ruan, Y., Wu, T.-T., & Zhao, X. (2010). Hericenones and erinacines: stimulators of nerve growth factor (NGF) biosynthesis in *Herichium erinaceus*. *Mycology*, 1(2), 92–98. <https://doi.org/10.1080/21501201003735556>
- Ma, G., Yang, W., Zhao, L., Pei, F., Fang, D., & Hu, Q. (2018). A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness* (Vol. 7). Beijing Academy of Food Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.05.002>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727–747.
- María, A., Jáuregui, M., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz, C., Ureta, I., & Castañeda, B. C. (2007). Evaluación De La Capacidad Antioxidante y Contenido De Compuestos Fenólicos En Recursos Vegetales Promisorios Evaluation of the Antioxidant Capacity and Content of Phenolics Compounds of Vegetable Promissory Resources. *Rev Soc Quím Perú*, 73(3), 142–149. Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v73n3/a03v73n3.pdf>
- Martin, K. R., & Brophy, S. K. (2010). Commonly consumed and specialty dietary mushrooms reduce cellular proliferation in MCF-7 human breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, 235(11), 1306–1314. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010113>
- Matuszewska, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., & Matuszewski, Ł. (2018). Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. *PLoS ONE*, 13(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197044>
- Mendiola, M. (2017). Caracterización de compuestos bioactivos y efecto de la aplicación de Pulsos Eléctricos de Moderada Intensidad de Campo en setas cultivadas en La Rioja. *Universitat de Lleida*, 191. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/456031>



- Mishra, K. K., Pal, R. S., ArunKumar, R., Chandrashekara, C., Jain, S. K., & Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1557–1563. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.12.001>
- Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K., & Tsuchida, H. (1998). Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(3), 434–437. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.434>
- Mizuno, N., & Nishitani, Y. (2013). Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *J. Clin. Biochem.*, 52(3), 202–207.
- Mizuno, T. (1995). *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev Int*, 11, 167–172.
- Mo, L., Chen, Y., Li, W., Guo, S., Wang, X., An, H., & Zhan, Y. (2017). Anti-tumor effects of (1→3)- $\beta$ -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 385–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.106>
- Money, N. P. (2016). Are mushrooms medicinal? *Fungal Biology*, 120(4), 449–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.006>
- Moradili, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., & Hedjaroude, G. A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromcetes fungi. *International Immunopharmacology*, 7, 701–724.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, & Böhm. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT – Food. Sci Technol*, 43, 992–999.
- Oliveira, O. M. M. F., Velloso, J. C. R., Fernandes, A. S., Buffa-filho, W., Hakime-silva, R. A., Furlan, M., & Brunetti, I. L. (2007). Antioxidant activity of *Agaricus blazei*, 78, 263–264. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.002>
- Orsine, J. V. C., Cavalho, M. R., Novaes, G., Asquieri, E. R., Cultivadas, S., & Brasil, E. N. (2012). Nutritional value of *Agaricus sylvaticus*; mushroom grown in

Brazil. *Nutricion Hospitalaria*, 27(2), 449–455.  
<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.2.5504>

Paladino, S. C., & Zuritz, C. A. . (2011). Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional*. Retrieved from [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1853-86652011000100013&lng=es&tlng=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652011000100013&lng=es&tlng=pt).

Palencia Mendoza, Y. (2011). Sustancias bioactivas en los alimentos. *Prevention Juventud*, 2, 1–9. Retrieved from [http://www.unizar.es/med\\_naturista/bioactivos en alimentos.pdf](http://www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf)

Pantavos, A., Ruiter, R., Feskens, E. F., Keyser, C. E., Hofman, A., Stricker, B. H., Kiefte-de Jong, J. C. (2014). Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: The Rotterdam study. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2178–2186. <https://doi.org/10.1002/ijc.29249>

Patel, S., & Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0036-2>

Pérez-Guisado, J. (2007). Argumentos a favor de la incorporación de los  $\beta$ -D-glucanos a la alimentación. *Endocrinología Y Nutrición*, 54(6), 315–324. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(07\)71456-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(07)71456-0)

Pilar-Rojas, J., & Martinez, J. R. (2014). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 21(3), 218–225.

Pires, A. do R. A., Ruthes, A. C., Cadena, S. M. S. C., Acco, A., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2013). Cytotoxic effect of *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*  $\beta$ -d-glucans on HepG2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.040>

- Pizarro C, S., Ronco M, A. M., & Gotteland R, M. (2014).  $\beta$ -Glucanos: ¿Qué Tipos Existen Y Cuáles Son Sus Beneficios En La Salud? *Revista Chilena de Nutrición*, 41(4), 439–446. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M., & Singh, G. (2011). Preparation, characterization, and biological properties of  $\beta$ -glucans. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2), 94. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82953>
- Ramberg, J. E., Nelson, E. D., & Sinnott, R. A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*, 9, 54. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-54>
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., & Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(2), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.003>
- Sahasrabudhe, N. M., & Dokter-Fokkens. (2016). Particulate  $\beta$ -glucans Molecular, synergistically activate TLR4 and Dectin-1 in human dendritic cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60, 2514–2522.
- Salehi, B., Bayat, M., Dezfulian, M., Sabokbar, A., & Tabaraie, B. (2016). The assessment of anti-tumoral activity of polysaccharide extracted from terrestrial filamentous fungus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 0–5. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.002>
- Samejima, K., & Earnshaw, W. C. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 677. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1715>
- Sánchez, V., Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, 20(3), 161–168. Retrieved from

<http://www.medicinaenlinea.com.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>

- Sandip, P., Shreewardhan, R., Sandeephan, M., Abhay, C., & Debjani, D. (2014). Phytochemical evaluation and free radical scavenging potential of *Hugonia Mystax* (L) Leaf Extract. *Bionano Frontier*, 7(2).
- Santos-Neves, J. C., Pereira, M. I., Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Alquini, G., Gorin, P. A. J. Iacomini, M. (2008). A novel branched  $\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Polymers*, 73(2), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.030>
- Santos, J. A., Quezada, T. D., Saraguro, S. M., Falconi, S. V, Espinoza, F. M., & Chamba, M. (2018). Cáncer de mama: estudio desde la práctica del cuidado de enfermería Breast cancer : study from the practice of nursing, 4, 9–16.
- Sathishkumar, G., Bharti, R., Jha, P. K., Selvakumar, M., Dey, G., Jha, R., ... Sivaramakrishnan, S. (2015). Dietary flavone chrysin (5,7-dihydroxyflavone ChR) functionalized highly-stable metal nanoformulations for improved anticancer applications. *RSC Advances*, 5(109), 89869–89878. <https://doi.org/10.1039/c5ra15060d>
- Schultz, D. R., & Harrington, W. J. (2003). Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(6), 345–369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/sarh.2003.50005>
- Sembiring, E., Elya, B., & Sauriasari, R. (2018). Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal Pharmacogn J*, 10(101), 123–127. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.22>
- Shimizu, T., Kawai, J., Ouchi, K., Kikuchi, H., Osima, Y., & Hidemi, R. (2016). Agarol, un derivado de ergosterol de *Agaricus blazei*, induce apoptosis independiente de caspasa en células de cáncer humano. *Revista Internacional de Oncología*, 48(4), 1670–1678.
- Sigma-Aldrich. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Histopaque®-1077 Catalog*.

- Smith, J. E., Rowan, N. J., & Sullivan, R. (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*, 24(22), 1839–1845. <https://doi.org/10.1023/A:1020994628109>
- Standish, L., Wenner, C., Sweet, E., Bridge, C., Martzen, A., Novack, J., & Torkelson, C. (2008). *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. *J Soc Integr Oncol*, 6, 122–128.
- Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macro hongos comestibles: Una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Sui, Z. F., Yang, R., Liu, B., Gu, T. M., Zhao, Z. L., Shi, D. F., & Chang, D. Q. (2010). Chemical analysis of *Agaricus blazei* polysaccharides and effect of the polysaccharides on IL-1 $\beta$  mRNA expression in skin of burn wound-treated rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), 155–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.05.006>
- Surh, Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals, 3(October), 768–780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>
- Takimoto, H., Wakita, D., Kawaguchi, K., & Kumazawa, Y. (2004). Potentiation of cytotoxic activity in native and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol Pharm Bull*, 27, 404–406.
- Tang, X.-H., Yu, F., Liu, J., Gao, J., Yan, L.-F., & Dong, M.-M. (2014). Isolation and identification of anti-tumor polysaccharide LSP21 from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 138–142. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.06.042>
- Tangen, J. M., Holien, T., Mirlashari, M. R., Misund, K., & Hetland, G. (2017). Cytotoxic effect on human myeloma cells and leukemic cells by the *Agaricus blazei murill* based mushroom extract, andosan<sup>TM</sup>. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2059825>

- Taylor, K. A. C. C. (1995). A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(3), 207–214. <https://doi.org/10.1007/BF02783496>
- Therkelsen, S. P., Hetland, G., Lyberg, T., Lygren, I., & Johnson, E. (2016). Cytokine Levels After Consumption of a Medicinal *Agaricus blazei* Murill-Based Mushroom Extract, AndoSan™, in Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in a Randomized Single-Blinded Placebo-Controlled Study. *Scandinavian Journal of Immunology*, 84(6), 323–331. <https://doi.org/10.1111/sji.12476>
- Tilmanis, D. R. (2010). Growth and Therapeutic Properties of *Agaricus blazei*.
- Tung, Y.-C., Su, Z.-Y., Kuo, M.-L., & Sheen, L.-Y. (2012). Ethanolic Extract of *Agaricus blazei* Fermentation Product Inhibits the Growth and Invasion of Human Hepatoma HA22T/VGH and SK-Hep-1 Cells. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(2), 145–153. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942917/>
- Vaikundamoorthy, R., Krishnamoorthy, V., Vilwanathan, R., & Rajendran, R. (2018). Structural characterization and anticancer activity (MCF7 and MDA-MB-231) of polysaccharides fractionated from brown seaweed *Sargassum wightii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1229–1237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.125>
- Valverde, M., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int. J. Microbiol.*
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 237–245). Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
- Velázquez, P. M., López, J. G., & Quintana, P. (2017). Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico, 26, 56–63. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/alergia/>

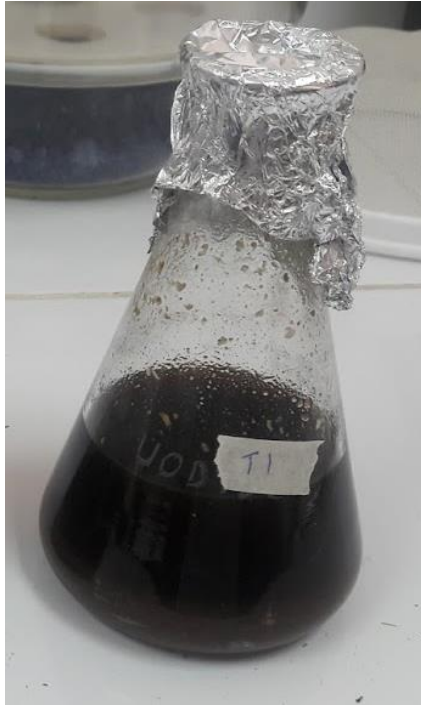
- Volman, J., Ramakers, J., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by glucans. *Physiology & Behavior*, 94, 276–284.
- Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J., & Benzie, I. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): a medicinal mushroom. *Herbal Medicine: biomolecular and clinical aspects* (2da ed.).
- Wang, Y., Zhang, L., Li, Y., & Zeng, F. (2004). Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a  $\beta$ -glucan from *Poria cocos sclerotium*, 339, 2567–2574. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.003>
- Weis, A. L., & Wasser, S. P. (1999). Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Immunology*, 19(1), 32. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v19.i1.30>
- Widyawaruyanti, A. (2017). Anti-Breast Cancer Potency of Multistage Extraction from Jamur Dewa (*Agaricus blazei Murill*) Solvents on MCF-7 Cells. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 8(2), 68–73.
- Willment, J., Gordon, S., & Brown, G. (2001). Characterization of the human  $\beta$ -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*, 76, 43818–23.
- Wisitrassameewong, K., Karunarathna, S. C., Thongklang, N., Zhao, R., Callac, P., Moukha, S., ... Hyde, K. D. (2012). *Agaricus subrufescens*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 131–146. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.003>
- Wu, B., Cui, J., Zhang, C., & Li, Z. (2012). A polysaccharide from *Agaricus blazei* inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), 1116–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.02.023>
- Xu, M., Yasuda, M., Mizuno, M., & Ashida, H. (2012).  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(10), 1656–1663.

- Yamanaka, D., Tada, R., Adachi, Y., Ishibashi, K. I., Motoi, M., Iwakura, Y., & Ohno, N. (2012). *Agaricus brasiliensis*-derived  $\beta$ -glucans exert immunoenhancing effects via a dectin-1-dependent pathway. *International Immunopharmacology*, 14(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.07.017>
- Yang, H.-L., Kuo, Y.-H., Tsa, C.-T., Huang, Y.-T., Chen, S.-C., Chang, H.-W. (2011). Anti-metastatic activities of Mediated, *Antrodia camphorata* against human breast cancer cells Food, through suppression of the MAPK signaling pathway. *Chem Toxicol*, (49), 290–298.
- Younis, A., Stewart, J., Wu, F., Shikh, H. El, Hassan, F., & Elaasser, M. (2014). Cytotoxic Activity of Edible Mushrooms extracts against Tumor Cell Lines, 3(11), 736–749.
- Zhang, L., Hu, Y., Duan, X., Tang, T., Shen, Y., Hu, B., ... Liu, Y. (2018). PT, (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.084>
- Zhu, Y., Ding, X., Wang, M., Hou, Y., Hou, W., & Yue, C. (2016). Structure and antioxidant activity of a novel polysaccharide derived from *Amanita caesarea*. *Molecular Medicine Reports*, 14(4), 3947–3954. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5693>
- Zhu, Z.-Y., Liu, X.-C., Fang, X.-N., Sun, H.-Q., Yang, X.-Y., & Zhang, Y.-M. (2016). Structural characterization and anti-tumor activity of polysaccharide produced by *Hirsutella sinensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 959–966. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.10.075>
- Zied, D. C., Pardo, J. E., Tomaz, R. S., Miasaki, C. T., & Pardo-Giménez, A. (2017). Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2713742>
- Ziliotto, L., Pinheiro, F., Barbisan, L. F., & Rodrigues, M. A. M. (2009). Screening for *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of the mushroom *Agaricus blazei*. *Nutrition and Cancer*, 61(2), 245–250. <https://doi.org/10.1080/01635580802395717>



**ANEXOS**

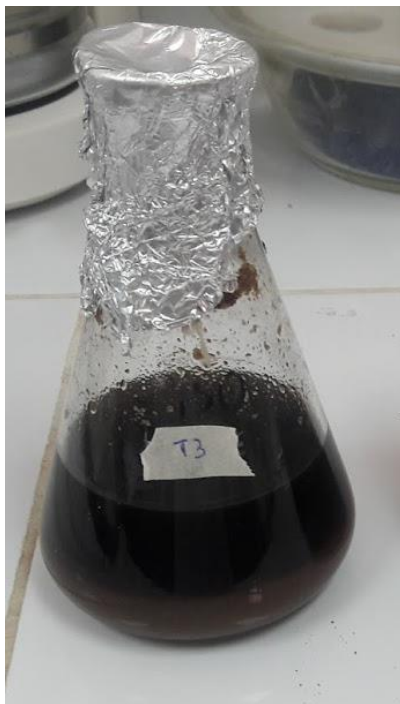
**ANEXO A. Fotografías de extractos con los cuatro tratamientos**



*EXTRACTO CON TRATAMIENTO 1*



*EXTRACTO CON TRATAMIENTO 2*

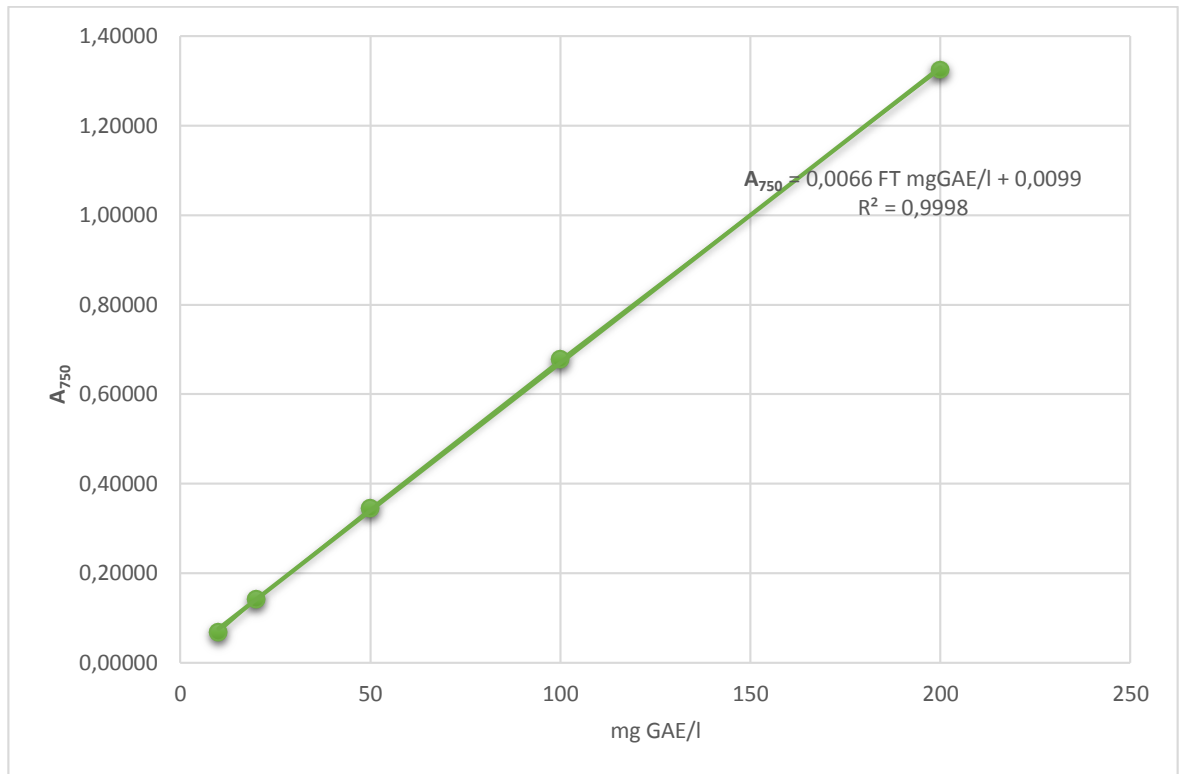


*EXTRACTO CON TRATAMIENTO 3*



*EXTRACTO CON TRATAMIENTO 4*

## ANEXO B. Curva de calibración de fenoles totales

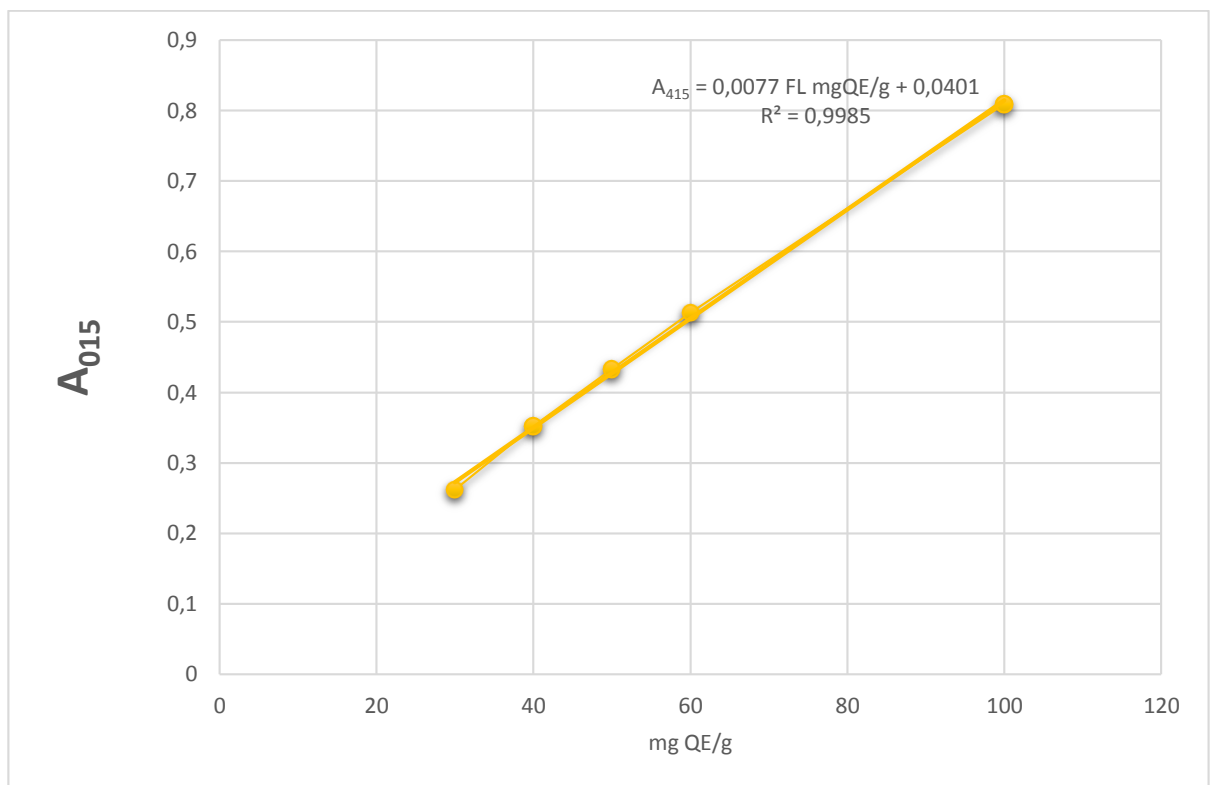


Curva de calibración para determinación de fenoles totales, el eje de las abscisas representa la concentración de fenoles totales expresado en mg Equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE/l,) y en eje de las ordenadas el valor de la absorbancia a 750 nm ( $A_{750}$ ) con una relación directamente proporcional. La cuantificación de las moléculas se realizó por el Método Folin-Ciocalteu, con 3 réplicas para los 4 tratamientos.

Ecuación de regresión lineal:

$$[FT]_{mg\ GAE/l} = \frac{A_{750} - 0,0099}{0,0066} \quad R^2 = 0,9998$$

## ANEXO C. Curva de calibración de flavonoides

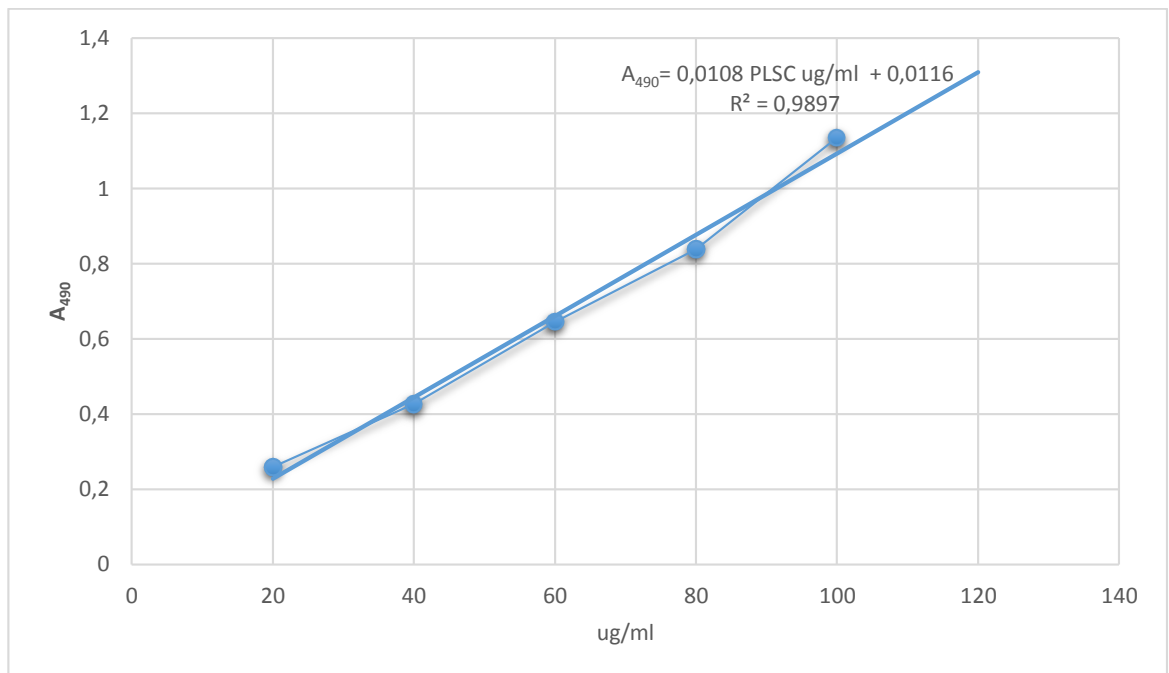


Curva de calibración para determinación de flavonoides a partir del ensayo colorimétrico de  $\text{AlCl}_3$  en microplato, el eje de las abscisas representa la concentración de flavonoides en mg de quercetina por gramo (mg QE/g) y en eje de las ordenadas el valor de la absorbancia a 415 nm ( $A_{415}$ ) con una relación directamente proporcional.

Ecuación de regresión lineal:

$$[FL]_{mg\ QE/ml} = \frac{A_{415} - 0,0401}{0,0077} \quad R^2 = 0,9985$$

## ANEXO D. Curva de calibración de polisacáridos



Curva de calibración para determinación de polisacáridos por el Método Fenol-Sulfúrico, el eje de las abscisas representa la concentración de polisacáridos en µg por ml relacionado proporcionalmente con valor de la absorbancia a 490 nm ( $A_{490}$ ).

Ecuación de regresión lineal:

$$[PLSC]_{\mu g/ml} = \frac{A_{490} - 0,0116}{0,0108} \quad R^2 = 0,9897$$

**ANEXO E. Concentración de compuestos bioactivos de los 4 tratamientos de *A. blazei***

<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción Tratamiento</i>	<i>Réplicas</i>	<i>FT mg GAE/g</i>	<i>FL mg QE/g</i>	<i>PLSC mg GLUC/g</i>
<b>T1</b>	Muestra agua 1:15, T ebullición; 60 min	R1	21,4382	2,2739	191,8190
		R2	20,9371	2,4748	192,5829
		R3	21,4382	2,2739	192,8375
<b>T2</b>	Muestra agua 1:15, T ebullición; 120 min	R1	16,7082	2,3029	132,9509
		R2	16,7082	2,1752	133,5984
		R3	16,6020	2,1570	133,4365
<b>T3</b>	Muestra etanol 50% 1:15, T ebullición; 60 min	R1	14,6944	1,5531	81,8330
		R2	14,7740	1,4848	81,5298
		R3	15,0525	1,4711	82,9246
<b>T4</b>	Muestra etanol 50% 1:15, T ebullición; 120 min	R1	16,2404	1,8446	57,2849
		R2	16,2136	1,8584	56,7124
		R3	16,2404	1,8631	56,2217

**ANEXO F. Tablas ANOVA de concentraciones de compuestos bioactivos de extractos de *A. blazei***

**Tabla F1**

Análisis de Varianza para concentración de fenoles totales de extractos de *A. blazei*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	64,9366	1	64,9366	1745,38	0,0000
B:Disolvente	147,201	1	147,201	3956,48	0,0000
AB	0,988118	1	0,988118	26,56	0,0021
Bloques	0,0963182	2	0,0481591	1,29	0,3409
Error total	0,22323	6	0,037205		
Total (corr.)	213,445	11			

**Tabla F2.**

Análisis de Varianza para concentración de flavonoides de extractos de *A. blazei*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	0,0373637	1	0,0373637	6,05	0,0491
B:Disolvente	1,06959	1	1,06959	173,25	0,0000
AB	0,173906	1	0,173906	28,17	0,0018
Bloques	0,00655033	2	0,00327517	0,53	0,6136
Error total	0,0370424	6	0,00617374		
Total (corr.)	1,32445	11			

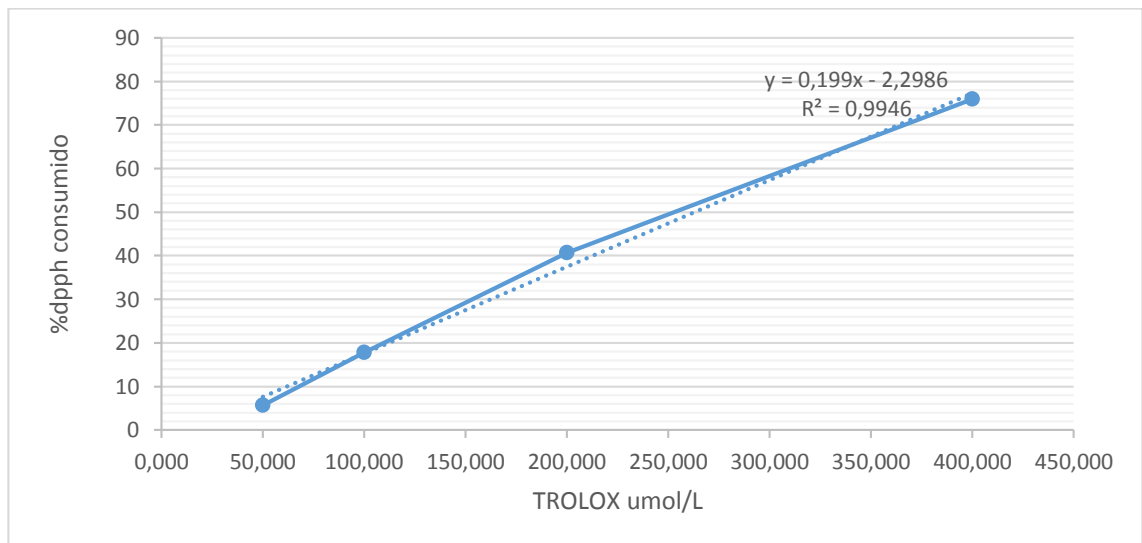
**Tabla F3.**

Análisis de Varianza para concentración de polisacáridos de extractos de *A. blazei*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	5347,67	1	5347,67	17328,41	0,0000
B:Disolvente	26200,5	1	26200,5	84899,13	0,0000
AB	853,204	1	853,204	2764,69	0,0000
Bloques	0,579994	2	0,289997	0,94	0,4415
Error total	1,85164	6	0,308607		
Total (corr.)	32403,8	11			

**ANEXO G. Datos y Curva de calibración para evaluación de Actividad Antioxidante (AA)**

Tratamiento	Réplicas	$A_{515}$	%DPPH consumido	$\mu M$ Trolo/l Dilución 1:40	$\mu M$ Trolo/l	$\mu M$ Trolo/g	$\bar{x}$ %DPPH consumido	$\bar{x}$ $\mu M$ Trolo/g	DS
		T1	R1	0,579	10,64	65,07	2602,97	71,707	13,01
	R2	0,542	16,36	93,77	3750,96	103,33			
	R3	0,57	12,04	72,06	2882,21	79,4			



Curva de calibración para determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH en microplaca con una relación directamente proporcional entre concentración de  $\mu mol/l$  en relación al porcentaje de DPPH consumido, valor determinado con la ecuación a partir de la determinación de la absorbancia a 515nm.

Ecuación de regresión lineal:

$$[AA]_{\mu mol Trolox/l} = \frac{\%DPPH_{consumido} - 1,3217}{0,1955} \quad R^2 = 0,9952$$

## ANEXO H. Datos MTT de Linfocitos

RÉPLICAS	BLANCO	$1 \times 10^{-11}$	$1 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-1}$
<b>R1</b>	0,077	0,076	0,077	0,079	0,082	0,080	0,078	0,082	0,084	0,089	0,093	0,104
<b>R2</b>	0,081	0,080	0,080	0,080	0,080	0,082	0,082	0,083	0,085	0,092	0,105	0,105
<b>R3</b>	0,079	0,082	0,080	0,080	0,080	0,081	0,080	0,090	0,086	0,088	0,097	0,121
<b>R4</b>	0,079	0,082	0,082	0,081	0,080	0,080	0,086	0,079	0,084	0,088	0,102	0,115
<b>R5</b>	0,081	0,080	0,082	0,081	0,081	0,081	0,084	0,080	0,084	0,085	0,101	0,115
$\bar{x}$	0,079	0,080	0,080	0,080	0,081	0,081	0,082	0,083	0,084	0,088	0,100	0,112
<b>%</b>	0,00	1,03	1,31	1,32	1,74	1,80	3,27	4,54	6,62	11,34	25,80	41,25



**ANEXO I. Datos MTT de células HeLa.**

<b>RÉPLICAS</b>	<b>BLANCO</b>	<b>1x10<sup>-11</sup></b>	<b>1x10<sup>-10</sup></b>	<b>1x10<sup>-9</sup></b>	<b>1x10<sup>-8</sup></b>	<b>1x10<sup>-7</sup></b>	<b>1x10<sup>-6</sup></b>	<b>1x10<sup>-5</sup></b>	<b>1x10<sup>-4</sup></b>	<b>1x10<sup>-3</sup></b>	<b>1x10<sup>-2</sup></b>	<b>1x10<sup>-1</sup></b>
<b>R1</b>	1,531	1,474	1,498	1,454	1,526	1,495	1,462	1,462	1,260	1,242	-	-
<b>R2</b>	1,509	1,488	1,475	1,471	1,467	1,448	1,455	1,431	1,451	1,239	-	-
<b>R3</b>	1,618	1,505	1,555	1,488	1,483	1,468	1,399	1,411	1,440	1,251	0,160	0,193
<b>R4</b>	1,583	1,502	1,501	1,530	1,454	1,435	1,507	1,428	1,468	1,272	0,150	0,146
<b>R5</b>	1,527	1,586	1,467	1,509	1,511	1,483	1,422	1,443	1,485	1,274	0,190	0,136
$\bar{x}$	1,554	1,511	1,499	1,490	1,488	1,466	1,449	1,428	1,421	1,256	0,167	0,158
<b>%</b>	100	94,84	94,10	93,56	93,40	92,01	90,97	89,65	89,19	78,82	10,46	9,93

**ANEXO J. Datos MTT de células MCF - 7**

<b>RÉPLICAS</b>	<b>BLANCO</b>	<b>1x10<sup>-11</sup></b>	<b>1x10<sup>-10</sup></b>	<b>1x10<sup>-9</sup></b>	<b>1x10<sup>-8</sup></b>	<b>1x10<sup>-7</sup></b>	<b>1x10<sup>-6</sup></b>	<b>1x10<sup>-5</sup></b>	<b>1x10<sup>-4</sup></b>	<b>1x10<sup>-3</sup></b>	<b>1x10<sup>-2</sup></b>	<b>1x10<sup>-1</sup></b>
<b>R1</b>	1,850	1,849	1,860	1,657	1,615	1,669	1,680	1,629	1,562	1,472	0,229	0,139
<b>R2</b>	1,893	1,846	1,875	1,792	1,615	1,619	1,656	1,629	1,602	1,445	0,153	0,154
<b>R3</b>	1,892	1,857	1,603	1,871	1,615	1,619	1,680	1,573	1,602	1,489	0,152	0,153
<b>R4</b>	1,922	1,816	1,808	1,674	1,615	1,669	1,656-	1,573	1,562	1,485	0,166	0,138
<b><math>\bar{x}</math></b>	1,889	1,842	1,787	1,749	1,615	1,644	1,668	1,601	1,582	1,473	0,175	0,146
<b>%</b>	100	97,49	94,57	92,55	85,46	87,01	88,31	84,73	83,74	77,95	9,26	7,72