



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS EN CULTIVO
SUMERGIDO DE *Ganoderma sp.* Y EVALUACIÓN DE SU
EFECTO NEUROPROTECTOR E INMUNOMODULADOR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Verónica Núñez Urquiza

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ismael León Rivera

Co-DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Angélica Santana Calderón

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “PRODUCCIÓN DE POLISACÁRIDOS EN CULTIVO SUMERGIDO DE *Ganoderma sp.* Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO NEUROPROTECTOR E INMUNOMODULADOR”, que presenta la alumna **Verónica Núñez Urquiza (5620151001)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Laura Patricia Alvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Victoria Campos Peña Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía	APROBADO	
Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo	APROBADO	
Dra. Gabriela Rosas Salgado Facultad de Medicina-UAEM	APROBADO	
Dra. Delia Vanessa López Guerrero Facultad de Nutrición-UAEM	APROBADO	
Dr. Isaac Tello Salgado CIB-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2021-10-27 12:59:34 | Firmante

oeXw1B4rIMvGDaljlba44QdtKsFXyos9U1cl.G5d9/7GZONAtyJkEMen4MBzb61ihLahXwvxOKSkFTF0aPilnL65AYcgDMAAtMvT+LZz3QxQAAQ8zPprT0xllFp+F6ne3TAyM53wTR UgpYf6g55WfcsyquwFrWYOYcQGqJKBSaMURMp9KeH9VY5Lul47pdhf9Vs2OYj6pF6fNvxvuzUBW6APqDGyKiWjwYDdGglUziCeylnX0wQQ+Yo5H/519JLEV/Rak1GG6Y9T4B MrMQ7nSU/QtRqCdpaoaxOARWOUKpIToEhy3AFmi4JXuuqm/ZjNcBO4XE3EZUae8ImWvy9KA==

J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA | Fecha:2021-10-27 13:33:51 | Firmante

CulL6jgCzwcdlcQQRy9XfdkrNrdiNAUzOm7uzvCcMEwaA3KppH97MnlzZl7P2Z+I4MC3iyC5VoWy26k4jnT9LzMKXutKZ4+FpzXPGETOjmGcBQ03d0VOPqjzBNFIHSQDQZTfb OoW+Wrf6Kg4goAOW2Vkt9kjc/3ayzz55Aby/qfQWdu4/X6HYCbUEk8V8rpl2CTD4+CCBvdELipkDRu7E9vafej+xN5EfPRKzL20Mar71fn4Wd6JL5X59Usf6UFe7pZl6ilZ6hNlqNOA zALKopSDoxWYXel8+0pUurQ1MT2PvrpEljv1TTgf5eW9NclezwlmBfvk1729BBrxgwg==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-10-27 13:43:46 | Firmante

FoHfX/QYn7FHktNcgSev23AEP3OV37/RFxclpgeT0R7r9tb2Hz1QSeQs61J+QU5P7qEy1DzW3xfvoF/vnhvpiKOSpShszKxwDhSjzUQd+HPb4734/LmZUqtatMjM+imEP6yihnlFVq tOyHJd8bs/v1cwU1g6nDJZUEdApSSPwQQ1M3acRIHM1kiqJ15kXaQfyi2RYGelfBxSe/Ott7YsCLpuwQZaOBT/ma12Jo7kr11YpZAGRCeWmF1H2qOSabkt5YB/x4s/jZrS5vapZk fuD2DOnT3s6Yxldh90CRnzosEBITuYRcmASR5thKaXMGYi9AjoPw0tQ99VDOUB9dxw==

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2021-10-27 14:59:07 | Firmante

nsWShiWafRqGcavujpQIDqvFaT+HzHMsRdnxG+esll+zet+Lm6qOse5ZeRzCfETqChNQ817/h4EPHBo4vkiJ12iw3Om9MCE434Y6cGuMWMFKD3nAG+ezKSPqiDCs8NU1Zw wT2MLMMu5iOU29+o1Uu/bhbpQL11uh9XsqpkUVGQDdF7fY/uZPCDC9wqRQvorUx6a39xwL6q7b49YsaYGZc2GxHZackjaAD5Hx7X11NX47MXtPrpVky20kV2y00j7V7j9jt To8KY/4ITXXKYcw9UarwhTzQuIGKesT+T3IQMTDkeRaJA+S29+QZM86GitiBc0Hlml68LHZNlnPQ==

VICTORIA CAMPOS PEÑA | Fecha:2021-10-27 16:25:58 | Firmante

owfuTdNTCoG1PHpCysuOK3mO49nnHh8IXRh6MZymMcq+AcGv+W/jYVsByleJpEiv0gvh9267GAb5GAglCyJiCWRmNawcclpmAuDpB2TfkyqIC21qF9RlyhbA65F9ZFeBgkVWb dlwphJcNFR2JtQe2Z7Y9BjsYB9pC7ysxs54JkDqOniNRGKRrZzfnVaXc+8w9JZgqJCJ/qpECRrXDV6OKxfBzPanrdfQDNmTc+kj6ywY9QygnHNDq/RJ6KOqL5TKDOSkyJL5MC7+q LnE9AZs1qf6VSS4HPnhjHZKJLSCmaKYEHWwYlg7JwAoy+OkS2W00O/Eac9d0gq419tGg3nA==

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2021-10-27 16:40:23 | Firmante

DgefthM7Sy9hYnl1T013iU82fP5x11EevJQTWRVl+WbBEC7mBZTGXbz05QOC2pi5fUeTWPUq5dFX59KhrAvvDZHF9Xdh0AsRr2x6/nBapeqq5nanj1/01DW3PGAERAbzTJIQLEt SeXEY9o2lJhTezLcjpafk+QRYRiKmxrb4qt54GCojyeXIT+LDYwWl0qFXE6AWfwDO4n3hBCuA3IDJn8eLcYJeLHtdkwrmeoIUQPnM5s+44HmfdCzv5PWCZgD0Z/Cn1bAcofd/Q BDhy+ZnxuCsnuBpivadeoafar43DHLWCy9O6v2IObAfm8eiBC5hF+B+jbEHS6l46xOMKeA==

ISAAC TELLO SALGADO | Fecha:2021-10-28 08:02:24 | Firmante

MyhqzHXoN4wlc3iS661Mty5A84HK3dzClyvHzuS6+E3/Qifasm0OCXOGv++tzVHo3yIKLECDzxSPcSM9AZgTVfcvlAzq6KRY7IRhzWkhlRBGks5bS/esg1Tvk62dqTQ+qULDsKSAL ajzDss9Kg6u6zX64dYYqu+dJPbndxtR58/vumNrBBd/Rk2tovZcPKISOZACqsD83ws+MFEW7vqDQ9bpAnA38kb4d//dRQ9x8UOmB80AcRhqom6VYDR0pDYi9M7y7rqAxcYu8sV6 RGQhSyz1cluQ2eMbX0/9II0U7ffyXy3KCD8VnQmq6Jhnga5HSjkuPvZ2YNJwMI5uYXllg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xkeW3QU2J](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/reK7MpWmvd6aLdSNrs9DYrHme7REmMGx>



PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

El presente trabajo de tesis doctoral ha generado 1 publicación:

- Núñez-Urquiza V, Villeda-Hernández J, Montiel-Arcos E, Tello I, Campos-Peña V, Herrera-Ruiz M, et al. Evaluation of the Anticonvulsant, Anxiolytic, Sedative, and Neuroprotective Activities of Polysaccharides from Mycelium of Two *Ganoderma* Species. *Pharmacogn J.* 2021;13(5): 1161-1173

El presente trabajo fue presentado en los siguientes eventos:

- 14^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales en La Universidad Autónoma del Estado de Morelos y La Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A. C. Presentación en modalidad de Cartel: **Producción de polisacáridos en cultivo sumergido de *Ganoderma sp.* y evaluación de su efecto neuroprotector.** Mayo 2018.
- 5^o Congreso Latinoamericano de Glicobiología y 2^a Reunión Red Glicociencia en Salud, The Latin American Society of Glycobiology and the Cell Dynamics Research Center of the Morelos State Autonomous University. Presentación modalidad Cartel: **Antioxidant and prooxidant effects of polysaccharides from submerged culture of *Ganoderma sp.*** Octubre 2019.

RESUMEN

El uso del género *Ganoderma* como un hongo con un potencial terapéutico amplio ha generado una investigación amplia en determinar los metabolitos biológicamente activos (MBA), y posteriormente en producir estos metabolitos a gran escala utilizando técnicas biotecnológicas. Uno de los MBA son los polisacáridos, los cuales han mostrado diversas actividades biológicas (p. ej. neuroprotectora e inmunomoduladora).

El presente trabajo tuvo como objetivo producir, caracterizar y evaluar la actividad neuroprotectora e inmunomoduladora de una fracción de polisacáridos solubles en cultivo sumergido de una cepa de *Ganoderma sp.*

La cepa de *Ganoderma sp.* fue recolectada en una selva baja caducifolia en el Estado de Morelos. La cepa aislada fue sometida en cultivo sumergido en matraz Erlenmeyer y posteriormente en biorreactor tanque agitado. Una fracción de polisacáridos solubles fue aislada y caracterizada por RMN. A esta fracción de polisacáridos de *Ganoderma sp.* se le determinó su efecto anticonvulsivo y neuroprotector en ratas, así como su efecto inmunomodulador en la regulación de especies reactivas de oxígeno en células en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y células mononucleares de sangre de cordón (CBMCs).

El cultivo sumergido de *Ganoderma sp.* produjo polisacáridos como el metabolito más abundante. Se logró aislar una fracción de polisacáridos soluble en agua, la cual está conformada por alfa- y beta-glucanos. Esta fracción de polisacáridos mostró un efecto anticonvulsivo y neuroprotector, así como inmunomodulador.

La cepa de *Ganoderma sp.* recolectada en selva baja caducifolia, produce polisacáridos con actividades en el sistema nervioso central e inmunológico, de forma similar a las cepas de *Ganoderma* recolectadas en bosque templados tanto en México como en otros países.

ABSTRACT

A *Ganoderma sp.* strain was collected in a deciduous forest in the State of Morelos, Mexico. The isolated strain was subjected to submerged culture in an Erlenmeyer flask and subsequently in a stirred tank bioreactor. A soluble polysaccharide fraction was isolated from the submerged culture and characterized by NMR.

At this polysaccharide fraction of *Ganoderma sp.* its anticonvulsant and neuroprotective effect was determined in rats, as well as its immunomodulatory effect on the regulation of reactive oxygen species in cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and cord blood mononuclear cells (CBMCs).

The submerged culture of *Ganoderma sp.* produced polysaccharides as the most abundant metabolite. It was possible to isolate a fraction of polysaccharides soluble in water, which is made up of alpha- and beta-glucans. This polysaccharide fraction showed an anticonvulsant and neuroprotective effect, as well as an immunomodulatory effect.

The *Ganoderma sp.* strain collected in a deciduous forest produces polysaccharides with activities in the central nervous and immune system, in a similar way to the *Ganoderma* strains collected in temperate forests both in Mexico and in other countries.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 327 de Química Analítica Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del **Dr. Ismael León Rivera** y en el Laboratorio de Inmunología Celular del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la Co-dirección de la Dra. María Angélica Santana Calderón, con el apoyo de una beca de Posgrado (**N° 572999**) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades del Centro de Investigaciones Químicas por contar con la infraestructura que me permitió concluir mi proyecto de tesis.

A las autoridades del Centro de Investigación en Dinámica Celular por contar con la infraestructura que me permitió concluir mi proyecto de tesis.

A las autoridades del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por contar con la infraestructura que me permitió concluir mi proyecto de tesis.

A las autoridades del Centro de Investigaciones Biológicas por contar con la infraestructura que me permitió concluir mi proyecto de tesis.

A todos los encargados de las áreas analíticas de CIQ por los servicios brindados.

A CONACyT por haberme otorgado la beca de Tesis de Doctorado.

A las autoridades y personal de Servicios de Salud de Morelos, de las unidades: Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, Hospital General de Cuernavaca, Hospital General de Temixco y la Subdirección de Enseñanza, Investigación y Capacitación por facilidades otorgadas para la realización de muestreo en campo.

A mi asesor el Dr. Ismael León Rivera por permitirme colaborar en su proyecto y brindarme todas las facilidades para que este se llevara a cabo, por sus consejos y apoyo.

A mi asesora la Dra. María Angélica Santana Calderón por permitirme colaborar en su laboratorio y brindarme las facilidades para llevar a cabo este proyecto, por sus consejos y apoyo.

A mi comité tutorial: Dr. Thomas Buhse, Dra. Laura Patricia Alvarez Berber, Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez, Dr. Ismael León Rivera, Dra. María Angélica Santana Calderón por los consejos brindados durante el doctorado para mejorar el proyecto de tesis.

A mi comité revisor: Dra. Laura Patricia Alvarez Berber, Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez, Dra. Victoria Campos Peña, Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, Dra. Gabriela Rosas Salgado, Dra. Delia Vanessa López Guerrero y Dr. Isaac Tello Salgado, por los consejos brindados para mejorar la redacción y el proyecto de tesis.

Al M. Elizur Montiel y al Dr. Isaac Tello Salgado por proporcionar la cepa de *Ganoderma sp.* utilizada en este proyecto.

Al Dr. Caleb Castillo Lormendez por la asesoría brindada para el manejo del biorreactor, por los consejos para mejorar el proyecto de tesis y por su amistad.

A mi esposo, familia y amigos por confiar en mí, por brindarme su apoyo incondicional, por darme ánimos y nunca dejarme caer con sus consejos, por acompañarme en mi crecimiento profesional.

ÍNDICE

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	i
RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ABREVIATURAS	xvi
OBJETIVO	1
Objetivo General	1
Objetivos Específicos	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
JUSTIFICACIÓN	3
HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO I	6
1 GANODERMA, SU CRECIMIENTO Y SUS METABOLITOS	6
1.1 ANTECEDENTES	6
1.1.1 INTRODUCCIÓN	6
1.1.2 EL REINO FUNGÍ	7
1.1.3 PROPIEDADES MEDICINALES	8
1.1.4 GÉNERO <i>GANODERMA</i>	9
1.1.5 TAXONOMÍA	9
1.1.6 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	9
1.1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA	10
1.1.8 TRITERPENOS	11
1.1.9 POLISACÁRIDOS	12
1.1.10 POLISACÁRIDOS β -GLUCANOS	13
1.1.11 POLISACÁRIDOS α -GLUCANOS	15
1.1.12 <i>GANODERMA</i> EN MÉXICO	16

1.1.13 CULTIVO DE HONGOS.....	17
1.1.14 CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO	18
1.1.15 CULTIVO EN ESTADO LÍQUIDO	20
1.1.16 CULTIVO SUMERGIDO DE <i>GANODERMA LUCIUDM</i>	21
1.2 METODOLOGÍA.....	22
1.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	22
1.2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	22
1.2.3 CULTIVO SUMERGIDO: PREINÓCULO	23
1.2.4 MEDIO BFL+C	23
1.2.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MATRAZ	23
1.2.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN BIORREACTOR.....	24
1.2.7 DETERMINACIÓN DE BIOMASA	24
1.2.8 AISLAMIENTO DE Los POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES	24
1.3 RESULTADOS.....	25
1.3.1 TAXONOMÍA CLÁSICA	25
1.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA CEPA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO	26
1.3.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>GANDOERMA SP.</i>	26
1.3.4 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA FRACCIÓN EPS-F1.....	29
1.4 DISCUSIÓN.....	37
1.5 CONCLUSIONES	45
CAPÍTULO II.....	46
2 ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA.....	46
2.1 ANTECEDENTES	46
2.1.1 INTRODUCCIÓN	46
2.1.2 SISTEMA NERVIOSO.....	47
2.1.3 CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO.....	48
2.1.4 NEUROPROTECCIÓN	51
2.1.5 LOS HONGOS Y SU ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA.....	51
2.1.6 GANODERMA COMO NEUROPROTECTOR.....	52
2.2 METODOLOGÍA.....	55

2.2.1	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA	55
2.2.2	ANÁLISIS HISTOLÓGICO	55
2.2.3	TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	55
2.3	RESULTADOS	57
2.3.1	EL PRETAMIENTO CON <i>GANODERMA SP.</i> INHIBE LAS CONVULSIONES.....	57
2.3.2	EFFECTO DE <i>GANODERMA SP</i> EN LA EXPRESIÓN DE HSP60 Y HSP70	57
2.3.3	EFFECTO NEUROPROTECTOR DE <i>GANODERMA SP</i>	58
2.4	DISCUSIÓN.....	62
2.5	CONCLUSIONES	65
CAPÍTULO III		66
3	ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE <i>GANODERMA</i>	66
3.1	ANTECEDENTES	66
3.1.1	INTRODUCCIÓN	66
3.1.2	SISTEMA INMUNE	67
3.1.3	INMUNIDAD INNATA.....	68
3.1.4	MONOCITOS.....	69
3.1.5	INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	70
3.1.6	LINFOCITOS	72
3.1.7	SISTEMA INMUNE NEONATAL	73
3.1.8	LOS HONGOS MEDICINALES EN EL SISTEMA INMUNE	74
3.1.9	POLISACÁRDIOS INMUNOMODULADORES	76
3.1.10	ESTUDIOS EN EL SISTEMA INMUNE CON <i>GANODERMA</i>	77
3.1.11	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)	80
3.1.12	SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	83
3.1.13	ESTRÉS OXIDATIVO	84
3.1.14	ESTUDIOS DE <i>GANODERMA</i> SOBRE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	85
3.2	METODOLOGÍA.....	87
3.2.1	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	87
3.2.2	PURIFICACIÓN DE SANGRE.....	87

3.2.3	DIDROHETIDIO (DHE)	87
3.2.4	REACTIVO MITOSOX	87
3.2.5	TINCIÓN ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	88
3.2.6	TINCIÓN MULTIPARAMÉTRICA	88
3.2.7	EXTRACCIÓN DE RNA	89
3.2.8	EXTRACCIÓN DE CDNA.....	89
3.2.9	DISEÑO DE CEBADORES PARA CDNA.....	89
3.2.10	ANÁLISIS POR RT-QPCR.....	90
3.3	RESULTADOS	91
3.3.1	ANÁLISIS DE ERO DE LA FRACCIÓN EPS-F1 EN PBMCS CON DHE	91
3.3.2	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA FRACCIÓN EPS-F1 EN LOS NIVELES DE ERO CITOSOL Y MITOCONDRIAL DE CBMCs.....	97
3.3.3	TINCIÓN MULTIPARAMETRÍCA	99
3.3.4	EXPRESIÓN RELATIVA DE INTERLEUCINAS POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL EN CÉLULAS PBMCS Y CBMCs.....	103
3.4	DISCUSIÓN.....	111
3.5	CONCLUSIONES	115
	BIBLIOGRAFÍA	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructuras representativas de los diferentes tipos de ácidos ganodéricos	12
Figura 1-2. Estructura general de un β glucano	14
Figura 1-3. Estructura general de los polisacáridos α glucanos.....	15
Figura 1-4. A) <i>G. sessil</i> , B) <i>G. australae</i> , C) <i>G. tsuage</i> , D) <i>G. curtissi</i> , E) <i>G. applanatum</i> y F) <i>G. curtissi</i>	17
Figura 1-5. Proceso biotecnológico general para la producción orgánica del cuerpo fructífero de <i>G. lucidum</i>	19
Figura 1-6. Producción de biomasa y polisacárido en cultivo sumergido de <i>G. lucidum</i> (Núñez-Urquiza, 2017).....	21
Figura 1-7. A) Parte superior de <i>Ganoderma sp.</i> ; B) Parte inferior de <i>Ganoderma sp</i>	25
Figura 1-8. Esporas de <i>Ganoderma sp.</i>	25
Figura 1-9. Gráfica de la tasa de crecimiento de <i>Ganoderma sp</i> en caja Petri. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 de muestras independientes.....	26
Figura 1-10. Cinética de crecimiento a partir de <i>Ganoderma sp.</i> en matraz Erlenmeyer y biorreactor de tanque agitado con medio BFL+C modificado. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 y n=3 de muestras independientes.....	27
Figura 1-11. Cinética de producción de polisacáridos extracelulares a partir de <i>Ganoderma sp.</i> en matraz Erlenmeyer y biorreactor tanque agitado. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 y n=3 de muestras independientes	28
Figura 1-12. 6 Comportamiento del pH en la cinética de <i>Ganoderma sp.</i> en matraz Erlenmeyer y biorreactor de tanque agitado con medio BFL+C modificado. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 y n=3 de muestras independientes.....	28
Figura 1-13. Espectro de infrarrojo de los polisacáridos de la fracción EPS-F1....	29
Figura 1-14. Comparación de los espectros Blanco y EPS-F1 de RMN ^1H procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O	30
Figura 1-15. Comparación de los espectros Blanco y EPS-F1 de RMN ^1H procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O .En el círculo verde señal 5.42ppm, naranja 5.24ppm, morado 4.64ppm, rojo 4.48ppm, café 4.2ppm, dorado 4.06ppm y recuadro 3 a 3.9 ppm.....	31
Figura 1-16. Comparación de los espectros Blanco y EPS-F1 de RMN de DEPT-Q procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O	32

Figura 1-17. Espectro de RMN ^1H procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O , de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de <i>Ganoderma sp.</i>	33
Figura 1-18. Espectro de DEPT-Q procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O , de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de <i>Ganoderma sp.</i>	34
Figura 1-19. Espectro de COSY procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O , de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de <i>Ganoderma sp.</i>	35
Figura 1-20. Espectro de COSY procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O , de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de <i>Ganoderma sp.</i>	35
Figura 1-21. Espectro de HSQC procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O , de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de <i>Ganoderma sp.</i>	36
Figura 2-1. Estructura básica de la neurona (https://www.abcfichas.com/la-neurona-estructura-y-funcion/)	48
Figura 2-2. Células principales que componen la neuroglia (https://tiposdecélulas.net/células-gliales/).	49
Figura 2-3. Microfotografía de astrocitos in vitro (Martínez-Gómez, 2014)	50
Figura 2-4. Microfotografías de tejido cerebral utilizando el anticuerpo HSP60 y HSP70 en el hipotálamo. El grupo de control y el grupo tratado con <i>Ganoderma sp.</i> muestran poca reactividad a la proteína HSP-60 y HSP70. Se observa una mayor presencia de actividad proteica en el grupo tratado con ácido kaínico (flecha roja), que disminuye con el pretratamiento con <i>Ganoderma sp.</i> Las flechas negras muestran las células viables.	58
Figura 2-5. Micrografías de tejido de la zona CA1 y CA3 del hipocampo, teñidas con H&E. Las flechas rojas muestran edema intersticial y las flechas verdes neuronas sanas.	59
Figura 2-6 Micrografías de tejido del hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza teñidas con GFAP. Células sanas (flecha negra); Células con retracción nucleosomática (flechas rojas); Astrocito reactivo (triangulo blanco); Astrocito funcional (estrella amarilla).	60
Figura 2-7. Micrografías de tejido del hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza teñidas con Neu-N. Células sanas (flecha negra); Células con retracción nucleosomática (flecha roja).	61
Figura 3-1. Inmunidad innata e inmunidad adaptativa	69
Figura 3-2. Tipos de inmunidad adaptativa	71
Figura 3-3. Adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno (Pedraza Chaverri & Cárdenas Rodríguez, 2006)	80

Figura 3-4. Citometría de flujo de la oxidación de dihidroethidio de las células T CD8+ y los neutrófilos.....	82
Figura 3-5. Medición de ERO en linfocitos T CD8+ neonatales y de adulto y su efecto en la activación celular.....	83
Figura 3-6. Citometría de flujo de las poblaciones A) región de linfocitos; B) región de monocitos.....	91
Figura 3-7. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05	92
Figura 3-8. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05	93
Figura 3-9. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05	94
Figura 3-10. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4.....	95
Figura 3-11. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 5.....	96
Figura 3-12. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 5. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05. ...	97
Figura 3-13. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 3. Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.	98
Figura 3-14. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la	

- fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 3. Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05. 99
- Figura 3-15. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD4⁺ positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 y n=3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05..... 100
- Figura 3-16. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD8⁺ positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 y n=3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05..... 101
- Figura 3-17. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD19 positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 4 y n=3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05..... 102
- Figura 3-18. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD14 positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05. 103
- Figura 3-19. Expresión relativa de las citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ en células PBMCs y CBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por RT-qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 3..... 105
- Figura 3-20. Expresión relativa de las citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α en células PBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $(x) \pm \sigma$ n = 3. Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05. 107
- Figura 3-21. Expresión relativa de las citocinas GPX1 y SOD1 en células PBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 3.... 109
- Figura 3-22. Expresión relativa de las citocinas GPX1 y SOD1 en células PBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $x \pm \sigma$ n = 3.... 110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Compuestos biológicamente activos aislados de diferentes especies de <i>Ganoderma</i>	10
Tabla 1-2. Polisacáridos aislados con configuración beta de diferentes especies de <i>Ganoderma</i>	14
Tabla 1-3. Polisacáridos con configuración alfa aislados de <i>Ganoderma</i>	16
Tabla 3-1. Efectos de polisacáridos de <i>G. lucidum</i> en células del sistema inmunológico	77
Tabla 3-2. Mecanismos de defensa antioxidante	84
Tabla 3-3. Lista de cebadores diseñados para RT-qPCR	103

ABREVIATURAS

^1H	Hidrógeno
^{13}H	Carbono 13
δ	Desplazamiento químico
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
β	Posición
α	Posición
σ	Desviación estándar
\bar{x}	Promedio
μ_{max}	Velocidad específica de crecimiento máxima
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Ácido kaínico
BFL+C	Buffer de fosfatos líquido más cereal
CBMCs	Células mononucleares de sangre de cordón
cERO	Especies reactivas de oxígeno en el citosol
CH	Metino
CH₂	Metileno
CH₃	Metilo
CLUH	Proteína mitocondrial agrupada homóloga
C/N	Carbono-Nitrógeno
COSY	Espectroscopía de correlación

DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DHE	Didrohetidio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPO	peróxido de ergosterol
EPS-F1	Polisacárido extracelular fracción 1
ER	Retículo endoplásmatico
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
EtOH	Etanol
FIP	Proteínas inmunomoduladoras fúngicas
Gal	Galactosa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
Glc	Glucosa
GL	<i>Ganoderma lucidum</i>
GLOS	Oligosacárido de <i>Ganoderma lucidum</i>
GLPS	Polisacárido de <i>Ganoderma lucidum</i>
GLS	Esporas de <i>Ganoderma lucidum</i>
GPX1	Glutati3n peroxidasa
HMBC	Correlaci3n de enlaces m3ltiples heteronucleares
HSQC	Coherencia cuántica única heteronuclear

HSP60	proteínas de shock térmico de 60 KDa
HSP70	Proteínas de shock térmico de 70 KDa
ICV	Intracerebroventricular
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucinas
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
i.p	Intraperitoneal
J	Constante de acoplamiento
lb	Libras
LPS	Lipopolisacárido
MBA	Metabolitos Biológicamente Activos
mERO	Especies reactivas de oxígeno en la mitocondria
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
Neu-N	Proteína nuclear neuronal
n	Número de muestras
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NK	Células natural killer

PBMCs	Células en células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
P_{max}	Producción máxima d producto
ppm	Partes por millón
PTZ	Pentilentetrazol
p/v	Peso-volumen
RL	Radical libre
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RT-qPCR	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real
SE	Sin Estimulo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOD1	Superóxido dismutasa
STZ	Estreptozotocina
TCR	Receptores de linfocitos t
TNF-α	Factor α de necrosis tumoral
TOMM34	subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM34
vvm	Volumen de aire por unidad de volumen de medio por minuto

X_{max}

Producción máxima

 $Y_{p/x}$

Rendimiento producto-biomasa

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio biotecnológico, químico y biológico de una especie de *Ganoderma* recolectada en la zona de la reserva de la Biosfera Sierra de Huautla del Estado de Morelos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un cultivo sumergido del espécimen de *Ganoderma sp.* en matraz y biorreactor de tanque agitado.
- Aislar los metabolitos biológicamente activos obtenidos del cultivo sumergido del espécimen de *Ganoderma sp.*
- Identificar los metabolitos biológicamente activos obtenidos del cultivo sumergido del espécimen de *Ganoderma sp.*
- Evaluar el efecto anticonvulsivo y neuroprotector de los MBA aislados.
- Evaluar el efecto de los MBA aislados en células mononucleares de sangre periférica de adulto (PBMCs) y células mononucleares de sangre de cordón de neonato (CBMCs), en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de células.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades neurodegenerativas se definen como una condición fatal y debilitante que resulta en un incremento en el número de células nerviosas muertas. Dentro de estas enfermedades se encuentran la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington. Actualmente no hay ningún fármaco o medicamento eficaz disponible que pueda tratar las enfermedades neurodegenerativas, solo pueden ralentizar la progresión de la enfermedad de forma transitoria. Los conceptos relacionados con la patogénesis son metabolismo alterado, el estrés oxidativo es generado y las especies reactivas de oxígeno (ERO). Se considera que las especies reactivas de oxígeno son responsable del desarrollo de varios tipos de trastornos neurodegenerativos trastornos.

Los hongos exhiben potentes propiedades medicinales con antioxidantes, antiinflamatorio, anticanceroso, inmunomodulador, antimicrobiano, atributos hepatoprotectores, antidiabéticos y vitaminas. Los cuerpos fructíferos y la biomasa de micelio de diferentes hongos es una excelente fuente terapéutica de compuestos. Por lo tanto, el consumo regular de hongos puede aumentar la respuesta inmune en humanos y protegerlos de varias enfermedades.

Las enfermedades neurodegenerativas son una patología neurológica común que determina un deterioro progresivo del cerebro o del sistema nervioso. Para el tratamiento de estas enfermedades se han propuesto diversos tratamientos en la medicina alopática, pero ocasionando diversos efectos secundarios.

Los hongos medicinales han mostrado efectos positivos para prevenir varias disfunciones neuronales ocasionadas por las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Hongos como *Grifola frondosa*, *Lignosus rhinocerotis*, *Hericium erinaceus* pueden mejorar las funciones cognitivas. Las propiedades nutraceuticas de los hongos comestibles como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes* y *Auricularia auricular-judae* pueden ayudar a prevenir la progresión de enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y la epilepsia.

JUSTIFICACIÓN

Los hongos han sido utilizados por la humanidad desde hace miles de años. Se estima que hay 140 000 especies de hongos, sin embargo, se estima que se conoce alrededor del 10% de estas especies, entre los cuales 2 000 hongos se reportan como comestibles y alrededor de 200 hongos silvestres se usan con fines medicinales (Rathore, Prasad, & Sharma, 2017; Zhong & Tang, 2004).

Uno de los géneros de hongos más utilizados por sus propiedades medicinales es *Ganoderma*. Este género se encuentra distribuido por las zonas de clima templado de todo el mundo. Es utilizado principalmente en la medicina tradicional asiática, para el tratamiento de varias enfermedades reportadas en Materia Medica de Shen Nong (Boh, Berovic, Zhang, & Zhi-Bin, 2007).

Las actividades biológicas reportadas para el género *Ganoderma* son: antitumorales, inmunomoduladores, cardiovasculares, respiratorios, antihepatotóxicos y del sistema nervioso central. Estas actividades son atribuidas a metabolitos biológicamente activos (MBA) tales como: polisacáridos, triterpenos, compuestos fenólicos, aminoácidos, entre otros. Entre las especies ya reportadas se encuentran *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma atrum*, *Ganoderma tsuage*, *Ganoderma multipileum*, *Ganoderma applanatum*.

La mayoría de los ejemplares del género *Ganoderma* estudiados han sido recolectadas en bosques templados de Asia. Son pocos los reportes de cultivo, análisis micoquímico y evaluación farmacológica de hongos recolectados en México. Y a nivel mundial son aún menos los estudios de especies de *Ganoderma* recolectadas en selva baja caducifolia.

Las actividades biológicas reportadas de *Ganoderma* han ocasionado que sea un hongo de alta demanda (para su comercialización o investigación). Su escasez en la naturaleza ha propiciado el desarrollo de otros métodos de crecimientos como el cultivo en estado sólido, pero se requiere de mucho tiempo para la obtención del cuerpo fructífero. Otro método es el cultivo sumergido del micelio que produce metabolitos en poco tiempo (Boh et al., 2007; Elisashvili, 2012).

Los hongos medicinales se utilizan para obtener compuestos nuevos y naturales que modulan las respuestas inmunitarias y poseen propiedades anticancerígenas, antimicrobianas y antioxidantes. Compuestos tales como polifenoles, terpenoides, alcaloides, sesquiterpenos, polisacáridos y agentes quelantes de metales han mostrado actividades biológicas benéficas en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas.

Se ha reportado que algunos metabolitos de hongos (extractos de: basidiocarpos, micelios, o compuestos bioactivos aislados) pueden prevenir o reducir los efectos de las enfermedades neurodegenerativas. La epilepsia, aunque no es una enfermedad neurodegenerativa (como Alzheimer, Parkinson y Huntington) también es un trastorno del sistema nervioso central que resulta de la pérdida progresiva de neuronas en varias regiones del cerebro. A pesar de haber en el mercado varios fármacos para el tratamiento de estas enfermedades, es poco el conocimiento que se tiene del modo de acción de los fármacos comerciales.

La presente investigación considera el cultivo sumergido de un hongo recolectado en selva baja caducifolia, para la producción de biomoléculas con potencialidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. También se considera el estudio de mecanismos de acción (estrés por reducción oxidativa, inflamación) de estos metabolitos en células humanas.

HIPÓTESIS

La cepa de *Ganoderma sp.* recolectado en una selva baja caducifolia, produce metabolitos biológicamente activos que presentan actividades biológicas en el sistema nervioso central y en el sistema inmune.

CAPÍTULO I

1 GANODERMA, SU CRECIMIENTO Y SUS METABOLITOS

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos se han utilizado desde la antigüedad para uso comestible y medicinal, se estima que 2000 especies son las que se reportan como comestibles y mientras que cerca de 200 especies silvestres se usan con fines medicinales (Rathore et al., 2017; Zhong & Tang, 2004).

Los hongos de uso medicinal tienen una gran variedad de MBA, entre estos metabolitos tenemos a los polisacáridos, proteínas, terpenos, compuestos fenólicos, ácidos grasos y ácidos insaturados (Ma et al., 2018).

Un género de hongo que tiene una gran popularidad por sus propiedades medicinales es *Ganoderma* que pertenece a la familia de los Basidiomicetos, que es un género con más de 200 especies descritas (López-Peña, Gutiérrez, Hernández-Navarro, Valenzuela, & Esqueda, 2016). Las especies del complejo *Ganoderma* varía de forma, tamaño y van desde colores marrones, rojizo y amarillos y pueden ser laqueados o no laqueados.

Se conoce que el cuerpo fructífero, las esporas y el micelio de *Ganoderma lucidum* contiene más de 400 MBA diferentes, los cuales los polisacáridos y triterpenos son los más estudiados (D.-H. Chen & Chen, 2003; Elisashvili, 2012; Zhong & Tang, 2004).

Ya se han reportado composiciones químicas de extractos de *Ganoderma*, sin embargo, hay diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición química de los productos de *Ganoderma lucidum* en función de la cepa, origen, proceso de extracción y condiciones de cultivo (Solomon P. Wasser, 2005).

En nuestro país se han identificado varias especies de *Ganoderma* como: *G. colossus* (Fr.) C.F. Baker, *G. curtisii* (Berk.) Murrill, *G. fornicatum* (Fr.) Pat., *G. lucidum sensu lato*, *G. mexicanum* Pat., *G. oregonense* Murrill, *G. resinaceum* Boud., *G. sessile*

Murrill, *G. sessiliforme* Murrill, *G. subincrustatum* Murrill, *G. tsugae* Murrill, *G. weberianum* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Steyaert y *G. zonatum* Murrill (López-Peña et al., 2016).

El cultivo de hongos se inició hacia el año 600 D.C. cuando *Auricularia auricula* fue por primera vez cultivada en China en troncos de madera. Le siguieron otros hongos, cultivados de manera similar, como *Flammulina velutipes* (800 D.C.) y *Lentinula edodes* (1000 D.C.) (Miles & Chang, 2004).

El cultivo artificial del cuerpo fructífero de *Ganoderma* en substratos sólidos fue llevado a cabo exitosamente en 1970 por Y. Naoi (Mizuno, 1997). El ciclo de cultivo desde la elaboración del inóculo hasta la obtención del carpóforo varía de 90 a 120 días (Stamets, 1993), dependiendo de los métodos de cultivo utilizados.

Por lo tanto, se han implementado métodos alternativos que permitan la obtención de MBA, así como micelio de una forma estandarizada y en menor tiempo. Una de estas técnicas es el cultivo sumergido que se define como aquel proceso en donde los nutrientes se encuentran en forma líquida y los microorganismos se desarrollan flotando libremente en el medio o formando agregados esféricos conocidos como *pellets*.

En los estudios citados se identificó de manera taxonómica el espécimen recolectado en la zona de la reserva de la Biosfera Sierra de Huautla del estado de Morelos, de igual manera se implementó un cultivo sumergido en escala de matraz Erlenmeyer a un biorreactor tanque agitado, así como la caracterización química del metabolito de interés. Los resultados podrían ser útiles para la producción de especímenes nuevos recolectados en el estado y la búsqueda de producir en las condiciones necesarias el metabolito de interés biológico.

1.1.2 EL REINO FUNGÍ

Los hongos se han utilizado por el hombre como una fuente de alimento y para su uso medicinal. En la tierra se estima que hay 140,000 hongos, sin embargo solo se conoce alrededor del 10%. Entre estos hay 2000 comestibles. De acuerdo con la literatura se reporta que solo alrededor de 35 especies de hongos comestibles son cultivados, mientras que cerca de 200 especies silvestres se usan con fines

medicinales. Los hongos proporcionan una gran fuente de productos útiles con valor nutracéutico como lo son polisacáridos (β -glucanos), fibras dietéticas, terpenos, péptidos, glicoproteínas, alcoholes, elementos minerales, ácidos grasos insaturados, antioxidantes como compuestos fenólicos, tocoferoles y el ácido ascórbico (Rathore et al., 2017; Zhong & Tang, 2004).

Un grupo de hongos con gran importancia es Basidiomicetos, que ha demostrado tener un beneficio a la salud. Estudios recientes han confirmado su eficacia médica e identificado moléculas con actividad biológica. Recientemente se han identificado y aislado metabolitos biológicamente activos a partir de Basidiomycetes, que han probado tener actividad antitumoral, inmunomoduladora, cardiovascular, antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, hepatoprotectora y antidiabética (Zhong & Tang, 2004).

1.1.3 PROPIEDADES MEDICINALES

Los hongos tienen una gran variedad de metabolitos biológicamente activos (MBA), entre estos metabolitos tenemos a los polisacáridos, proteínas, terpenos, compuestos fenólicos, ácidos grasos y ácidos insaturados, y podrían usarse durante los procesos biotecnológicos como fitofármacos (Ma et al., 2018). En la medicina tradicional China el uso de hongos se remota desde la antigüedad y se han utilizado para tratar epilepsia, heridas, enfermedades de la piel, enfermedades coronarias, artritis reumatoide, cólera, fiebres intermitentes, diaforesis, diarrea, disentería, resfríos y enfermedades hepáticas (Pala & Wani, 2011). Entre los efectos medicinales reportados en diferentes especies de hongos se encuentran: actividad antibacteriana, antiviral, incluyendo actividad anti-HIV, efectos antitumorales, actividad antioxidante, efectos cardiovasculares y renales, actividad hipoglucémica, inmunomodulador, antiinflamatorio y anti fúngico (Ma et al., 2018; Solomon P. Wasser, 2011).

Existen diferentes reportes sobre el estudio de las diferentes actividades atribuidas a los hongos medicinales tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* en animales y también en ensayos clínicos en humanos (Roupas, Keogh, Noakes, Margetts, & Taylor, 2012).

Una ventaja importante de los hongos medicinales y sus extractos es que suelen mostrar toxicidades muy bajas cuando se consumen regularmente, siendo bien

tolerados con ninguno o escasos efectos adversos (Roupas et al., 2012). Por sus propiedades medicinales y su baja toxicidad, los hongos son un grupo representativo de los alimentos denominados “funcionales”, es decir, aquellos que presentan un efecto saludable, más allá de su efecto puramente nutricional, mostrando ventajas en la prevención y tratamiento de enfermedades.

1.1.4 GÉNERO *GANODERMA*

El género *Ganoderma* pertenece a la familia Ganodermataceae, Aphylloporales, filo Basidiomycota (Basidiomicete), es uno de los géneros más grandes del orden de los Poliporales, es un género con más de 200 especies descritas (López-Peña et al., 2016). Los hongos de este género desarrollan el cuerpo fructífero sobre los troncos de árboles en descomposición o raíces muertas. En el lejano oriente crece esencialmente en árboles del género *Prunus*, mientras que, en las regiones subtropicales de Europa, Asia, América del Sur y del Norte, crece principalmente en árboles de coníferas como *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Quercus* (Herrera & Ulloa, 1998; Solomon P. Wasser, 2005). Se alimentan de ellos absorbiendo los nutrientes por pequeños tubos conocidos como hifas y desarrollan el cuerpo fructífero sobre los troncos. Algunas especies del género *Ganoderma* también pueden crecer bajo condiciones elevadas de calor y humedad, por lo que se les ha localizado en regiones tropicales y subtropicales.

1.1.5 TAXONOMÍA

La taxonomía del género *Ganoderma* (del latín, *gano*, brillante, *derma*, piel) es muy compleja (Solomon P. Wasser, 2005). La incertidumbre en la identificación taxonómica de las especies de *Ganoderma* se debe mayormente a la gran variabilidad de las características macroscópicas y microscópicas del basidiocarpo. El género *Ganoderma* puede dividirse en dos grupos: laqueado y no-laqueado (Miles & Chang, 2004).

1.1.6 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Las especies del complejo *Ganoderma* varía de forma y este puede ser desde sésil, estipitado e imbricado, poseen cuerpos fructíferos anuales con una cutícula laqueada amarilla a rojiza y una capa superior que es suave. Las áreas de nuevo crecimiento (bordes) son de color blanco, oscureciéndose hacia un amarillo amarronado y luego

rojo amarronado cuando maduro. La forma del cuerpo fructífero es variable, de circular, a semi-circular o arriñonada, 2-20 cm de ancho, 4-8 cm de espesor. La superficie a veces está cubierta por un polvo amarronado de esporas. Posee poros en el lado inferior, de color blanco que se torna marrón al ser tocado. El estípote, cuando está presente, es blanco a amarillo, conforme transcurre el tiempo va oscureciéndose hacia el marrón o negro, excéntrico o unido lateralmente al sombrero (Richter, Wittstein, Kirk, & Stadler, 2015).

1.1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se conoce que el cuerpo fructífero, las esporas y el micelio de *G. lucidum* contiene más de 400 MBA diferentes, los cuales son polisacáridos, triterpenos, polisacáridos ligados a proteínas, germanio, compuestos fenólicos, compuestos alcaloides, lectinas, aminoácidos y proteínas, siendo los polisacáridos y triterpenos los más estudiados (D.-H. Chen & Chen, 2003; Elisashvili, 2012; Zhong & Tang, 2004).

En un reporte realizado por Mizuno se tiene que la composición del extracto de *G. lucidum* (% de peso seco), consiste en glucosa (11.1%), proteína (7.3%) y metales (10.2%) (K, Mg y Ca son los componentes principales con Ge teniendo la 5ta concentración más alta de metal en 489 mg / g). Sin embargo, hay diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición química de los productos de *G. lucidum* en función de la cepa, origen, proceso de extracción y condiciones de cultivo (Solomon P. Wasser, 2005).

En la **tabla 1-1** se pueden observar los triterpenos y polisacáridos aislados de las diferentes especies de *Ganoderma*, así como de la parte de donde han sido aislados (Sawetsuwannakun, 2011).

Tabla 1-1. Compuestos biológicamente activos aislados de diferentes especies de *Ganoderma*

Compuestos bioactivos	Especie	Estado del hongo	Función
Triterpenos	<i>G. lucidum</i>	Cuerpo fructífero	Anticancerígeno Antitumoral Anti- VIH Citotóxico

		Micelio	Antiinflamatorio
		Esporas	Antitumoral
	<i>G. tsuage</i>	Cuerpo fructífero	Anticancerígeno
	<i>G. atrum</i>	Cuerpo fructífero	Antiinflamatorio
			Antimicrobial
			Antioxidante
	<i>G. amboinense</i>	Cuerpo fructífero	Anticancerígeno
			Anticancerígeno
			Antitumoral
		Cuerpo fructífero	Células efectoras inmunológicas
	<i>G. lucidum</i>		Actividad anti herpética
			Actividad antioxidante
Polisacáridos		Filtrado de la fermentación del micelio	Inmunomodulador
		Esporas	Anticancerígeno
	<i>G. tsuage</i>	Micelio	Antitumoral
			Antioxidante
	<i>G. formosanum</i>	Cuerpo fructífero	Actividad de eliminación de radicales
			Antihepatotóxicos

1.1.8 TRITERPENOS

La variedad en el grado de amargura de *G. lucidum* depende del lugar de producción, condiciones de cultivo y el tipo de cepa, entre los factores más destacados. Ese sabor amargo se le ha atribuido a los triterpenos principalmente los obtenidos a partir del cuerpo fructífero y a los cuales se les han atribuido diferentes actividades terapéuticas (**Figura 1-1**). La extracción de los triterpenos es generalmente por medio de metanol, etanol, acetona, cloroformo, éter o una mezcla de estos solventes. Los triterpenos pueden variar de una cepa a otra y de un crecimiento etapa del hongo a otro a través de la escisión de la cadena lateral y el esqueleto oxidación. Los ácidos ganodéricos son los principales triterpenos aislados de *G. lucidum* pueden ser divididos en tres tipos según su ubicación. Los ácidos ganodéricos A, B y H (tipo I) se detectaron solo en el cuerpo fructífero, mientras que los ácidos ganodéricos R, **S** y T (tipo **111**)

fueron los principales triterpenoides del micelio (Débora & Néstor; Jong & Birmingham, 1992; Solomon P. Wasser, 2005).

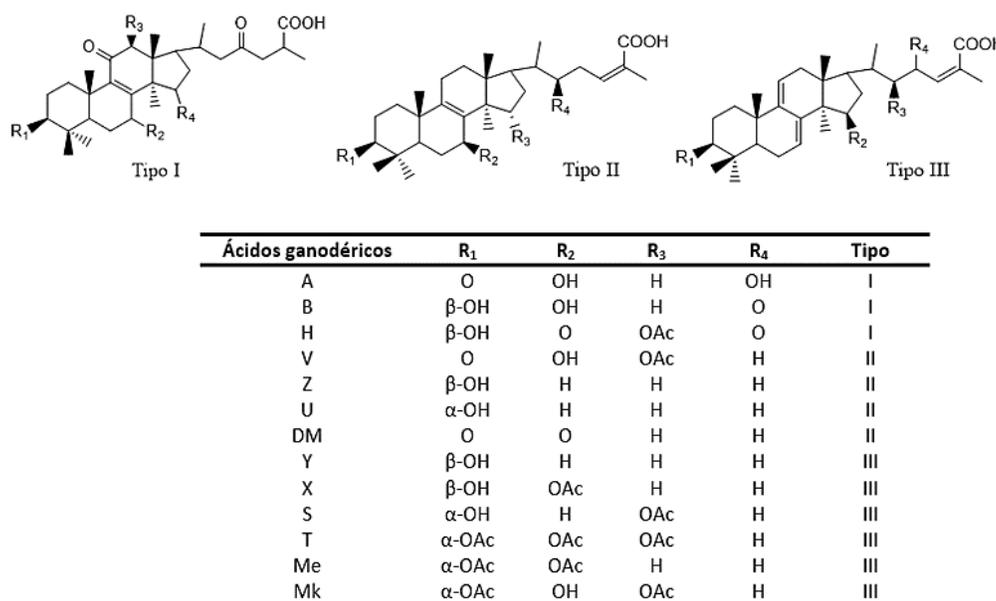


Figura 1-1. Estructuras representativas de los diferentes tipos de ácidos ganodéricos

1.1.9 POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos, son un grupo de macromoléculas biológicas presentes en plantas, animales y hongos. Los polisacáridos de hongos existen como un componente estructural de la pared celular de hongos. Están compuestos por dos tipos principales de polisacáridos: uno es un material rígido fibrilar de quitina (o celulosa); el otro es un β y α glucano (M. Zhang, Cui, Cheung, & Wang, 2007). Los polisacáridos de *G. lucidum* constituyen una de las principales fuentes de sus compuestos farmacológicamente activos y se extraen del cuerpo fructífero, micelios o esporas, o se separan del caldo de cultivo en agitación (Zhong & Tang, 2004). De acuerdo con lo reportado por Wasser la mayoría de los polisacáridos de *G. lucidum* son de alto peso molecular (400,000 a 1 000,000 Da) y comprenden β-d-glucanos. Estos consisten en una cadena principal de β (1-3) grupos glucopiranosilo unidos con diversos grados de ramificación desde la posición C6. Aparte de estos β-d-glucanos solubles en agua existen los heteropolisacáridos que están presentes entre un 10 a 15 % en el hongo seco y glicoproteínas (Solomon P. Wasser, 2005). La mayoría de los polisacáridos son

heteropolímeros compuestos principalmente por glucosa junto con xilosa, manosa, galactosa y fucosa, en diferentes conformaciones (Bishop et al., 2015).

1.1.10 POLISACÁRIDOS β -GLUCANOS

Los polisacáridos del tipo glucanos ocupan un importante papel, ya sean en su forma pura o en mezclas. En diversos estudios, los glucanos (**Figura 1-2**) han sido caracterizados como sustancias con propiedades inmunomoduladoras ya que son capaces de activar mecanismos de inmunidad natural y específica. Los glucanos, junto con otros polisacáridos, forman la matriz básica de la pared celular tanto de levaduras, hongos microscópicos y macroscópicos, formando así un esqueleto protector de la célula. Los β -glucanos ramificados en 1-3 con alto peso molecular que pueden ser tanto insolubles como solubles en agua y que han mostrado actividad sobre el sistema inmunológico son: pleuran de (*Pleurotus ostreatus*), lentinan de (*Lentinus edodes*), grifolan de (*Grifola frondosa*), ganoderan de (*Ganoderma lucidum*) (Débora & Néstor). En la actualidad hay numerosos reportes en los cuales se habla sobre los polisacáridos de *Ganoderma*, así como su aislamiento, y caracterización química. Algunos de ellos se pueden observar en la **tabla 1-2**. Los resultados indicaron que los glucanos biológicamente más predominantes activos pueden ser α - o β - (1 \rightarrow 3) -, (1 \rightarrow 6) - glucanos y otros heterosacáridos conjugados con glucosa, manosa, galactosa, xilosa, fucosa y arabinosa (Nie, Zhang, Li, & Xie, 2013).

Los principales polisacáridos identificado en cuerpos de *G. lucidum* demostraron tener una columna vertebral de β - (1 \rightarrow 3) - residuos de D-glucopiranosilo unidos, con ramificaciones de mono-, di- y cadenas laterales de oligosacáridos que sustituyen al C-6 de los residuos de glucosilo en la cadena principal. Los estudios llevados a cabo sobre estos polisacáridos también sugieren que el grado de sustitución de la cadena troncal y la longitud de las cadenas de ramificación podrían tener importancia para determinar las actividades biológicas de β - (1 \rightarrow 3) glucanos (Benkeblia, 2015).

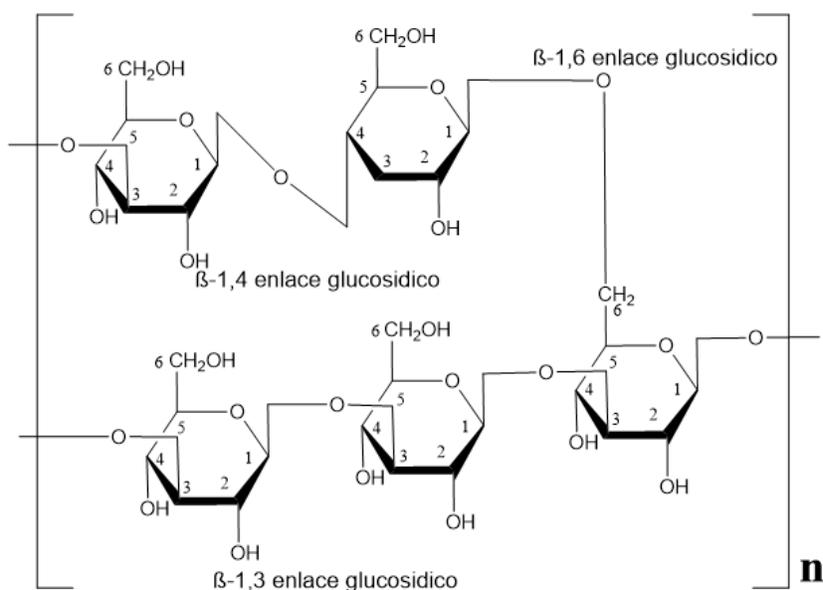


Figura 1-2. Estructura general de un β glucano

Tabla 1-2. Polisacáridos aislados con configuración beta de diferentes especies de *Ganoderma*

Especie	Procedencia	Estructura	Monosacáridos	Referencia
<i>G. lucidum</i>	Cuerpo fructífero	β-(1-3), (1-4), (1-6)- heteroglucano, glucano	Glucosa, arabinosa, fucosa, manosa, galactosa y xilosa	(Bao, Wang, Dong, Fang, & Li, 2002; Han, Nakamura, & Hattori, 2006; W. Liu, Wang, Pang, Yao, & Gao, 2010; Miyazaki & Nishijima, 1981; Pan et al., 2012; Ye, Li, Zhang, & Pan, 2010)
	Micelio	β-glucano	Glucosa	(Sone, Okuda, Wada, Kishida, & Misaki, 1985)
	Cultivo sumergido	β-D-glucano	Glucosa	(Berovič et al., 2003)
	Esporas	Glucano ramificado	Glucosa	(Guo et al., 2009)
<i>G. atrum</i>	Cuerpo fructífero	β-(1-3), (1-4), (1-6)- glucano con uniones α-(1-4) y α-(1-2)	Glucosa, galactosa y manosa	(Y. Chen, Xie, Nie, Li, & Wang, 2008; H. Zhang et al., 2012)
<i>G. applanatum</i>	Cuerpo fructífero	β-(1-3), (1-4) glucano	Glucosa y ácido urónico	(Kozarski et al., 2012; W. Y. Lee, Park, Ahn, Ka, &

				Park, 2007; Sasaki, Arai, Ikekawa, Chihara, & Fukuoka, 1971)
<i>G. tsuage</i>	Cuerpo fructífero	β - (1-3)- glucanos	Glucosa	(G. Wang et al., 1993)
	Cultivo de micelio	β -D-galactosa- α -D- manosa	Galactosa y manosa	(Peng, Zhang, Zeng, & Xu, 2003)
<i>G. recinacium</i>	Cuerpo fructífero	β -(1-3)-glucano	Glucopiranosil	(Amaral et al., 2008)

1.1.11 POLISACÁRIDOS α -GLUCANOS

Los α -glucanos son polisacáridos formados por monómeros de D-glucosa, unidas entre sí por medio de enlaces glucosídicos en configuración alfa (**Figura 1-3**). A pesar de que ya existen reportes sobre polisacáridos de tipo α -glucanos aislados de *G. lucidum* su estudio no es muy amplio. En la siguiente **tabla 1-3** se muestran algunos polisacáridos aislados de *Ganoderma* con configuración alfa.

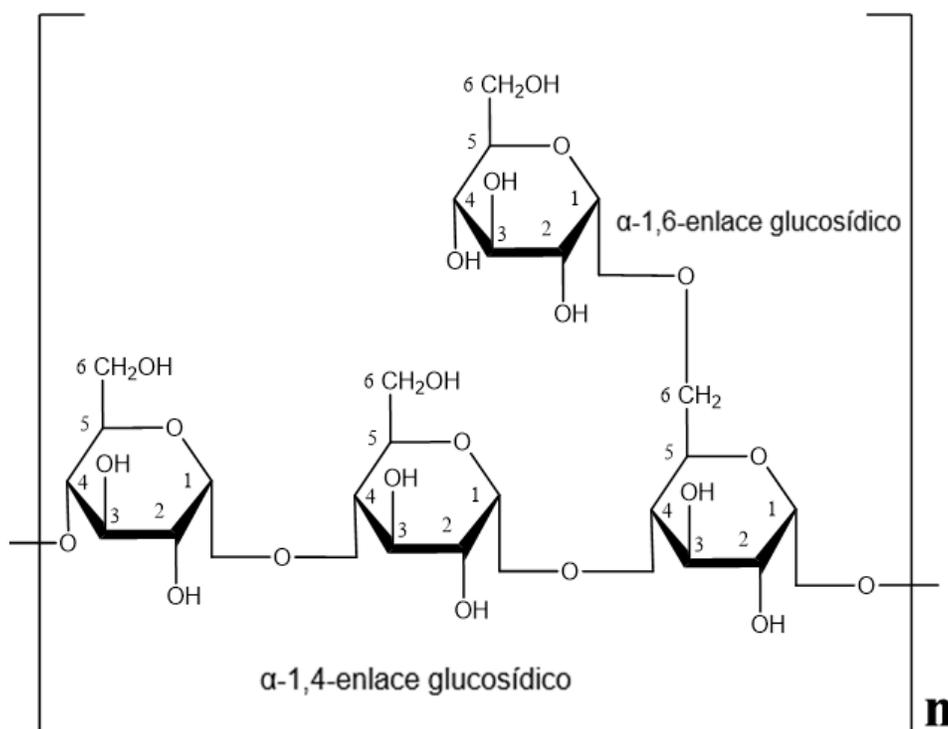


Figura 1-3. Estructura general de los polisacáridos α glucanos

Tabla 1-3. Polisacáridos con configuración alfa aislados de *Ganoderma*

Especie	Procedencia	Estructura	Monosacáridos	Referencia
<i>G. lucidum</i>	Cuerpo fructífero	α -(1-4) Arabinoxiloglucan α -(1-3)-glucano α -(1-4), β -(1-6)- heteroglucano	Glucosa, arabinosa, galactosa, ramnosa, fucosa y xilosa	(Bao et al., 2002; J. Chen, Zhou, Zhang, Nakamura, & Norisuye, 1998; Miyazaki & Nishijima, 1981; Ye et al., 2010; Ye et al., 2008)
	Extracelular (cultivo sumergido)	α -(1-4)-galactosa	Galactosa, manosa, glucosa, arabinosa y ramnosa	(Y.-Q. Li, Fang, & Zhang, 2007)
<i>G. applanatum</i>	Cuerpo fructífero	α - glucanos	Glucosa	(Kozarski et al., 2012)
<i>G. tsuaga</i>	Cuerpo fructífero	β - (1-3)- glucanos	Glucosa	(G. Wang et al., 1993)

1.1.12 GANODERMA EN MÉXICO

En nuestro país *G. lucidum* es conocida por las comunidades indígenas y campesinas como “repisas”, “hongo rojo” y “hongo de palo”. A pesar de que es un hongo ampliamente estudiado por su uso tradicional en la medicina China, en México el consumo y estudios realizados son escasos.

En nuestro país se han registrado varias especies de *Ganoderma* como: *G. colossus* (Fr.) C.F. Baker, *G. curtisii* (Berk.) Murrill, *G. fornicatum* (Fr.) Pat., *G. lucidum sensu lato*, *G. mexicanum* Pat., *G. oregonense* Murrill, *G. resinaceum* Boud., *G. sessile* Murrill, *G. sessiliforme* Murrill, *G. subincrustedatum* Murrill, *G. tsugae* Murrill, *G. weberianum* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Steyaert y *G. zonatum* Murrill (López-Peña et al., 2016).

En el estado de Morelos se encuentra el “Corredor Biológico Chichinautzin” que es un área de protección de flora, fauna y microbiota. Este Corredor incluye a los Parques Nacionales “Lagunas de Zempoala” y “El Tepozteco”, en los cuales se han encontrado

las siguientes especies: *G. applanatum*, *G. curtissi*, *G. labatum* y *G. lucidum*. En la **figura 1-4** se muestran las fotos correspondientes de *G. sessil*, *G. australae*, *G. tsuage*, *G. curtissi*, *G. applanatum* y *G. lucidum*, las cuales fueron recolectadas por el M. Elizur Montiel.

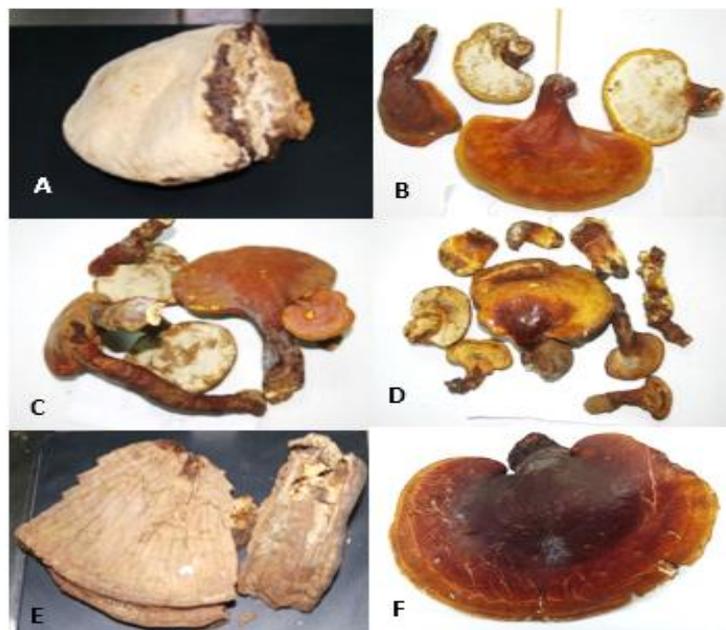


Figura 1-4. A) *G. sessil*, B) *G. australae*, C) *G. tsuage*, D) *G. curtissi*, E) *G. applanatum* y F) *G. lucidum*

1.1.13 CULTIVO DE HONGOS

El cultivo de hongos se inició hacia el año 600 D.C. cuando *Auricularia auricula* fue por primera vez cultivada en China en troncos de madera. Le siguieron otros hongos, cultivados de manera similar, como *Flammulina velutipes* (800 D.C.) y *Lentinula edodes* (1000 D.C.) (Miles & Chang, 2004). En las últimas décadas, como consecuencia del perfeccionamiento de las técnicas de cultivo y el mejoramiento de las cepas, así como también de una mayor aceptación por parte del consumidor, el cultivo de hongos comestibles y medicinales se expandió en varios órdenes de magnitud (Kües & Liu, 2000).

El cultivo artificial y el cultivo de Mannentake fueron intentados inicialmente por T. Henmi et al., En 1937. Su producción en masa fue alcanzada por primera vez por Y. Naoi en 1971 mediante el cultivo en macetas que contenían aserrín. Desde entonces,

el uso de troncos de cama o aserrín se ha convertido en una práctica establecida. Se puede utilizar el método de cama de desove y el cultivo en botella o bolsa. Por lo general, para el cultivo masivo de Reishi (*G. lucidum*) de alta calidad, ya sea al aire libre o en interiores, troncos de cama de roble blanco, roble, castaño japonés, Albaricoque japonés, etc. son usados. La producción de Reishi en Japón en 1988 se estimó en alrededor de 250 toneladas de peso seco. El cultivo de Reishi también ha prosperado en China, Taiwán, Corea y Tailandia. Además, se están realizando intentos para obtener materiales celulares útiles o para producir sustancias eficaces a partir de micelios cultivados (Mizuno et al., 1995).

1.1.14 CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO

El cultivo de hongos en estado sólido es un proceso que ocurre en ausencia o casi ausencia de líquido, empleando un material inerte (sustrato) que puede ser sintético natural, como soporte sólido (Elisashvili, 2012). En cultivos sólidos los sustratos más utilizados son granos, aserrín o madera. Sin embargo, el uso de residuos agrícolas ha ganado una gran atención en los últimos años, no solo por la reutilización del material de desecho, sino también por la mejora en el rendimiento de la producción. La acumulación de fermentación alcohólica, derivada de materias primas como la caña, la remolacha, los granos, el vino, la fruta, etc. presenta problemas considerables de eliminación o tratamiento (Fan-Chiang Yang, Hsieh, & Chen, 2003).

El cultivo artificial del cuerpo fructífero de *Ganoderma* en sustratos sólidos fue llevado a cabo exitosamente en 1970 por Y. Naoi (Mizuno, 1997) y, los procesos se desarrollaron con una gran rapidez. Los métodos artificiales de cultivo involucran típicamente cinco etapas: 1) elaboración del inóculo, 2) siembra, 3) formación del primordio, 4) desarrollo del cuerpo fructífero y 5) cosecha (R.-Y. Chen & Yu, 1999). El ciclo de cultivo desde la elaboración del inóculo hasta la obtención del carpóforo varía de 90 a 120 días, dependiendo de los métodos de cultivo utilizados.

Chienyan Hsieh *et al.* investigó la viabilidad de reutilizar los residuos de soja para la producción de *G. lucidum*, observando que esta puede ser utilizada como un sustrato para el cultivo en estado sólido. En el cultivo en estado sólido de *G. lucidum*, se encontró que la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) era un factor crucial para la tasa de

crecimiento del micelio y también para la formación de un cuerpo fructífero. Los cuerpos fructíferos obtenidos poseían diferentes composiciones, incluido el contenido de polisacárido que puede tener una gran influencia en la función médica de Reishi. Por lo tanto, es importante ajustar la relación C/N para el cultivo de *G. lucidum* dependiendo del propósito de la aplicación (Hsieh & Yang, 2004).

En nuestro país se ha desarrollado una metodología para la producción orgánica del hongo medicinal *G. lucidum*, a partir de una cepa ya identificada molecularmente. Se cultivó en laboratorio y en módulo experimental. En la **figura 1-5** se observa el proceso general para la producción de *Ganoderma*.

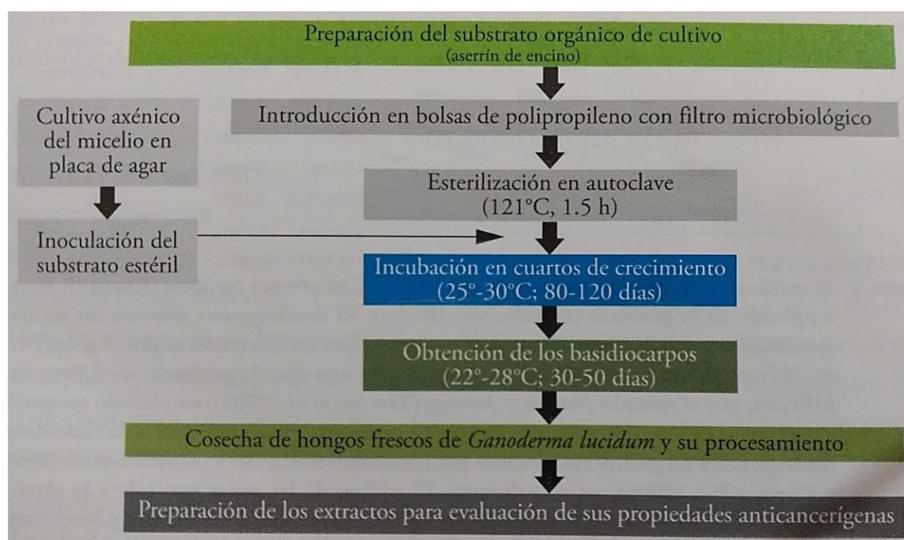


Figura 1-5. Proceso biotecnológico general para la producción orgánica del cuerpo fructífero de *G. lucidum*

Actualmente, los productos derivados de hongos medicinales se obtienen principalmente del cultivo del cuerpo fructífero del hongo, sin embargo, es difícil controlar la calidad del producto final. El cultivo en estado líquido o también llamado cultivo sumergido de la forma micelial de los hongos ha recibido una gran importancia como una alternativa prometedora para la producción eficiente de la biomasa de hongos medicinales y sus metabolitos biológicamente activos (Tang, Zhu, Li, & Li, 2007).

1.1.15 CULTIVO EN ESTADO LÍQUIDO

Los hongos cultivados en estado sólido al igual que los recolectados de forma silvestre requieren del mismo tiempo para su cosecha (seis meses). Por lo tanto el cultivo en medio líquido o también conocido como cultivo sumergido se ha implementado como una alternativa para la producción eficiente de micelio y de MBA (Zhong & Tang, 2004).

El cultivo sumergido se define como aquel proceso en donde los nutrientes se encuentran en forma líquida y los microorganismos se desarrollan flotando libremente en el medio o formando agregados esféricos conocidos como *pellets*. En este tipo de cultivo es necesario tomar en consideración distintos factores que pueden afectar el crecimiento y formación de polisacáridos intra y extracelulares. Esto se debe a que la producción de éstos está determinada por un amplio rango de variables ambientales, así como por el medio de cultivo a utilizar.

La preparación y tamaño del inóculo, la composición del medio, el pH, la temperatura, la agitación y el oxígeno disuelto, juegan un papel importante al momento de la biosíntesis de productos, así como en el crecimiento del hongo. Sin olvidar que los principales nutrientes para el crecimiento de biomasa y producción de polisacáridos son la fuente de carbono y nitrógeno. El cultivo sumergido de hongos permite una producción totalmente estandarizada de biomasa y de otros metabolitos. Esta técnica puede ser implementada tanto en volúmenes pequeños como grandes con el uso de matraces de laboratorio o con un biorreactor (Fan-Chiang, Yang & Liao, 1998).

El desarrollo de cultivo sumergido ha tomado una gran importancia en la producción de compuestos bioactivos, ya que al compararlo con el cultivo sólido tiene la ventaja de disminuir el tiempo de producción. Para *Ganoderma* mientras tanto la producción en estado sólido es de alrededor de 3 meses, en cultivo sumergido 2 semanas. La utilización de esta técnica biotecnológica es una herramienta que proporciona ventajas tales como producción a gran escala de biomasa y metabolitos biológicamente activos, producción de extractos naturales y extractos naturales modificados con propiedades medicinales y funcionales (Tello, Montiel-Arcos, Leon-Rivera, & Martínez-Carrera, 2016).

1.1.16 CULTIVO SUMERGIDO DE *GANODERMA LUCIUDM*

En la Tesis de Maestría se realizó la producción en matraces de biomasa de *G. lucidum* controlando: pH, temperatura y agitación con una cepa procedente de territorio mexicano. En la **figura 1-6** se observa el comportamiento del crecimiento de la biomasa, el cual fue exponencial teniendo una producción máxima de $X_{\max} = 5.5$ g/l y de igual manera la producción de polisacáridos extracelulares con una producción máxima de $P_{\max} = 1.3$ g/l (Núñez-Urquiza, 2017).

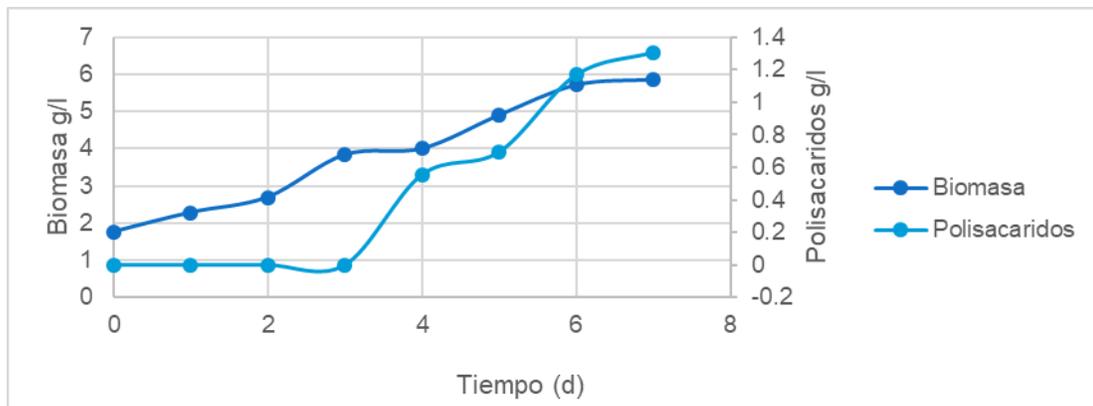


Figura 1-6. Producción de biomasa y polisacárido en cultivo sumergido de *G. lucidum* (Núñez-Urquiza, 2017)

1.2 METODOLOGÍA

1.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

La muestra de *Ganoderma*, fue recolectada en un bosque de la selva baja caducifolia en la sierra de Huautla, Morelos, Estados Unidos Mexicanos. La identificación taxonómica de la cepa de *Ganoderma sp.* fue efectuada por el M. Elizur Montiel del Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM.

1.2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La descripción macroscópica y microscópica del cuerpo fructífero se realiza utilizando los criterios descritos a continuación.

- ✓ Forma y tamaño del basidioma, píleo (ancho x largo), láminas (largo, ancho y grado de separación), en caso de tener poros, se describirá la forma, tamaño y cantidad por área del himenio y estípite (largo x ancho)
- ✓ Descripción de presencia o ausencia de estructuras poco comunes, como: escamas, microvellosidades, hendiduras, verrugas, viscosidad
- ✓ Identificar el color de todas las partes, incluyendo estructuras adicionales del basidioma, incluyendo la parte interna
- ✓ Cambio de coloración, por la manipulación o por un corte (oxidación)
- ✓ Olor del basidioma
- ✓ Presencia o ausencia de látex o líquido de aspecto lechoso al cortarse el basidioma y si cambia su color en presencia de oxígeno
- ✓ Color de las esporas (esporada)

Las características microscópicas del cuerpo fructífero, se observaron a través de un microscopio óptico (ZEISS); a partir de la tinción con azul de algodón en lactofenol, alcohol metílico (CH₃OH), y aceite de inmersión. Los cortes se realizarán, en la parte del himenio, tratando de hacerlos lo más finos posible. Una vez montado el fragmento de cuerpo fructífero, con el azul de algodón en lactofenol, sobre el porta objetos, se colocó en el cubre objetos y con ayuda de un objeto desinfectado con alcohol, ejercer

un poco de presión sobre el cubre objetos, a modo de que el azul de algodón en lactofenol, se distribuya uniformemente sobre el área del porta objetos que se encuentra de forma adyacente con el cubre objetos. Los cortes se observaron en el microscopio con magnificación 100X, agregando una gota de aceite de inmersión.

1.2.3 CULTIVO SUMERGIDO: PREINÓCULO

Para la preparación del preinóculo se utilizó malta (30 g/l) y agua destilada 300 ml. Se colocaron 50 ml del medio a pH = 6 en matraces Erlenmeyer de 125 ml, los cuales se llevaron a esterilización en una autoclave vertical a 15 lb por 20 min. Un día después de esterilizados fueron inoculados tres trozos de 1cm² aproximadamente pequeños provenientes del espécimen de *Ganoderma sp.* sembrada en las cajas Petri, se colocaron en agitación durante 10 días a 230 rpm para dejar crecer el micelio que será ocupado para la cinética de crecimiento de la misma.

1.2.4 MEDIO BFL+C

Se preparó un buffer de fosfatos (BFL) 0.06 M a un pH de 6, se pesó 6.209 g de fosfato de sodio monobásico y 4.02 g de fosfato de sodio bibásico, se disolvió en 750 ml y 250 ml de agua destilada respectivamente. Posteriormente se le midió el pH al fosfato de sodio monobásico y se llevó a un pH final de 6 con el fosfato de sodio bibásico. Una vez preparado BFL se colocaron 20 g de cereal (C), se dejaron enfriar durante unas horas para filtrar los matraces por separado y así eliminar los sólidos. El medio se colocó en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de volumen de trabajo, esterilización a 15 lb por 20 min.

1.2.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MATRAZ

La cinética se llevó acabo utilizando el medio BFL+C modificado, realizándolo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml del medio, los matraces con medio esterilizados se dejaron enfriar durante 1 día a temperatura ambiente, posteriormente fueron inoculados con 1600 µl (1.6%) del micelio crecido en el medio líquido, se dejaron en agitación 230 rpm. Se fue tomando cada 24 hrs un par de matraces al azar para realizar las mediciones correspondientes como cuantificación de biomasa y polisacáridos.

1.2.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN BIORREACTOR

La cinética se llevó a cabo utilizando el medio simplificado, realizándolo en un biorreactor de 7 l equipado con una turbina Rushton (diámetro de impulsor/ diámetro del tanque = 0.4) con un volumen de trabajo de 5 l, el pH no fue controlado. Las fermentaciones se corrieron con un flujo de aire constante (ambiental) de 0.8 vvm, a una velocidad de agitación de 150 rpm, se tomaron muestras cada 24 hrs de 35 ml cada una para las determinaciones de biomasa y polisacáridos, por duplicado. Se inoculó con 100 ml de inóculo.

1.2.7 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

La medición de la biomasa se determinó a través de la técnica de peso seco. Para el cual se pesó un papel filtro previamente, el extracto con biomasa es filtrado a vacío. Con agua destilada se realizó la remoción de los restos de medio en el papel filtro. La biomasa húmeda se secó a una temperatura de 30 °C hasta peso constante. La cuantificación de biomasa se realizó cada 24 horas.

1.2.8 AISLAMIENTO DE LOS POLISACÁRIDOS EXTRACELULARES

Una vez retirada la biomasa del extracto se adicionó alcohol etílico (1:1) y se dejó en refrigeración a 4°C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo se filtró al vacío con un papel filtro previamente pesado. Los polisacáridos húmedos se secaron a una temperatura de 30°C hasta peso constante obteniendo los polisacáridos insolubles.

El sobrenadante restante se dejó secando a temperatura ambiente hasta obtener una resina, siendo estos los polisacáridos solubles en agua, la fracción obtenida se le denominó EPS-F1.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 TAXONOMÍA CLÁSICA

Ganoderma sp.: Píleo de seis centímetros de diámetro con forma flabeliforme (forma de pétalo de flor), color blanquecino a amarillento dirigido a la parte del estípite. Laqueado con borde blanquecino. Himenio blanquecino con dos poros por milímetro, redondos y algunas veces con forma irregular. Estípite de 4.5 cm de largo por un centímetro de ancho, de coloración vino y con presencia de laca (**Figura 1-7**).

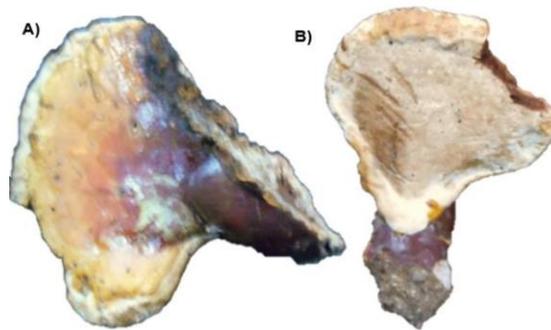


Figura 1-7. A) Parte superior de *Ganoderma sp.*; B) Parte inferior de *Ganoderma sp.*

La medida de las esporas es un dato de la taxonomía clásica de mucha relevancia en la identificación de hongos. Para poder medir las esporas de los basidiomas recolectados, se realizó un corte lo más fino posible en el himenio, se colocó el corte sobre una porta objeto y se añadió una gota de azul de algodón, las muestras se observaron en el microscopio óptico. Las esporas de *Ganoderma sp.* tienen una forma elipsoide con medidas de 8.9 x 5.6 μm de largo por ancho y la coloración de las esporas es ámbar (**Figura 1-8**).

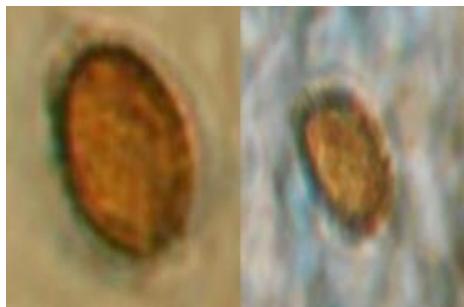


Figura 1-8. Esporas de *Ganoderma sp.*

1.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA CEPA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Para realizar la descripción morfológica de las cepas de *Ganoderma* obtenidas a partir de los aislamientos fúngicos, se evaluaron características como densidad, textura y coloración. Para *Ganoderma sp.* (**Figura 1-9**) la densidad es abundante con un tipo de crecimiento radial-rastrero, textura algodonosa y una coloración blanca-amarilla. La tasa de crecimiento (k_r) de *Ganoderma sp.* fue de $0.71 \pm 0,03$ cm / día.

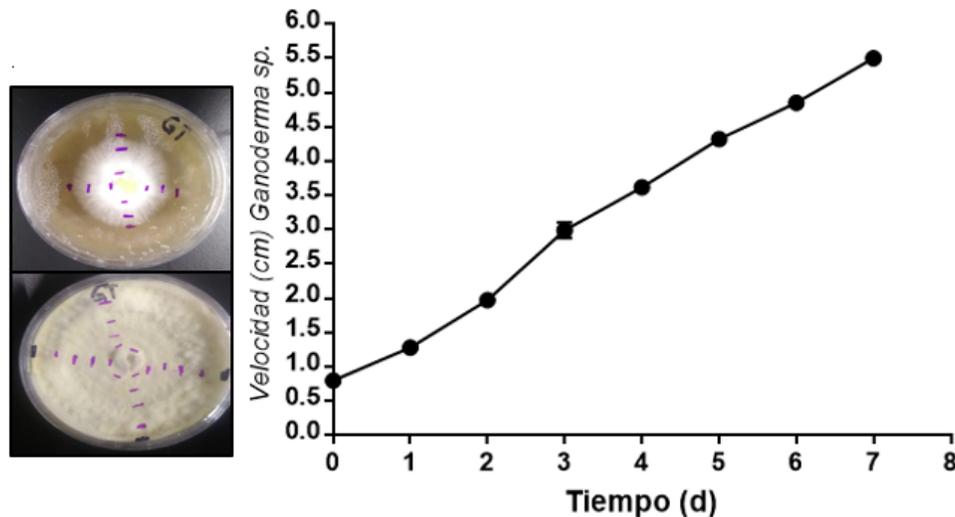


Figura 1-9. Gráfica de la tasa de crecimiento de *Ganoderma sp* en caja Petri. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4 de muestras independientes

1.3.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GANDOERMA SP.

En la **figura 1-10** se muestra la cinética de crecimiento de biomasa en matraz Erlenmeyer y biorreactor tanque agitado con un medio BFL+C modificado. Cada uno de los puntos del gráfico representa el promedio de cuatro cultivos independientes y así como la desviación estándar de las mismas. La biomasa máxima fue de $X_{\max} = 5.77$ g/l para el día once y 3.69 g/l para el día diez respectivamente con una biomasa total de 18 g. La fase de adaptación se observó del día cero al día dos. Posteriormente se observó una fase de crecimiento exponencial en matraz y biorreactor a partir del día tres al once y diez, respectivamente. La velocidad de crecimiento fue de $\mu_{\max} = 0.2334$ y 0.0791 d^{-1} y un tiempo de duplicación de $t_d = 2.6$ y 8.76 d respectivamente.

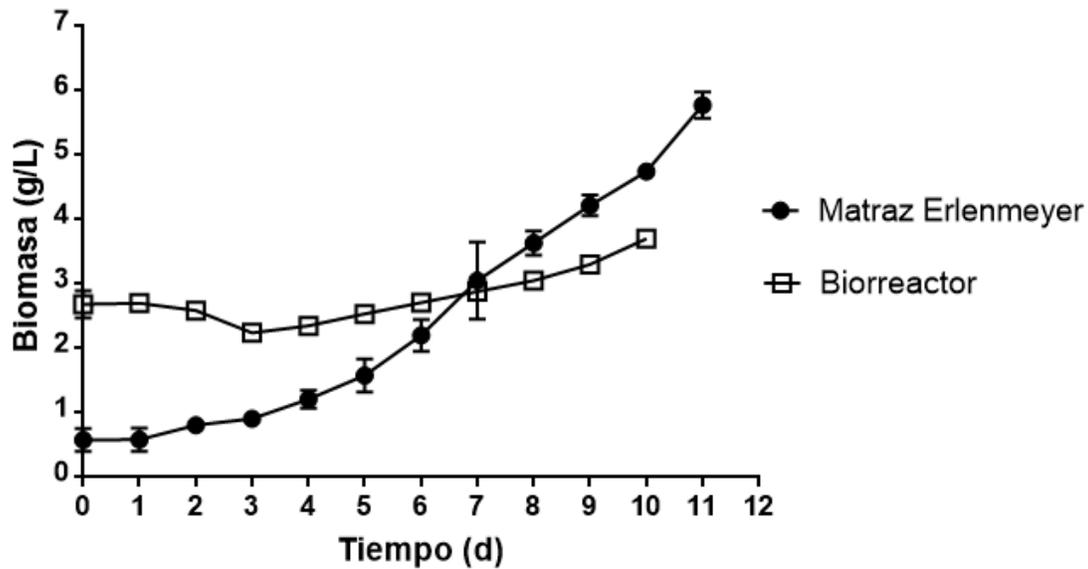


Figura 1-10. Cinética de crecimiento a partir de *Ganoderma sp.* en matraz Erlenmeyer y biorreactor de tanque agitado con medio BFL+C modificado. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ $n = 4$ y $n=3$ de muestras independientes

En la **figura 1-11** se observa la gráfica de la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) en el cual del día cero al tres se observa una disminución considerable de estos EPS, la prueba de yodo lugol dio positiva para estos tres días, mientras que para los días cuatro al once dio negativa, en los días del cuatro al once se observa que nuevamente comienza el aumento de los EPS teniendo así que en el día siete y cinco se tiene la mayor producción con $P_{max} = 0.649$ y 2.41 g/l en matraz Erlenmeyer y biorreactor. La prueba de Yodo-Lugol sirvió para identificar que en los primeros días se tenía la presencia de almidón lo cual se toma como la fuente de carbono del medio utilizado.

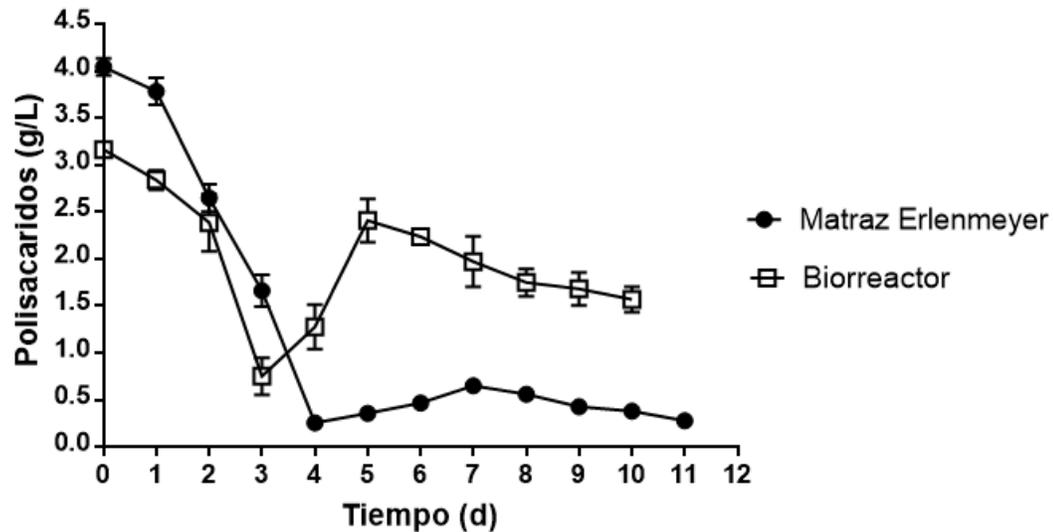


Figura 1-11. Cinética de producción de polisacáridos extracelulares a partir de *Ganoderma sp.* en matraz Erlenmeyer y biorreactor tanque agitado. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ $n = 4$ y $n=3$ de muestras independientes

En la **figura 1-12** se muestra que el pH inicial fue de 6 a 5.9, y conforme fue transcurriendo la cinética fue acidificándose probablemente por algún metabolito producido (ácidos orgánicos). Teniendo así que del día cero al dos el pH se mantiene, pero del día tres al siete este comienza a disminuir, sin embargo, para el día ocho al once el pH tuvo nuevamente un aumento, mientras que para la cinética en biorreactor el pH se mantuvo constante desde el día cuatro hasta el día diez.

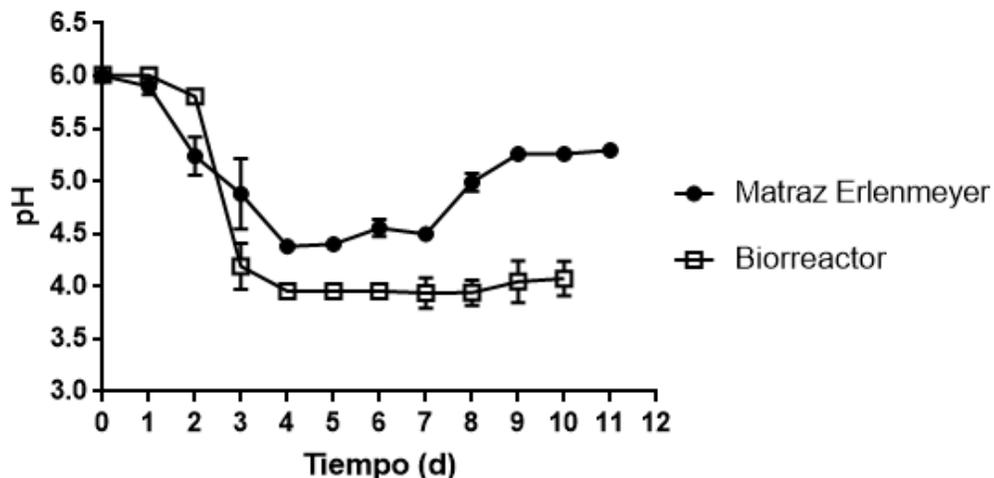


Figura 1-12. 6 Comportamiento del pH en la cinética de *Ganoderma sp.* en matraz Erlenmeyer y biorreactor de tanque agitado con medio BFL+C modificado. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ $n = 4$ y $n=3$ de muestras independientes

1.3.4 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA FRACCIÓN EPS-F1

En el espectro de infrarrojo de la fracción EPS-F1 (**Figura 1-13**) se observó una señal en 3277 cm^{-1} característico de los OH, posteriormente una banda alrededor de 2930 cm^{-1} para la unión C-H, en la región de 900 a 1250 cm^{-1} característico C-O-C y C-O-H.

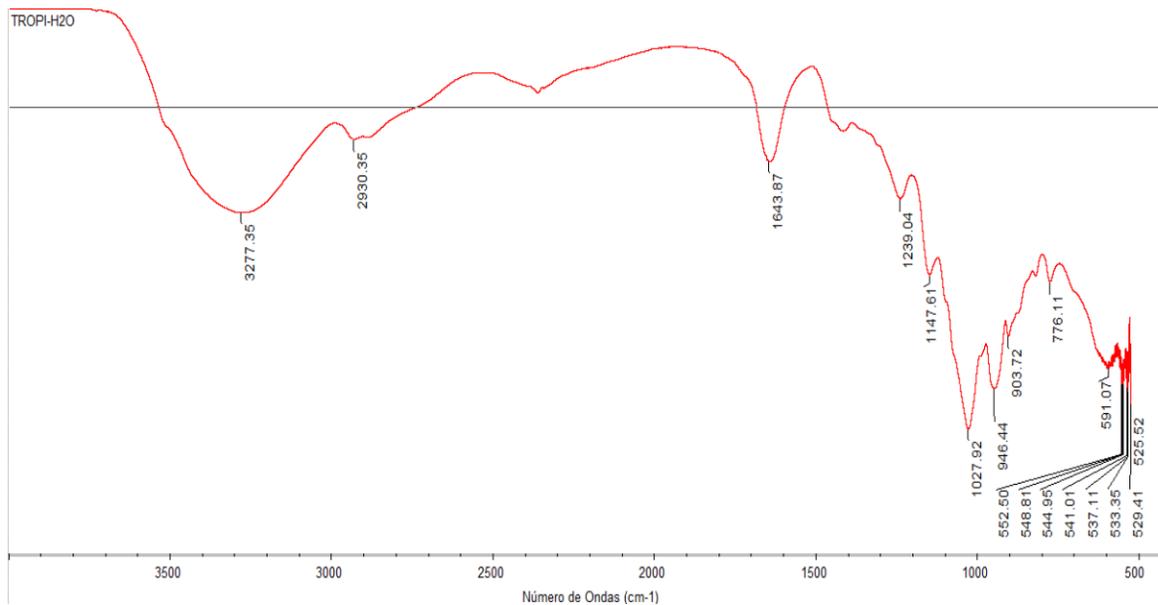


Figura 1-13. Espectro de infrarrojo de los polisacáridos de la fracción EPS-F1

Se realizó una comparación del medio de cultivo (blanco) contra la fracción EPS-F1 por RMN donde se muestran diferencias en la cantidad de señales, así como en la intensidad de las mismas. Se puede observar que en la fracción EPS-F1 aparece una señal en 1.3 ppm (círculo verde) que no está presente en el espectro de la muestra Blanco, indicando que si está existiendo una diferencia entre el medio inicial contra el producto final (**Figura 1-14**).

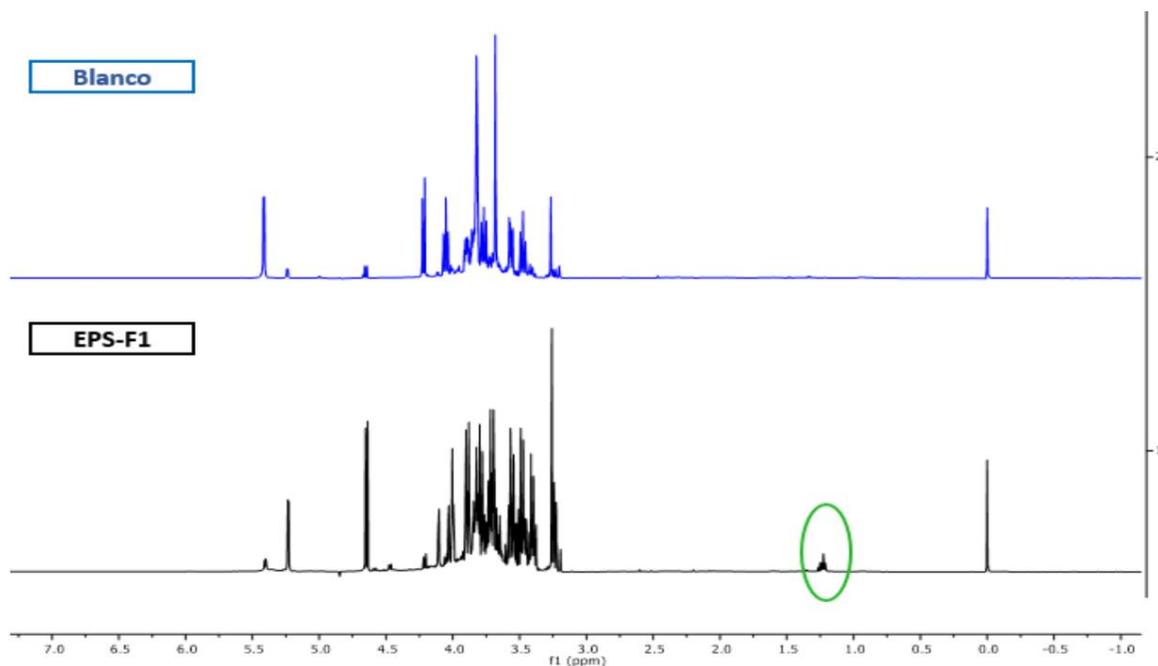


Figura 1-14. Comparación de los espectros Blanco y EPS-F1 de RMN ^1H procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O .

En la región de 3 a 3.9 ppm se observan las señales correspondientes a los metinos de los sacáridos se observa que en la fracción EPS-F1 hay un aumento de señales, en 4.06 ppm en el blanco se observa una señal triple que en el espectro de EPS-F1 no se observa, en 4.2 ppm en el espectro del blanco la intensidad de la señal es mayor, en 4.48 ppm se observa una señal con una intensidad muy débil de una señal doble que en el espectro del blanco no se aprecia, y las señales 4.64, 5.24 y 5.42 ppm en donde la intensidad se invierte en el espectro de EPS-F1 (**Figura 1-15**).

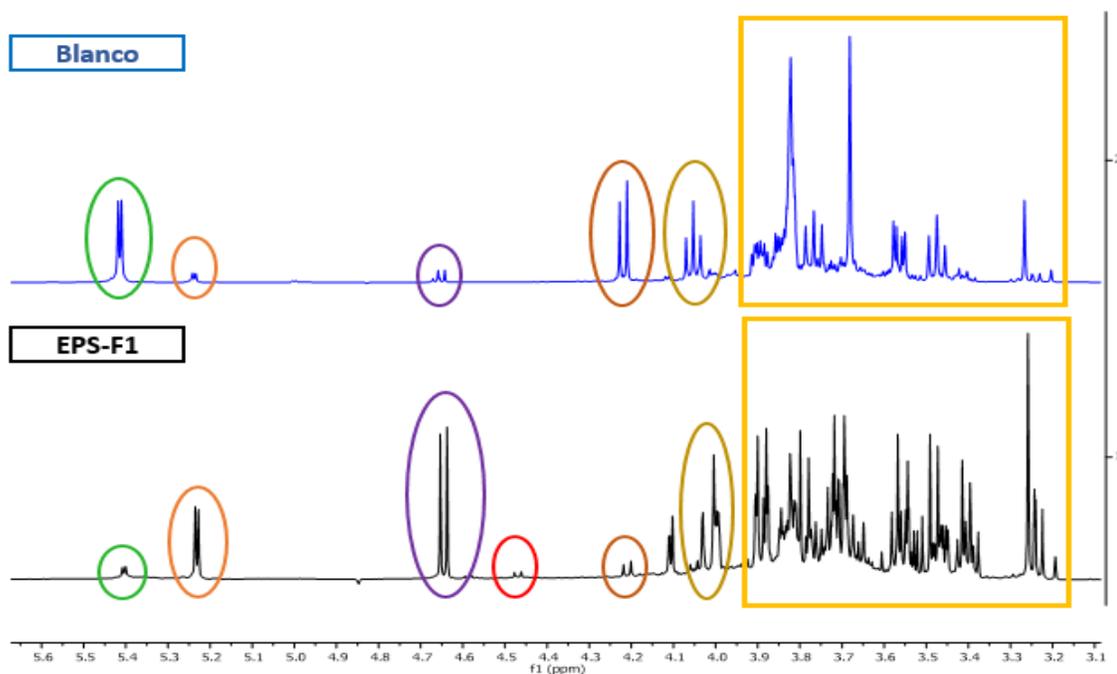


Figura 1-15. Comparación de los espectros Blanco y EPS-F1 de RMN ^1H procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O . En el círculo verde señal 5.42ppm, naranja 5.24ppm, morado 4.64ppm, rojo 4.48ppm, café 4.2ppm, dorado 4.06ppm y recuadro 3 a 3.9 ppm.

En el espectro de DEPT-Q hubo diferencias entre la muestra blanco y EPS-F1; en círculo verde se muestra la región de 103 ppm una señal perteneciente a un carbono cuaternario o un CH_2 . Posteriormente se observaron dos señales de 95 a 90 ppm (círculo morado y rojo) donde las señales están invertidas de intensidad en el espectro EPS-F. En la región de 84 a 83 ppm en el espectro de EPS-F1 se muestra en un círculo azul donde hay tres señales que no aparecen en el espectro del blanco. Finalmente, en la región de 77 a 55 ppm aumento de señales e intensidad en diferentes señales correspondientes a CH_2 en la parte inferior, así como de CH y CH_3 (**Figura 1-16**).

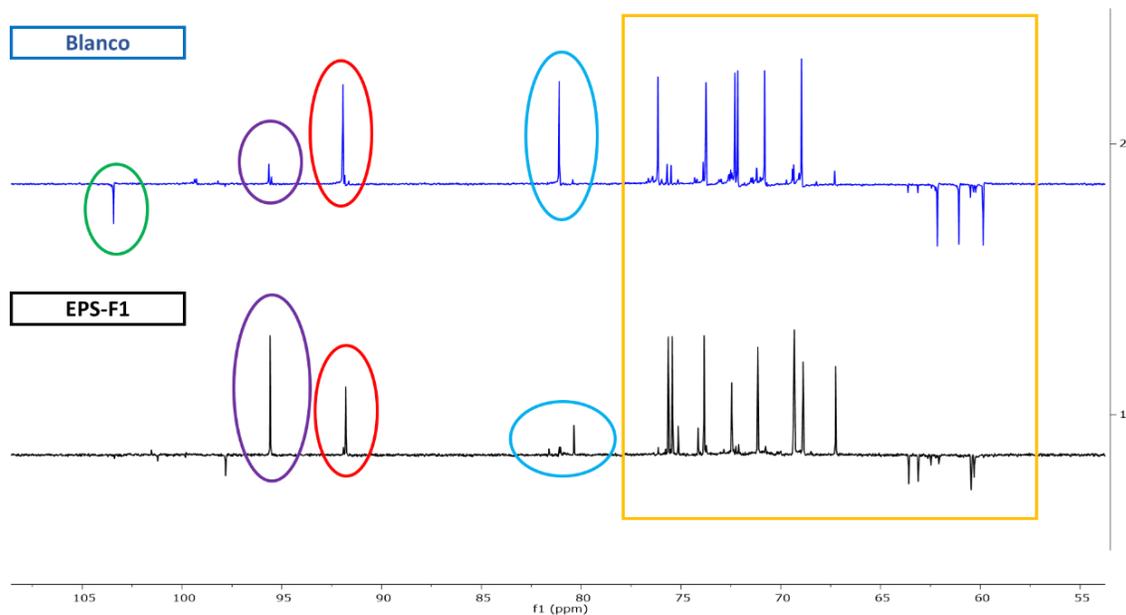


Figura 1-16. Comparación de los espectros Blanco y EPS-F1 de RMN de DEPT-Q procesado a 500 MHz, disuelto en D₂O

El análisis de la fracción EPS-F1 por RMN se muestra que en el experimento de ¹H (D₂O, 500 MHz-sw) (**Figura 3-12**). En la región de 3 a 4.3 ppm se observan las señales correspondientes a los metinos de los sacáridos, posteriormente en la región de 5 a 6.6 ppm, se observan dos señales con multiplicidad doble δ 5.24 (J = 3.8 Hz) y 4.65 (J = 7.9 Hz) ppm que corresponden a los protones anomérico de los sacáridos más abundantes. A partir de estos desplazamientos se asignaron los protones correspondientes a cada estructura.

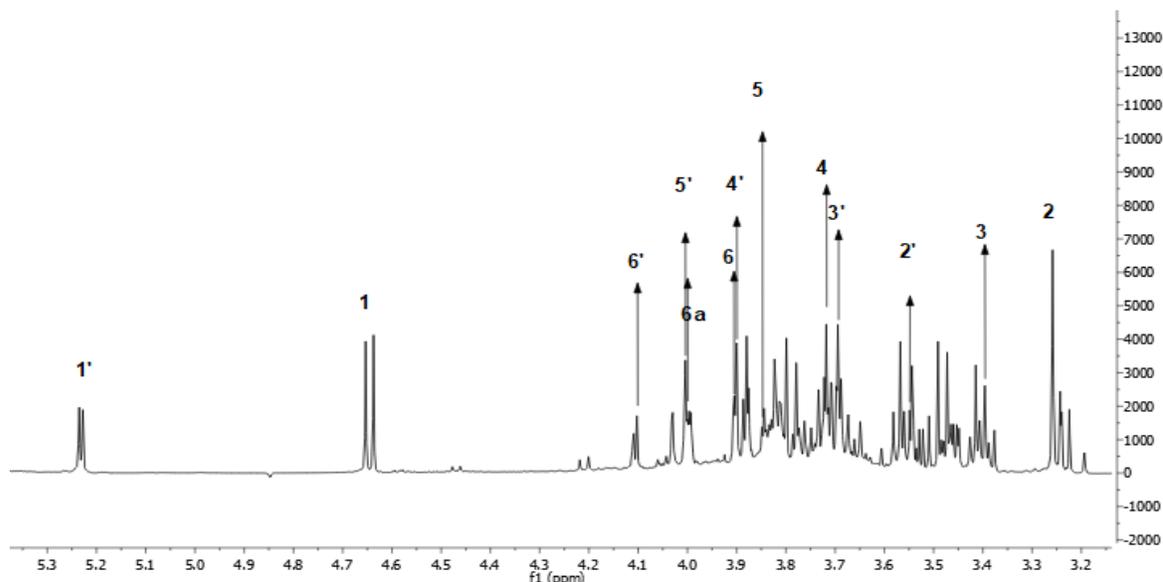


Figura 1-17. Espectro de RMN ^1H procesado a 500 MHz, disuelto en D_2O , de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de *Ganoderma sp.*

El análisis de la fracción EPS-F1 por RMN muestra el experimento de DEPT-Q (D_2O , 500 MHz-sw) (Figura 1-18). Se observan dos señales en la región de 91 a 102 ppm, correspondientes a carbonos anoméricos en 95.62 y 91.82 ppm, también se pueden observar 2 señales con mayor intensidad en esta región correspondientes a CH_2 en 101.2 y 97.8 ppm. En la región de 68 a 82 ppm señales correspondientes a CH y CH_3 y en la región de 60 a 65 ppm CH_2 .

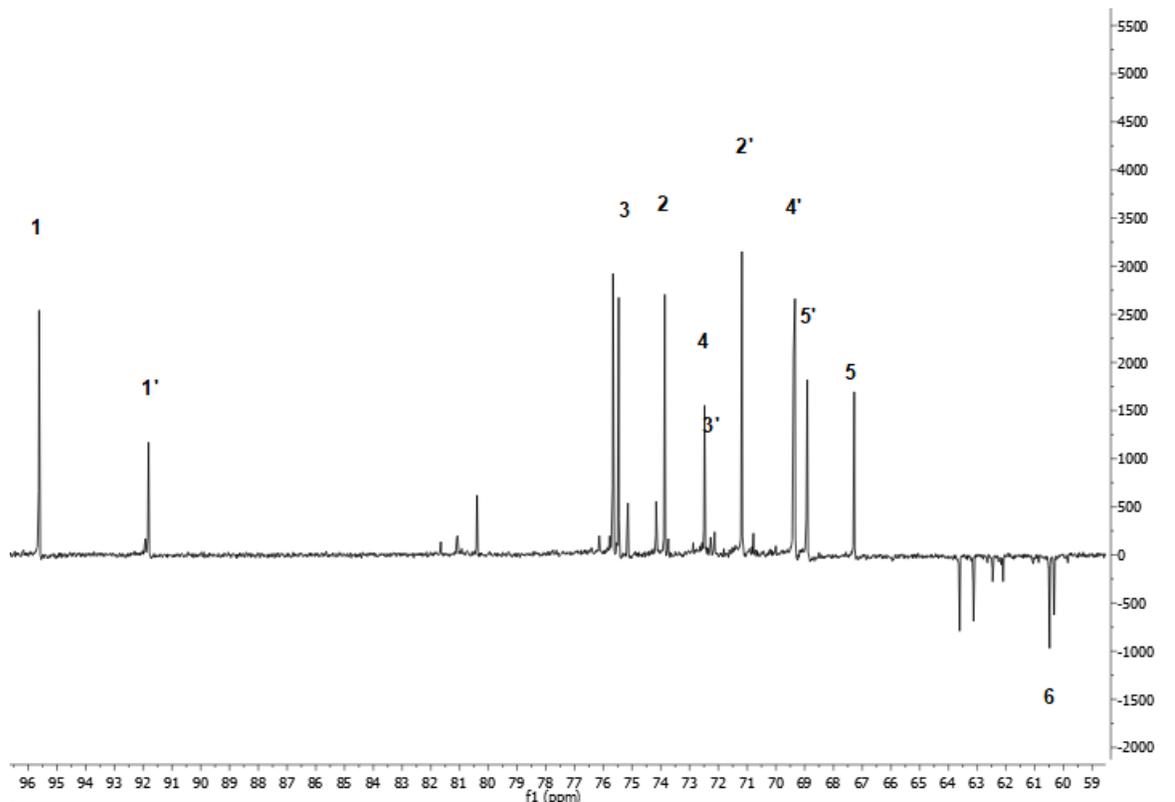


Figura 1-18. Espectro de DEPT-Q procesado a 500 MHz, disuelto en D₂O, de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de *Ganoderma sp.*

En el espectro de COSY se observan más de 15 correlaciones, el tener las señales con desplazamientos químicos similares.

La asignación de desplazamientos químicos de cada ¹H en la unidad de monosacárido se realizó mediante el experimento COSY, utilizando las correlaciones (acoplamientos) mostrados en el espectro (**Figura 1-19**). Para la unidad de Glucosa partiendo del H - 1 (4.65 ppm), se observa la interacción de H-1 con H-2 (3.26 ppm), H-2 con H-3 (3.52 ppm), H-3 con H-4 (3.72 ppm), H-4 con H-5 (3.85) y H-5 con H-6a (3.91 ppm), H-6a con H-6b (4 ppm).

La asignación de desplazamientos químicos de cada ¹H en la unidad de monosacárido se realizó mediante el experimento COSY, utilizando las correlaciones (acoplamientos) mostrados en el espectro (**Figura 1-20**). Para la unidad de Glucosa partiendo del H-1' (5.24 ppm), se observa la interacción de H-1' con H-2' (3.55 ppm), H-2' con H-3' (3.70 ppm), H-3' con H-4' (3.90 ppm), H-4' con H-5' (4.01) y H-5' con H-6a' (4.11 ppm), H-6a' con H-6b' (4.19 ppm).

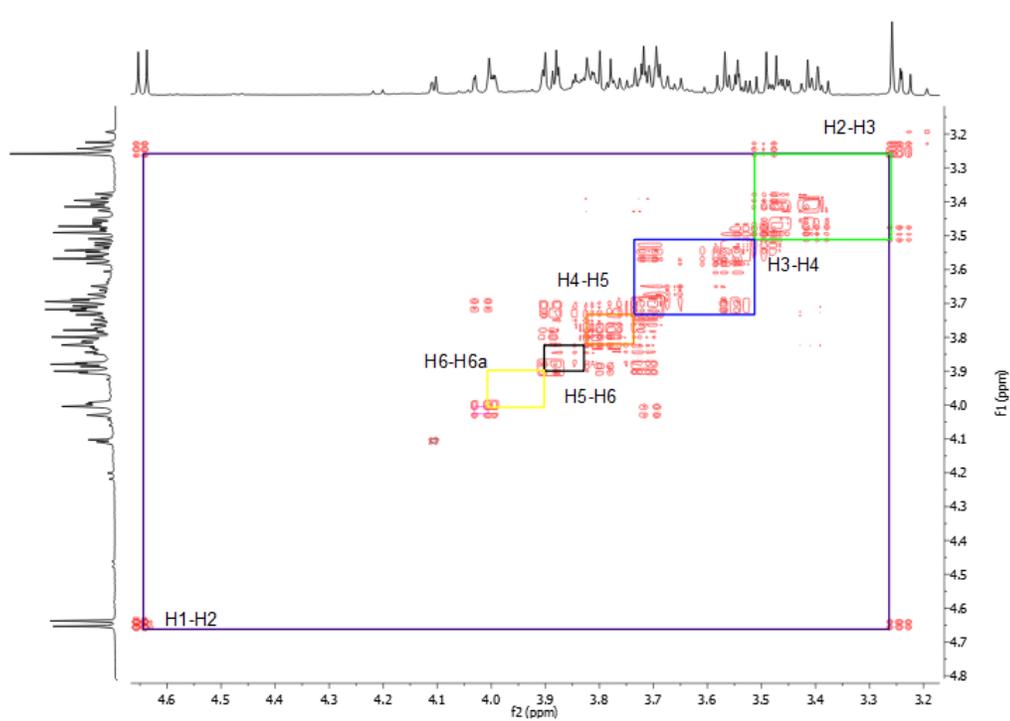


Figura 1-19. Espectro de COSY procesado a 500 MHz, disuelto en D₂O, de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de *Ganoderma sp.*

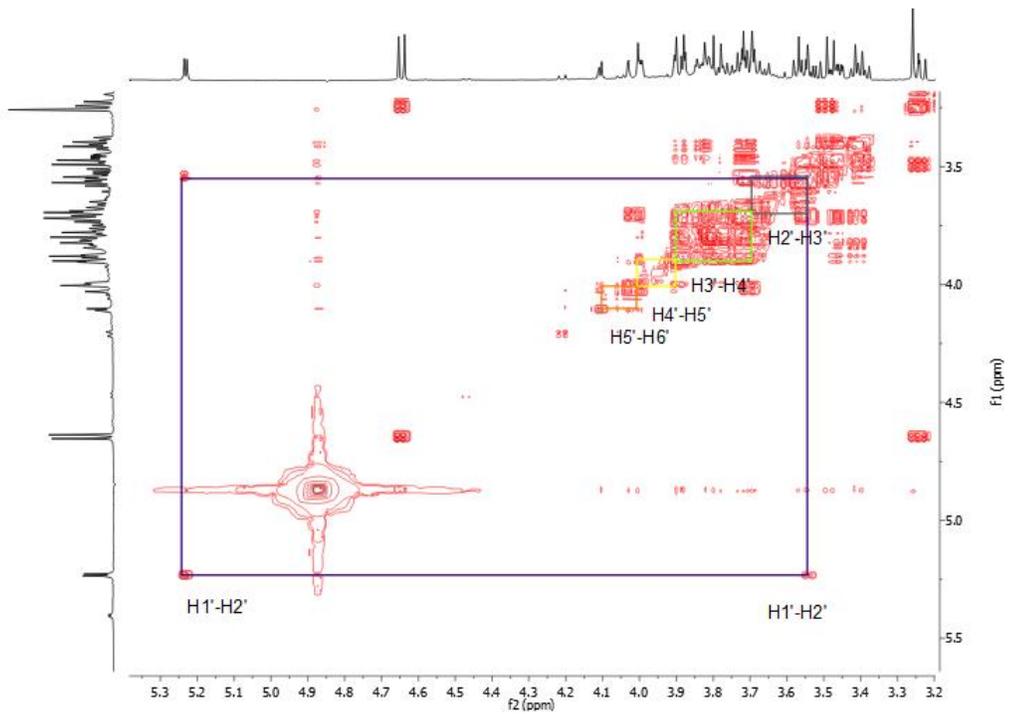


Figura 1-20. Espectro de COSY procesado a 500 MHz, disuelto en D₂O, de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de *Ganoderma sp.*

En la **figura 3-16** se observa la correlación del carbón anomérico (95.62 ppm) con la señal doble en 4.65 ppm (H-1). También se observa una correlación entre el carbón anomérico (91.82ppm) con la señal en 5.21 ppm (H-1').

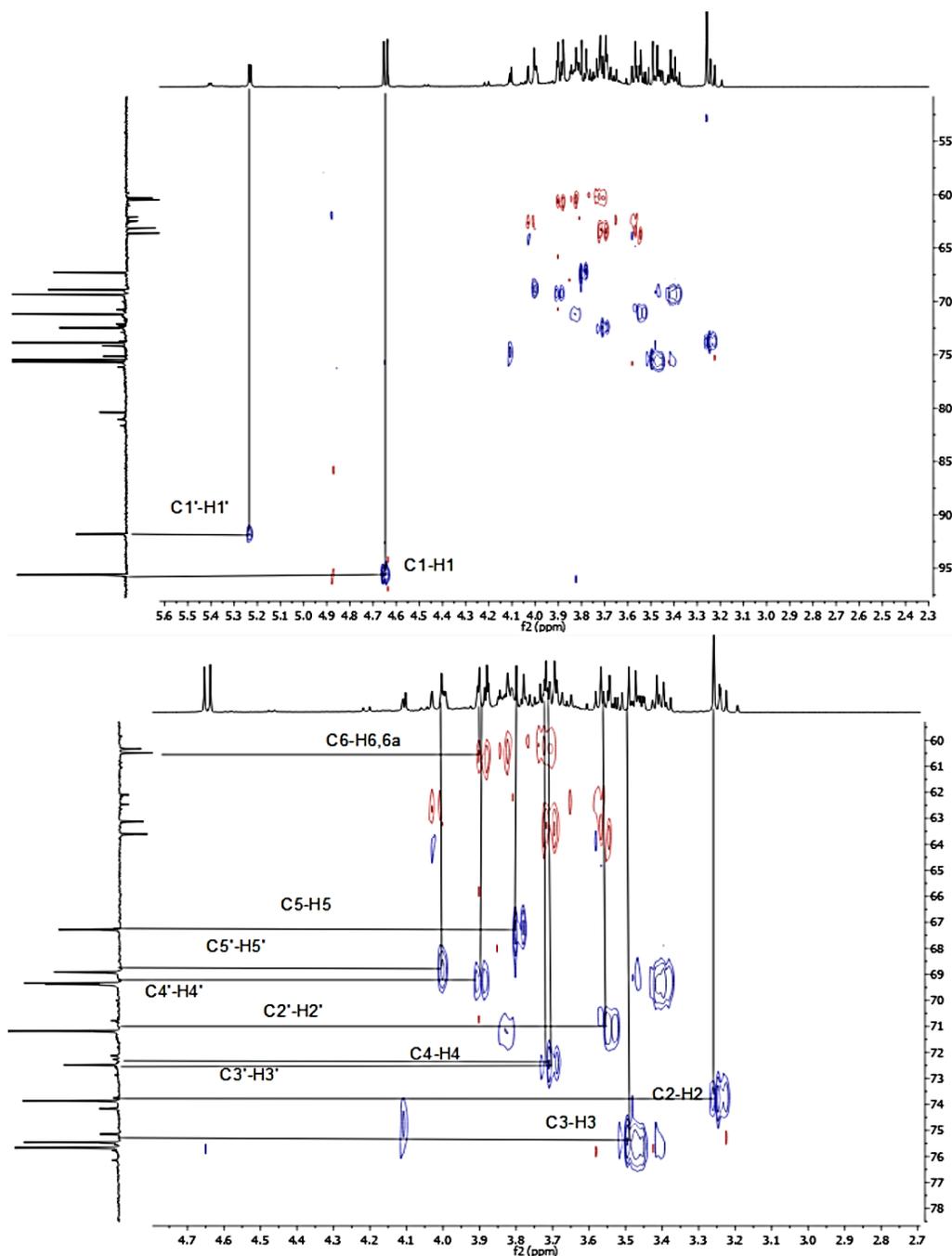


Figura 1-21. Espectro de HSQC procesado a 500 MHz, disuelto en D₂O, de la fracción EPS-F1 aislada del cultivo sumergido de *Ganoderma sp*

1.4 DISCUSIÓN

En el estado de Morelos se ha reportado la presencia de *Ganoderma sp.*, *G. subamboinense*, *G. curtissi*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, *G. sessile*, *G. lobatum*, *G. applanatum* y *G. colossus*, en el bosque mesófilo de montaña, al norte del estado; se tiene registro de *G. lucidum* creciendo en el norte de Ocoatepec, Santa María y en Buena vista del Monte, localidades del municipio de Cuernavaca y en el municipio de Tepoztlán, creciendo sobre madera muerta. También se tiene el reporte de *G. sessiliforme* (Olivares, 2001; Salgado, 2010). Guzmán (Guzmán, 2004) menciona que *G. lucidum* tiene una amplia distribución en los trópicos y en zonas templadas.

Por lo anterior es de gran interés investigar si en la zona sur del estado de Morelos, existe la presencia del género *Ganoderma*, una de las zonas de mayor interés es La Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. Esta reserva se encuentra ubicada en el sur de Morelos en los límites con Puebla y Guerrero, constituye un reservorio de biodiversidad de gran relevancia para la conservación del trópico seco de México. El tipo de vegetación es bosque de encino y selva caducifolia. Presenta clima cálido subhúmedo, con régimen de lluvias de verano y canícula, con temperatura promedio anual de 26 y 27 °C.

Se recolectó un espécimen de *Ganoderma* en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla la cual fue identificada por las características típicas que presenta el género *Ganoderma*, mediante el uso de claves dicotómicas y guías de identificación de hongos del Dr. Gastón Guzmán.

A pesar de que existen varios reportes sobre la identificación taxonómica de diferentes especies alrededor del mundo, no es suficiente con esta descripción, ya que diferentes especies comparten características morfológicas. La familia Ganodermataceae se puede distinguir macroscópicamente de géneros de basidiomicetos morfológicamente similares con basidiomas similares, por su depósito de esporas. Dentro de las Ganodermataceae, la distinción entre los géneros a veces no es simple cuando se comparan características macromorfológicas. En general, las esporas son una característica confiable para separar los diferentes géneros. Por lo

cual conocer el tamaño de las esporas, así como su forma proporciona un dato más para la identificación del espécimen

Una vez obtenidos los datos taxonómicos del hongo colectado y comprados con las cepas ya identificadas en el estado de Morelos así como reportadas en otros estados (Olivares, 2001; Salgado, 2010; Torres-Torres, Ryvarde, & Guzmán-Dávalos, 2015), no se logró identificar la especie a la que pertenecía el espécimen.

En el análisis morfológico del micelio se describen tipo de crecimiento, textura, densidad, apariencia y color. Para determinar las características morfológicas miceliales se utilizó medio de cultivo bran-flakes sólido (BFS+BF) y con condiciones como pH de 6 y un rango de temperatura de 25°C a 37°C el cual ha sido reportado por Salgado, (Salgado, 2010) para el crecimiento de diferentes especies ya recolectadas en el estado. De las características observadas como; densidad, textura y color, se realizó una guía y se utilizó para la descripción del material biológico aislado.

Estas características fueron comparadas con lo reportado para las cepas identificadas en el estado teniendo que, a pesar de que comparten similitudes con las diferentes especies, la identificación en conjunto no pertenece a una especie en específico.

Adicionalmente se llevó a cabo un análisis filogenético realizado por el Dr. Isaac Tello Salgado obteniendo como resultado que el análisis molecular no compaginó con las especies ya reportadas para este género, dando como resultado la de identificación del espécimen recolectado en La Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla como ***Ganoderma sp.***

La fuente de carbono, la temperatura, pH, agitación, fuente de nitrógeno y otras vitaminas son fundamentales para que un medio de cultivo sumergido tenga el éxito esperado. De acuerdo a la realización de un cultivo sumergido de una cepa nativa del estado de Morelos de *G. lucidum* (Núñez-Urquiza, 2017), se decidió reproducir estas condiciones para el espécimen de *Ganoderma sp.* recolectado en La Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla.

Al ser comparados los resultados obtenidos para *G. lucidum* en la tesis de maestría (Núñez-Urquiza, 2017), se observaron diferencias en la producción de biomasa

teniendo una mayor producción para *G. lucidum* comparado con *Ganoderma sp.*, mientras que para *G. lucidum* tiene una producción de 5.5 g/l para el día 5, *Ganoderma sp.* está llegando a esos valores a partir del día 11. A pesar de esta situación el rendimiento entre *Ganoderma sp.* es de $Y_{p/x}=0.2$ (utilizando $X_{max}=3.04$ y $P_{max}=0.64$ correspondientes al día siete) mientras que para *G. lucidum* es de $Y_{p/x}=0.25$ (utilizando $X_{max}=5.5$ y $P_{max}=1.4$ correspondientes al día siete). Al comparar estos resultados se observó que no hay un impacto entre el rendimiento de producto/biomasa, esto indica que un aumento mayor de biomasa no significa un aumento mayor en la producción de polisacáridos, todo esto a nivel de matraz.

Fang y Zhong (Fang & Zhong, 2002b) reportaron para una cepa de *G. lucidum* (CCGMC 5.616) proveniente de China diferentes producciones de biomasa variando la cantidad de glucosa desde 20 a 65 g/l obteniendo desde 10 hasta 16 g/l de biomasa entre los días 6 al 10 y la producción de polisacáridos reportada es de 0.55 hasta 1.19 g/l. Chang, Tsai, & Houg,(Chang, Tsai, & Houg, 2006) reportaron para una cepa de *G. lucidum* proveniente de Taiwan la producción de biomasa variando la fuente de carbono (20 g/l) obteniendo de 0.8 a 1.7 g/l para un tiempo de fermentación de 7 días, mientras que la producción de biomasa ronda entre los 0.077 a 0.17 g/l. Al comprar estos datos ya reportados podemos observar que a pesar de que ambos reportes indican la utilización de 20 g/l de la fuente de carbono, en todos los casos no se aprovecha el total de la fuente de carbono para la generación de biomasa y polisacárido, mientras que en el presente trabajo la fuente de carbono es menor se está obteniendo un mejor rendimiento entre producción de biomasa con respecto a la producción de polisacáridos.

Una vez establecidas las condiciones en matraz Erlenmeyer era importante reproducir estas condiciones en un volumen mayor, por lo cual se realizó el escalamiento a biorreactor de tanque agitado. Al comparar lo obtenido para para *G. lucidum* (Núñez-Urquiza, 2017), se observa que hay diferencias en la producción de biomasa, *G. lucidum*, tiene una producción de 4.07 g/l para el día 9 y, *Ganoderma sp.* tiene una producción de 3.69 g/l en el día 10, a pesar de esto, al igual que en matraz esta disminución de biomasa no impacta en el rendimiento de *Ganoderma sp.* es de

$Y_{p/x}=0.95$ mientras que para *G. lucidum* es de $Y_{p/x}=0.45$, observando que el rendimiento de *Ganoderma sp.* es de casi el doble.

Tang & Zhong (Tang & Zhong, 2002) realizaron un cultivo sumergido en biorreactor utilizando una cepa de *G. lucidum* (CCGMC 5.616) proveniente de China, como fuente de carbono la lactosa (35 g/l), en el cual obtubieron una biomasa de 18.4 g/l y 0.81g/l de polisacáridos al día 10. En otro estudio realizado por Kim *et al* (Kim et al., 2006) reportaron para una cepa de *G. resinaceum* proveniente de Tanta, Egipto, una producción de biomasa de 11.9 g/l mientras que una producción de polisacáridos de 2.2 g/l ambas para el día 14, utilizando 35 g/l de glucosa.

Al comparar estos datos ya reportados podemos observar que a pesar de que ambos reportes indican la utilización de 30 g/l de la fuente de carbono en adelante, las condiciones de cultivo utilizadas en el presente trabajo son competitivas para la producción de polisacáridos de *Ganoderma sp.*

El pH juega un papel importante en la producción de la biomasa y por ende la producción de los polisacáridos de acuerdo con los experimentos realizados por Fang & Zhong (Fang & Zhong, 2002a). Ellos reportaron que el crecimiento de hongos y la producción de metabolitos dependieron del valor inicial del pH, los mejores rendimientos se obtuvieron con pH= 5 a 6 para la biomasa, pH= 3.5 a 4.5 para los polisacáridos, sin embargo, en todos los casos, el pH del cultivo mostró una fuerte disminución a 3.2 durante los primeros 4 días de cultivo, permaneciendo posteriormente relativamente constante durante aproximadamente 1 semana. Cuando la glucosa residual estaba casi agotada, el pH los valores aumentaron rápidamente a 7,0 durante el día 10-14. Elisashvili (Elisashvili, 2012) reportó que para *G. lucidum* se han utilizado diferentes pH=de 3.5 a 7, donde en todas las variantes, disminuye, posteriormente se mantiene constante y cuando la fuente de carbono se agota este comienza a aumentar nuevamente. Este comportamiento fue similar al presentado en el cultivo sumergido de *Ganoderma sp.* en matraz y en biorreactor, lo que lleva a sugerir que la producción máxima de los polisacáridos de igual manera que lo reportado por Fang & Zhong (Fang & Zhong, 2002a) ocurre entre un pH=3.5 A 4.5. De igual manera se observa que a pesar de que este comience a disminuir aparentemente no hay un

impacto significativo en la producción de la biomasa ya que esta continúa creciendo gradualmente.

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos con los ya reportados en la literatura se puede observar que existen diferencias en producción de biomasa y de polisacáridos, dependiendo de la composición del medio de cultivo y dependiendo de la especie de *Ganoderma*. Esto puede deberse a su gran diversidad, tanto en los diferentes climas en los cuales se desarrollan, así como los nutrientes que tiene para su crecimiento.

En la literatura se encuentran reportados una gran cantidad de estudios sobre los polisacáridos de diferentes especies de *Ganoderma* teniendo que alrededor de un 80% se tratan de *G. lucidum* y el otro 20% de otras especies. Estos estudios describen aislamiento y caracterización de diversos metabolitos (polisacáridos, triterpenos, proteínas, glicoproteínas, etc), así como de actividades biológicas *in vivo* e *in vitro* (antivirales, antitumorales, anticancerígenas, neuroprotectoras, entre otras). De igual manera los reportes son principalmente de cepas recolectadas en China y Japón.

Los resultados obtenidos con los cultivos sumergidos en matraz muestran que la mayoría de los polisacáridos obtenidos son insolubles en agua. La presencia de polisacáridos insolubles en agua también ha sido reportado por Habijanac *et al.*, 2015 en el estudio de una cepa eslovena (J. Habijanac, Berovic, Boh, Plankl, & Wraber, 2015). En este trabajo, para poder caracterizar la actividad biológica de los polisacáridos, se buscó poder trabajar con una fracción que fuera soluble en agua, obteniendo la fracción EPS-F1.

De acuerdo con Wang *et al* y Mikkelsen *et al*, los carbohidratos pueden reconocerse por picos en números de onda de 1040 cm^{-1} (enlace CO del grupo alcohol), 2940 cm^{-1} (estiramiento CH) y 3400 cm^{-1} (estiramiento OH). Mikkelsen *et al* señala que los espectros que picos de absorción entre 430 a 950 cm^{-1} son indicativos de enlaces anoméricos β -glucosídico (Mikkelsen *et al.*, 2010; Y. Wang, Ahmed, Feng, Li, & Song, 2008).

En el espectro infrarrojo de la fracción EPS-F1 mostro una banda ancha con absorción máxima 3277 cm^{-1} . En la región de 3650 a 3000 cm^{-1} se observa la banda

de absorción de los grupos OH, debido a que los polisacáridos contienen un número significativo de grupos O-H, exhiben una banda de absorción por encima de 3000 cm^{-1} . Los picos máximos de absorción que ocurren en 2930 cm^{-1} en la región de $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los de grupos C-H. La región $1285\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, que mostró picos con máxima absorción a 1250 cm^{-1} , corresponde a los enlaces C-O-C y C-O de un anillo de D-glucosa. Por tanto, los picos a 1027 cm^{-1} indican la presencia de enlaces glicosídicos y estructuras cíclicas de monosacáridos (Y. Wang et al., 2008).

Según Mikkelsen *et al.* (Mikkelsen et al., 2010), el almidón está asociado a enlaces a 930 cm^{-1} y 1078 cm^{-1} , sin embargo, la realización de la prueba de yodo-lugol a la fracción EPS-F1 no mostro la presencia de almidón .

Al comprar el espectro de infrarrojo con Peng, Zhang, Zeng, & Xu (Peng et al., 2003) de dos polisacáridos aislados de cultivo sumergido de *G. tsugae* proveniente de China, donde por señales en la región de 810 cm^{-1} observan la presencia de manosa, lo cual en la fracción EPS-F1 no aparece, descartándola como uno de los monosacáridos presentes en la molécula.

Zhao, Dong, Chen, & Hu (L. Zhao, Dong, Chen, & Hu, 2010) reportaron dos espectros de infrarrojo similares obtenidos de dos polisacáridos aislados de cuerpo fructífero de *G. lucidum* proveniente de China. Ellos reportan un pico intenso en 3400 cm^{-1} característico de grupos O-H, una banda C-H de 2920 cm^{-1} , el pico de absorción alrededor de 1640 cm^{-1} indicó la característica de C-O, en el rango de $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ fue donde se encontraron las posiciones de las bandas de enlace C-O-C y C-O-H. En el espectro de la fracción EPS-F1 no se observa una banda en la región de 1720 cm^{-1} la cual los autores la reportan como trazas de ácidos urónicos, descartando la presencia del mismo en la fracción EPS-F1.

El análisis de la fracción EPS-F1 por RMN permitió observar en el espectro 2 señales anoméricas con constantes de acoplamiento que rondan desde $J = 3.8$ y 7.9 Hz. Al comparar estas constantes con la literatura se tiene que, la magnitud del acoplamiento es relativamente elevada a 180° (acoplamiento axial-axial mayores a 7 Hz en la forma β) y relativamente pequeñas a 60° (acoplamiento axial-ecuatorial de 2 a 4 Hz en la forma α) (Weininger & Stermitz, 1988), indicando así que la fracción EPS-

F1 consta de protones en posición α y β . En la literatura se han reportado los desplazamientos químicos de la glucosa en configuración α los cuales son $\delta H = 5.12$ y $\delta C = 92$ con una $J = 3.6$ Hz y para la configuración β es $\delta H = 4.5$ y $\delta C = 96$ ppm con $1HJ = 7.8$ Hz (Collins & Ferrier, 1995).

Al comparar estos desplazamientos con los obtenidos en el espectro 1H y DEPT-Q de la fracción EPS-F1 la señal anomérica α es $\delta H = 5.24$ y $\delta C = 91.82$ con una $J = 3.8$ Hz y para la configuración β es $\delta H = 4.65$ y $\delta C = 95.62$ ppm con $1HJ = 7.9$ Hz infiriendo la presencia de glucosa, teniendo que la señal en 4.65 ppm es más intensa que la de 5.24 ppm de esta manera se observa que la glucosa en conformación β y α están en una proporción 80:20 aproximadamente. De acuerdo a Wagner *et al.*, el contenido de glucosa, es consistente con la presencia de glucanos. Lo cual nos permite confirmar que los polisacáridos extracelulares de *Ganoderma sp.* obtenidos en matraz son glucanos.

La asignación del carbón anomérico con su respectivo protón anomérico se realizó por medio del experimento HSQC y la asignación de desplazamientos químicos de cada 1H en la unidad de monosacárido se realizó mediante el experimento COSY, estos dos experimentos permitiendo tener una elucidación más completa de la estructura, sin embargo, no se logró la elucidación estructural completa.

Al comparar los desplazamientos químicos de la estructura de oligosacárido (GLOS) ya reportada por Aguirre-Moreno et al (A. Aguirre-Moreno et al., 2013) a partir del micelio de *G. lucidum.*, se observa que esta fracción también está compuesta por β -Glucosa.

En la literatura existen reportes de polisacáridos aislados de *Ganoderma*, en su mayoría son polisacáridos con estructuras complejas, por lo cual para la elucidación usan como apoyo hidrólisis ácida parcial, análisis de metilación, combinado con espectros FT-IR y espectroscopia de RMN 1D / 2D.

Zhang, Nie, Yin, Wang, & Xie (H. Zhang, Nie, Yin, Wang, & Xie, 2014) reportaron el aislamiento y purificación de un heterogalactano soluble en agua, designado como PSG-2, de los cuerpos fructíferos de *G. atrum*. El PSG-2 estaba compuesto por galactosa, fucosa, glucosa y se detectó un bajo contenido de manosa. En otro reporte

por Li et al (J. Li et al., 2020), se purificaron dos polisacáridos (GLP-1 y GLP-2) a partir de extractos de *G. lucidum*, los polisacáridos estaban compuestos por glucosa y galactosa.

Comparando estos reportes con lo realizado en este trabajo se observa que es necesario la implementación de otras técnicas para una elucidación mayor, sin embargo, aunque se carecen de esos experimentos en el presente trabajo, se sabe que el componente principal es la glucosa, lo que concuerda con muchos de los polisacáridos ya mencionados en la literatura.

1.5 CONCLUSIONES

Se implementó un cultivo sumergido para la cepa de *Ganoderma sp.* recolectada en la Reserva de la Biosfera de Sierra de Huautla en el estado de Morelos. La cepa de *Ganoderma sp.* fue utilizada en un proceso biotecnológico de cultivo controlado por fermentación sumergida para promover la producción de metabolitos de interés del hongo en un biorreactor tanque agitado a escala de laboratorio, teniendo que la fuente de carbono implementada mostró resultados favorecedores a los comparados con las fuentes de carbono convencionales.

La cepa de *Ganoderma sp.* tiene rendimientos similares en producción de biomasa y polisacáridos a los reportados para *G. lucidum*, ambos especímenes pertenecientes al estado de Morelos. El polisacárido obtenido contiene una mayor proporción de β -glucanos, logrando identificar a la glucosa como el monosacárido que conforma su estructura.

CAPÍTULO II

2 ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso está constituido por 100 mil millones de neuronas ampliamente inter-relacionadas, su principal función es la comunicación entre las distintas regiones del organismo dentro de las características principales de las células del cuerpo humano se encuentra la excitabilidad y la conductividad, las cuales se encuentran particularmente desarrolladas en el tejido nervioso. La excitabilidad proporciona la capacidad para reaccionar a estímulos químicos y físicos y la conductividad es la capacidad de transmitir la excitación, como un impulso nervioso. (Arango-Dávila, 2004)

Las principales funciones de las células gliales son: 1) soporte mecánico de las neuronas; 2) producción de la vaina de mielina; 3) captación rápida y, por tanto, inactivación de neurotransmisores químicos liberados por las neuronas; 4) formación de tejido cicatricial después de lesiones cerebrales; 5) eliminación de residuos de tejido local después de la muerte celular; 6) constitución de un sistema de fibras entre la sangre y las neuronas; 7) control de la composición del líquido extracelular (Arango-Dávila, 2004).

Las neuronas, tienen unas características que las diferencian de las demás células del cuerpo: poseen unas prolongaciones de gran longitud y tienen escasa capacidad de regenerarse. Por esta razón, algunas enfermedades neurológicas pueden ser progresivas.

El propósito de este proyecto de tesis es hacer una contribución a la investigación y desarrollo de nuevos productos con actividad neuroprotectora, aislando polisacáridos del cultivo sumergido de *Ganoderma sp.*

2.1.2 SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que tienen como misión controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, coordinando su interrelación y la relación del organismo con el medio externo. El sistema nervioso está organizado para detectar cambios en el medio interno y externo, evaluar esta información y responder a través de cambios en músculos o glándulas (Brodal, 2004).

El sistema nervioso se divide en dos grandes subsistemas: el sistema nervioso central (SNC) compuesto por el encéfalo y la médula espinal; y el sistema nervioso periférico (SNP), dentro del cual se incluyen todos los tejidos nerviosos situados fuera del sistema nervioso central.

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo es la parte del sistema nervioso central contenida en el cráneo y el cuál comprende el cerebro, el cerebelo y el tronco del encéfalo o encefálico. La médula espinal es la parte del sistema nervioso central situado en el interior del canal vertebral y se conecta con el encéfalo. El SNC (encéfalo y médula espinal) recibe, integra y correlaciona distintos tipos de información sensorial. Además, el SNC es también la fuente de nuestros pensamientos, emociones y recuerdos. Tras integrar la información, a través de funciones motoras que viajan por nervios del SNP ejecuta una respuesta adecuada (Brodal, 2004; Poirier, 2004).

El SNP está formado por nervios que conectan el encéfalo y la médula espinal con otras partes del cuerpo. Los nervios que se originan en el encéfalo se denominan nervios craneales, y los que se originan en la médula espinal, nervios raquídeos o espinales. Los ganglios son pequeños acúmulos de tejido nervioso situados en el SNP, los cuales contienen cuerpos neuronales y están asociados a nervios craneales o a nervios espinales. Los nervios son haces de fibras nerviosas periféricas que forman vías de información centrípeta (desde los receptores sensoriales hasta el SNC) y vías centrífugas (desde el SNC a los órganos efectores) (Brodal, 2004; Poirier, 2004).

2.1.3 CÉLULAS DEL SISTEMA NERVIOSO

El tejido nervioso está compuesto de dos tipos de células: las neuronas y la neuroglia o glía.

Las neuronas son las células responsables de las funciones atribuidas al sistema nervioso: pensar, razonar, controlar de la actividad muscular, sentir, entre otros. Son células que conducen los impulsos las que hacen posibles todas las funciones del sistema nervioso. Representan la unidad básica funcional y estructural del sistema nervioso. El sistema nervioso del encéfalo humano contiene alrededor de 50 a 100 mil millones de neuronas. Aunque pueden tener distintas formas y tamaños, todas las neuronas tienen una estructura básica y constan de 3 partes esenciales: cuerpo neuronal, dendritas y axones (**figura 2.1**) (Poirier, 2004; Zuleta, 2007).

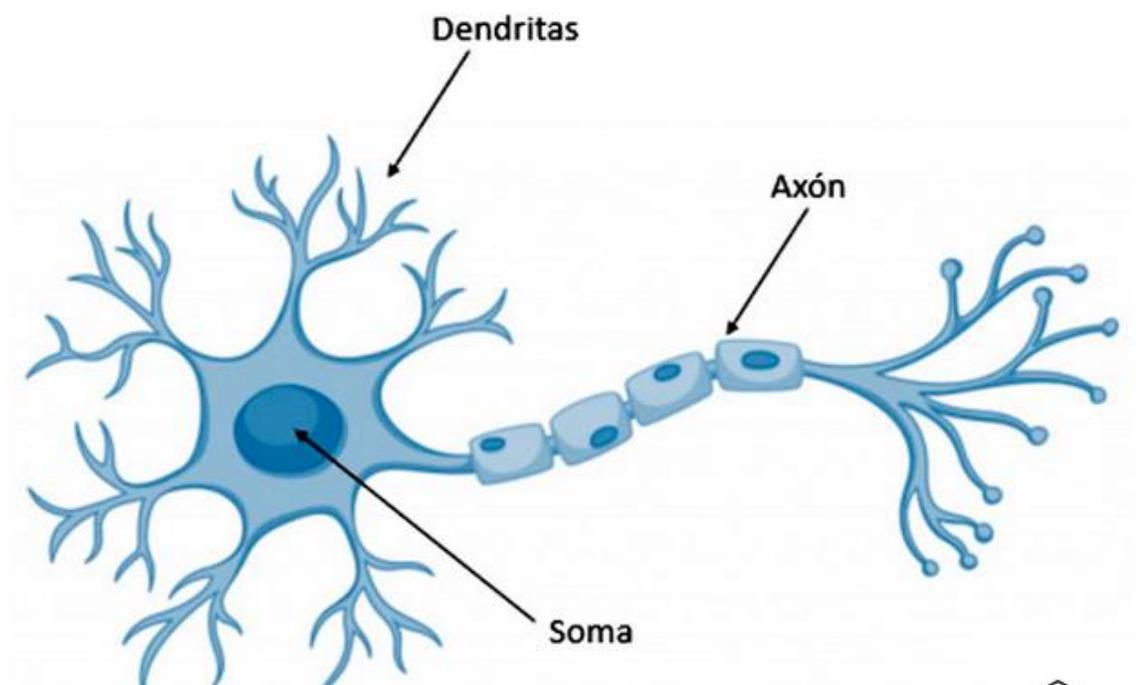


Figura 2-1. Estructura básica de la neurona (<https://www.abcfichas.com/la-neurona-estructura-y-funcion/>)

1. El cuerpo neuronal o soma contiene el núcleo y el citoplasma, con todos sus orgánulos intracelulares, rodeado por la membrana plasmática.

2. Las dendritas son prolongaciones cortas ramificadas, en general múltiples, a través de las cuales la neurona recibe estímulos procedentes de neuronas vecinas con las cuales establece una sinapsis o contacto entre células.

3. El axón es una prolongación, generalmente única y de longitud variable, a través de la cual el impulso nervioso se transmite desde el cuerpo celular a otras células nerviosas o a otros órganos del cuerpo, el axón, se divide en terminaciones especializadas que contactarán con otras neuronas u órganos efectores.

Las neuronas van de la mano con un grupo de células que se denominan neuroglia, en general son más pequeñas que las neuronas y las superan en 5 a 10 veces en número. Las principales células de la neuroglia son: astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias, células de Schwann, y células satélites (**figura 2-2**).

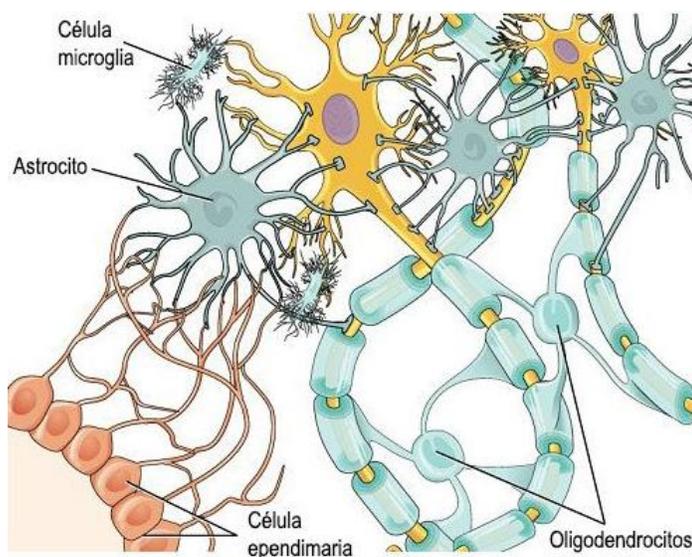


Figura 2-2. Células principales que componen la neuroglia (<https://tiposdecelulas.net/celulas-gliales/>).

Los astrocitos: son pequeñas células de aspecto estrellado que se encuentran en todo el SNC (**figura 2-3**). Desempeñan muchas funciones importantes dentro del SNC, forman un almacén estructural y de soporte para las neuronas y los capilares gracias a sus prolongaciones citoplasmáticas. Asimismo, mantienen la integridad de la barrera

hemoencefálica, una barrera física que impide el paso de determinadas sustancias. Además, tienen una función de apoyo mecánico y metabólico a las neuronas, de síntesis de algunos componentes utilizados por estas y de ayuda a la regulación de la composición iónica del espacio extracelular que rodea a las neuronas (Martínez-Gómez, 2014).

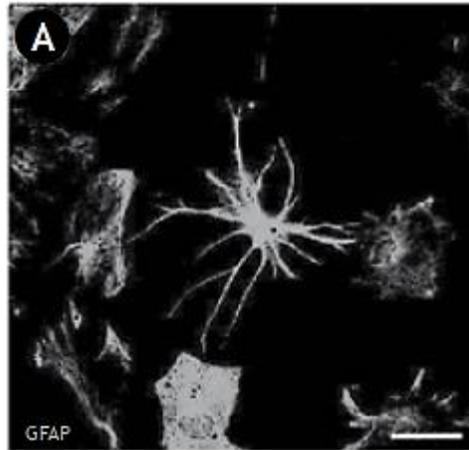


Figura 2-3. Microfotografía de astrocitos in vitro (Martínez-Gómez, 2014)

Los oligodendrocitos son células más pequeñas, con menos procesos celulares, su principal función es la síntesis de mielina y la mielinización de los axones de las neuronas en el SNC. La mielina se dispone formando varias capas alrededor de los axones, de tal forma que los protege y aísla eléctricamente. La mielinización, además, contribuye de forma muy importante a aumentar la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos a través de los axones.

La microglía son células pequeñas con función fagocitaria, importantes en la mediación de la respuesta inmune dentro del SNC.

Las células ependimarias son células ciliadas que tapizan la pared del sistema ventricular y del endotelio. Son células móviles que contribuyen al flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR).

Las células de Schwann son células de la neuroglia situadas en el sistema nervioso periférico, las cuales sintetizan la mielina que recubre los axones a este nivel, cada célula rodea a un solo axón.

La célula satélite son células de soporte de las neuronas de los ganglios del SNP.

2.1.4 NEUROPROTECCIÓN

Aunque el empleo formal del término neuroprotección es relativamente reciente, desde la antigüedad se empleaban técnicas que pudieran considerarse como neuroprotectoras. Un ejemplo de ello es que en la antigua Grecia los médicos utilizaban hipotermia para los traumatismos en la cabeza. Formalmente la primera referencia en que se señala a una sustancia como neuroprotectora en el PUBMED data de 1953, sin embargo ya en la década de los treinta se hacía referencia al empleo de agentes deshidratantes como protectores cerebrales (Estrada Rojo et al., 2012).

Neuroprotección se refiere al empleo de cualquier modalidad terapéutica cuyo objetivo fundamental es prevenir y/u oponerse a la pérdida neuronal patológica que ocurre en enfermedades del SNC tales como enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas. (Testé & Salman, 2007).

Durante los últimos 25 años, los modelos animales de lesiones del sistema nervioso central (SNC) han proporcionado un apoyo experimental sustancial al concepto de que el daño bioquímico retardado contribuye a la pérdida de tejido y a la disfunción conductual crónica. Dichos estudios también han servido de base para el desarrollo de estrategias de tratamiento neuroprotectoras (Faden & Stoica, 2007).

2.1.5 LOS HONGOS Y SU ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA

Los hongos se han utilizado para el tratamiento de diversos trastornos SNC y SNP. En los primeros estudios realizados, los resultados han sugerido que desempeñan un papel importante en la prevención de muchos trastornos neurodegenerativos asociados a la edad, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Por ello, se han dedicado más investigaciones y esfuerzos a la búsqueda de más especies de hongos que tengan actividad neuroprotectora (Badalyan & Rapior, 2020; W. Lee et al., 2019).

Se sabe que los extractos de algunos hongos de cuerpo fructífero o de micelio disminuyen la neurotoxicidad a través de varios mecanismos moleculares neuroprotectores. Entre estos mecanismos se encuentran la actividad antiacetilcolinesterasa, la estimulación del crecimiento de las neuritas (neuritogénica) y la síntesis del factor de crecimiento nervioso (NGF) (neurotrófica), mejorando las

funciones mitocondriales y reduciendo el estrés del retículo endoplásmico (ER), además de los efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Por lo tanto, algunos hongos pueden considerarse agentes terapéuticos útiles en la prevención, gestión y/o tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (W. Lee et al., 2019).

Entre estos hongos se encuentran *Agaricus bisporus*, *Cantharellus cibarius*, *Coprinellus truncorum*, *Coprinus comatus*, *Inonotus obliquus* (hongo Chaga), *Hericium erinaceus*, *G. lucidum*, *G. applanatum*, *Trametes gibbosa*, *Trametes versicolor*, y *Pleurotus ostreatus*. Todos estos han mostrado importantes actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticolinesterásicas y neuroprotectoras. Entre los compuestos bioactivos que han mostrado actividad neuroprotectora se encuentran polisacáridos β -glucanos y los terpenos, estos compuestos han mostrado que pueden estimular la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro y retrasar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (W. Lee et al., 2019; Sabaratnam & Phan, 2018).

2.1.6 GANODERMA COMO NEUROPROTECTOR

El hongo *G. lucidum* (M.A. Curtis:Fr.) P. Karst (Lingzhi) es conocido desde hace mucho tiempo por proporcionar resistencia física, energía y especialmente bienestar y longevidad. Ha sido ampliamente utilizado en los países como China, Japón y otros países asiáticos la cultura China, con diferentes usos terapéuticos, uno de ellos es en el uso de los trastornos del sistema nervioso (Sabaratnam & Phan, 2018; B. Yang & Lin, 2019).

La neuroprotección desempeña un papel vital en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas y el deterioro neuronal y es uno de los efectos más investigados del género *Ganoderma*.

Un estudio realizado por Zhang et al (2011) reportó que los extractos de *G. lucidum* inhibían de forma significativa la producción de factores proinflamatorios y citotóxicos derivados de la microglía, de forma dependiente de la dosis (R. Zhang et al., 2011). Esto reduce en gran medida el estrés de la neurona, lo que reduce el riesgo de muerte celular inducida por el estrés, un importante factor que contribuye a los trastornos neurodegenerativos.

En otro reporte se utilizaron esporas de *G. lucidum* en la salud neuronal, observando que la preadministración en el hipocampo revirtió significativamente los efectos de la inyección intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ), lo que es indicativo de su capacidad para aliviar el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Y. Zhou et al., 2012).

El *G. neo-japonicum* también ha sido investigado por sus beneficios para la salud neuronal, sus compuestos bioactivos estimulan el crecimiento de las neuritas (W. Lee et al., 2019).

Huang et al reportaron que los polisacáridos de *G. lucidum* (GLP, 30 mg/kg, una vez al día durante 90 días) podrían servir como agente terapéutico regenerativo para el tratamiento del deterioro cognitivo asociado a enfermedades neurodegenerativas (Huang et al., 2017).

La epilepsia es una de las enfermedades no transmisibles más comunes del sistema nervioso, caracterizada por una descarga anormal repentina de las neuronas en el cerebro. Ha habido un gran número de investigaciones centradas en los efectos antiepilépticos de las esporas de *G. lucidum* (GLS).

Wang H et al. (2006) encontraron que el GLS (150 mg/kg) puede disminuir significativamente el NR1, la unidad de función de receptor iónico de glutamato (NMDAR), en la corteza y el hipocampo de las ratas y ejercer una acción antiepiléptica por atenuando la excitabilidad del sistema nervioso (H. Wang & Wang, 2006).

Zhao S et al. (2007) encontraron que GLS (300 mg/kg) puede retrasar la aparición de la epilepsia en ratas inducida por el pentilentetrazol (PTZ, 35 mg/kg) a partir del 17º día de administración. Estos mecanismos subyacentes implican la supresión de la expresión de la proteína NF-kappa B y el aumento de la actividad del IGF 1 (S. Zhao et al., 2007)

De manera similar, Zhang JG et al. (2012) encontraron que GLS (300 mg/kg) protege el cerebro de las lesiones causadas por la epilepsia en el modelo de amígdala kindling, lo que estaba relacionado con la reducción de TNF- α e IL-6, las citoquinas asociadas al desarrollo de la epilepsia (J. Zhang, Wang, & Zhang, 2012).

Una fracción de oligosacáridos (GLOS) aislada del micelio del hongo medicinal Lingzhi o Reishi (*G. lucidum*) fue separada por cromatografía de exclusión de tamaño. La estructura química de GLOS consiste en una unidad de repetición de disacáridos [-4-b-1-Galf(1-6)-O-(β -GlcP)-1-]n

Aguirre–Moreno et al (2013) reportaron que una fracción de oligosacáridos (GLOS) aislado de del micelio de *G. lucidum*, tuvo efectos anticonvulsivos y neuroprotectores (10-80 mg/kg) en las convulsiones inducidas por el AK. Se estudiaron las alteraciones del comportamiento y la histopatología de las neuronas del hipocampo mostrando que GLOS inhibió las convulsiones en ratas de las crisis inducidas por AK, redujo el patrón de degeneración en la región CA3 de las ratas, disminuyó la reactividad astrocítica y redujo la expresión de IL-1 β y TNF-a inducida por AK. Estos resultados indican un potencial efecto anticonvulsivo y neuroprotector de GLOS (A. Aguirre-Moreno et al., 2013).

León-Rivera et al (2019) reportaron los efectos de una fracción de polisacáridos (GCPS-2) aislados de *G. curtisii* de una cepa mexicana observando que esta fracción inhibía las convulsiones en ratas, de igual manera redujo el aumento de los niveles de moléculas de señalización apoptótica (Bcl-2) y mediadores proinflamatorios (en el hipocampo y la corteza tratados con AK), teniendo así que esta fracción tiene un potencial uso como neuroprotector contra la epilepsia a través de su capacidad de inhibir eventos neurotóxicos en el hipocampo y la corteza in vivo (Leon-Rivera et al., 2019).

Estos resultados ya reportados por diferentes autores muestran la relevancia del estudio de hongos medicinales, como nuevas fuentes de metabolitos biológicamente activos, para el uso en diferentes enfermedades que causen daños en el sistema nervioso.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CONVULSIVA

Se utilizaron ratas machos Wistar de 200-250 g de peso, bajo condiciones de laboratorio a 25°C, 12 h luz, 12 h oscuridad, con agua y alimento a libre demanda, siguiendo las indicaciones de la NOM-062-ZOO-1999.

Se formaron 4 grupos de 4 ratas cada uno: a los animales del grupo control se les administró vía intraperitoneal (i.p.) solución salina al 0.09 %; al grupo *Ganoderma sp.* se le administró i.p. la fracción de polisacáridos de *Ganoderma sp.* del cultivo sumergido en matraz; al grupo AK se les administró vía i.p. el AK (10 mg/kg); al grupo *Ganoderma sp.* + AK se les administró vía i.p. la fracción de polisacáridos de *Ganoderma sp.* del cultivo sumergido en matraz y 30 min después se les administró AK (i.p.). Se tuvieron en observación durante 24 h después del tratamiento para evaluar el efecto de los compuestos administrados. (A. V.-H. Aguirre-Moreno, Juana; Campos-Peña, Victoria; HerreraRuiz, Maribel; Montiel, Elizur; Tello, Isaac; Río-Portilla, Federico del; Río-Portilla, Federico del; Rivera, Ismael Leon, 2013)

2.2.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Después de 24 horas los animales de los seis grupos anteriores se anestesiaron y perfundieron intracardialmente con 200 µl de heparina NaCl al 0.9 % seguido de formaldehído al 10%. Posteriormente el cerebro se extrae y se fijó en paraformaldehído durante 7 días. Terminado ese tiempo el tejido se etiquetó y deshidrató en alcoholes graduales. Posteriormente se continuó con la inclusión del tejido en parafina. El tejido se cortó en un micrótopo HistoSTAT 820, obteniendo cortes sagitales de 5 µm, cada corte se coloca en un baño de flotación con gelatina y posteriormente se coloca en porta objetos. (A. V.-H. Aguirre-Moreno, Juana; Campos-Peña, Victoria; HerreraRuiz, Maribel; Montiel, Elizur; Tello, Isaac; Río-Portilla, Federico del; Río-Portilla, Federico del; Rivera, Ismael Leon, 2013)

2.2.3 TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

Los portaobjetos con los cortes fueron colocados en unas canastillas (para pasar al tren de tinción) y se continuó con desparafinación e hidratación del tejido, xilol y

posteriormente en alcoholes graduales. Posteriormente se colocaron las laminillas en agua destilada para pasar a hematoxilina (5 min), se realizarán dos o tres lavados hasta quitar el exceso de colorante para pasar a eosina (2 min). Se deshidrataron y se les coloca una gota de resina por muestra en el portaobjetos y se le colocó encima un cubreobjetos a cada muestra. (A. V.-H. Aguirre-Moreno, Juana; Campos-Peña, Victoria; HerreraRuiz, Maribel; Montiel, Elizur; Tello, Isaac; Río-Portilla, Federico del; Río-Portilla, Federico del; Rivera, Ismael Leon, 2013)

La evaluación de actividad convulsiva, análisis histológico y técnica de hematoxilina-esosina fueron realizadas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, en el Laboratorio de Patología Experimental por la Dra. Juana Villeda Hernández.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 EL PRETAMIENTO CON *GANODERMA SP.* INHIBE LAS CONVULSIONES

El modelo de excitotoxicidad por AK fue establecido para inducir convulsiones, cambios conductuales y características neuro-histoquímicas que son similares a las encontradas en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (TLE). Las ratas administradas con AK (10 mg/kg) mostraron las etapas 1 a 5 de severidad de las convulsiones incluyendo la etapa 6 (muerte de un animal). La primera etapa de neurotoxicidad en las ratas se produjo a los 90 min de la administración de AK. Para determinar los efectos del extracto de *Ganoderma sp.* en las convulsiones inducidas por el AK, se administraron por vía intra peritoneal varias dosis del extracto de *Ganoderma sp.* (10, 20, 40, 80 mg/kg) 2 días antes de la inyección de AK. El efecto del extracto de *Ganoderma sp.* en la inhibición de las convulsiones no fue dependiente de la dosis, en todas las dosis las ratas sólo mostraron el comportamiento del estadio 1. Las ratas tratadas sólo con el extracto de *Ganoderma sp.* a varias dosis (10, 20, 40, 80 mg/kg) no desarrollaron ningún estadio de gravedad de las convulsiones.

2.3.2 EFECTO DE *GANODERMA SP.* EN LA EXPRESIÓN DE HSP60 Y HSP70

Para determinar si el extracto de *Ganoderma sp.* protege contra la neurotoxicidad del AK, se determinaron los niveles de expresión de HSP60 o HSP70 en el hipotálamo (CA1 y CA3) de diferentes grupos de ratas experimentales. La expresión de HSP60 se determinó también mediante inmunotinción. En el grupo AK, la inmunoreactividad de HSP60 aumentó en el hipocampo. En los animales pretratados con *Ganoderma sp.* y una administración posterior de AK, la inmunorreactividad de HSP60 disminuyó en comparación con el grupo de AK (**figura 2-4**). Los animales tratados con GCPS-2, mostraron una expresión de HSP60 similar a la del grupo de control. Como se muestra en la (**figura 2-4**), los niveles de expresión de HSP70 fueron significativamente mayores en el grupo AK en comparación con el grupo control en ambos casos. La administración de *Ganoderma sp.* no indujo un aumento en la expresión de HSP70, siendo los niveles similares a los del grupo control. El AK indujo una elevada expresión

de HSP70, mientras que en el grupo con pretratamiento de *Ganoderma sp.*, la inmunoreactividad de HSP70 disminuyó en comparación con el grupo AK como se muestra.

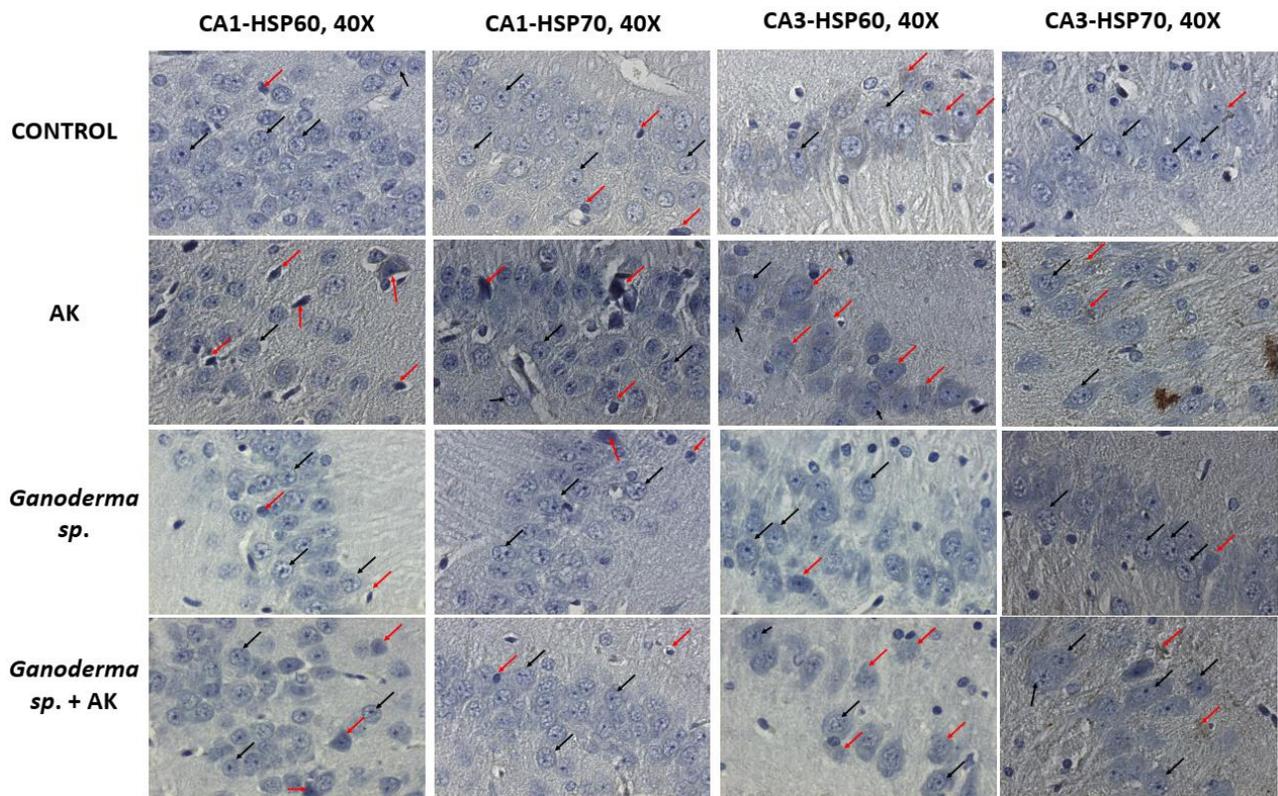


Figura 2-4. Microfotografías de tejido cerebral utilizando el anticuerpo HSP60 y HSP70 en el hipotálamo. El grupo de control y el grupo tratado con *Ganoderma sp.* muestran poca reactividad a la proteína HSP-60 y HSP70. Se observa una mayor presencia de actividad proteica en el grupo tratado con ácido kaínico (flecha roja), que disminuye con el pretratamiento con *Ganoderma sp.* Las flechas negras muestran las células viables.

2.3.3 EFECTO NEUROPROTECTOR DE GANODERMA SP.

Las secciones del hipocampo se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para detectar las neuronas degeneradas. Podemos observar que en el grupo de control no había evidencia de daño neuronal. Se encontró una preservación de las neuronas de las secciones del hipocampo tratadas con *Ganoderma sp.* (10 mg/kg). Las neuronas en las secciones del hipocampo el grupo tratado con AK, aparecieron encogidas con citoplasma eosinofílico, núcleos picnóticos triangulados y edema. En cambio, las ratas pretratadas con *Ganoderma sp.* (10 mg/kg) no mostraron una disminución significativa del número de neuronas tras la inyección de AK (figura 2-5).

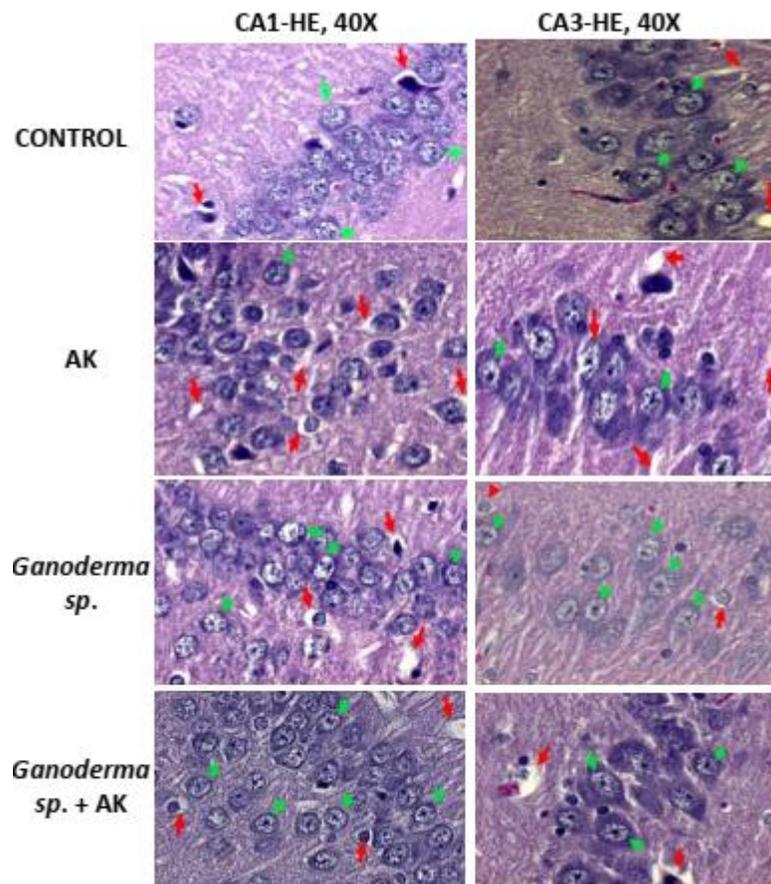


Figura 2-5. Micrografías de tejido de la zona CA1 y CA3 del hipocampo, teñidas con H&E. Las flechas rojas muestran edema intersticial y las flechas verdes neuronas sanas.

También se analizaron secciones del cerebro para determinar el efecto de estos tratamientos sobre la activación de los astrocitos. Las ratas tratadas con *Ganoderma sp.* (10 mg/kg) mostraron una tinción para GFAP muy similar a la del grupo de control, y los astrocitos mostraron pocos cambios morfológicos. En los animales que recibieron la inyección de AK se observaron astrocitos reactivos con una mayor marcación de GFAP y una morfología alterada (engrosamiento de sus procesos). Se observaron numerosos astrocitos positivos para GFAP en las secciones de hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza de las ratas tratadas con AK. Finalmente, los animales pretratados con *Ganoderma sp.* (10 mg/kg) y posteriormente el AK mostraron una tinción débil para GFAP, y pocos astrocitos activados, similar al grupo control (**figura 2-6**). El pretratamiento con *Ganoderma sp.* inhibió la activación de los astrocitos.

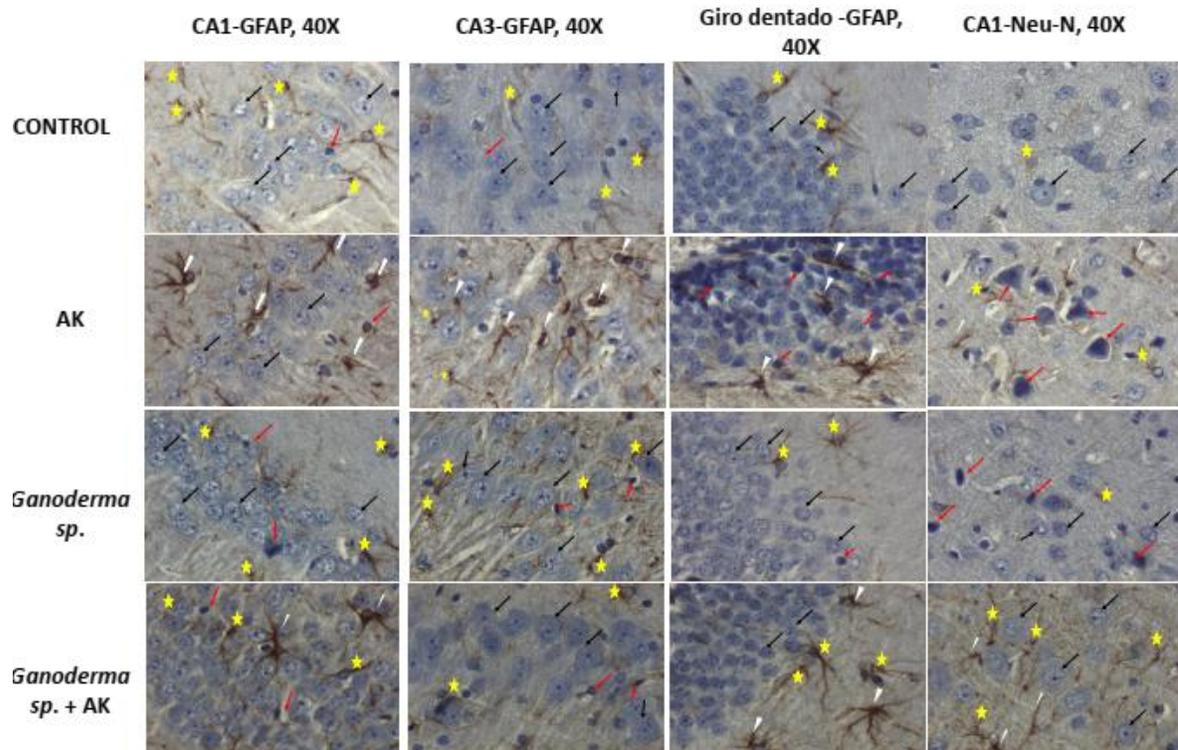


Figura 2-6 Micrografías de tejido del hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza teñidas con GFAP. Células sanas (flecha negra); Células con retracción nucleosomática (flechas rojas); Astrocito reactivo (triángulo blanco); Astrocito funcional (estrella amarilla).

También se analizaron secciones del cerebro para determinar la viabilidad neuronal de estos tratamientos. Las ratas tratadas con *Ganoderma sp.* (10 mg/kg) mostraron una expresión de Neu-N muy similar a la del grupo de control, un gran número de células sanas y pocas neuronas con daño. En los animales que recibieron la inyección de AK se observó poca expresión de Neu-N, escasas células sanas y un gran número de neuronas en diferentes procesos de degeneración en las secciones de hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza de las ratas tratadas con AK. Finalmente, los animales pretratados con *Ganoderma sp.* (10 mg/kg) y posteriormente el AK mostraron un aumento en la expresión de Neu-N, un crecido número de neuronas funcionales, así como un menor número de neuronas con daño (**figura 2-7**). El pretratamiento con *Ganoderma sp.* aumento la expresión de Neu-N, es decir hubo un aumento de la viabilidad neuronal.

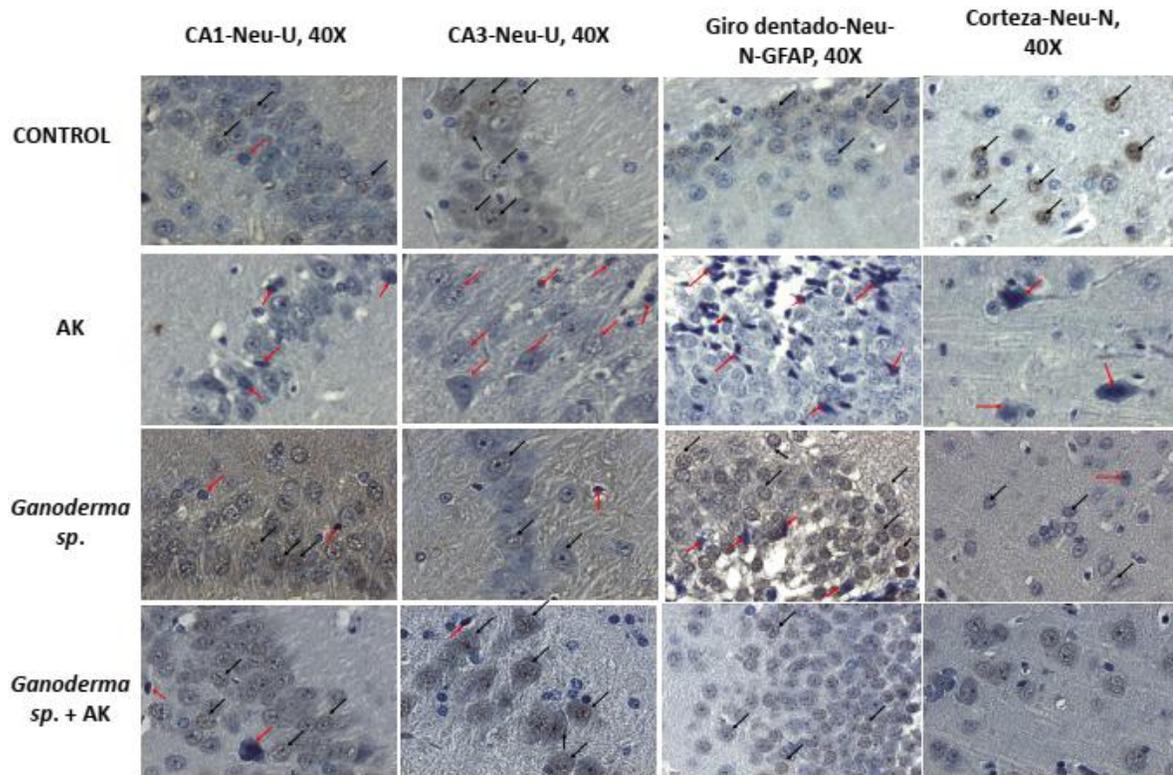


Figura 2-7. Micrografías de tejido del hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza teñidas con Neu-N. Células sanas (flecha negra); Células con retracción nucleosomática (flecha roja).

2.4 DISCUSIÓN

Aunque los nuevos fármacos antiepilépticos han mostrado ventajas como anticonvulsivos, su eficacia es limitada. La búsqueda de nuevas moléculas con actividades neuroprotectoras se ha realizado en plantas y hongos. Hay varios hongos que han sido reportados como una fuente interesante de metabolitos, con la capacidad de promover la curación de enfermedades en el sistema nervioso. Los polisacáridos son un tipo de metabolitos que han demostrado tener propiedades neuroprotectoras contra las lesiones cerebrales inducidas por neurotoxinas y los accidentes cerebrovasculares.

Los polisacáridos (β -glucanos) se consideran entre los principales compuestos bioactivos de los hongos [6,7]. Los polisacáridos aislados de los hongos medicinales mostraron importantes actividades antioxidantes, antiinflamatorias antitumorales y neuroprotectoras que pueden permitir sugerirlas en el tratamiento de las enfermedades del sistema nervioso (Badalyan & Rapior, 2020). Los efectos neuroprotectores beneficiosos de los polisacáridos consideran la capacidad de suprimir la neuroinflamación y la excitotoxicidad con mínimos efectos secundarios.

La epilepsia es una de las enfermedades no transmisibles más comunes del sistema nervioso, caracterizada por una descarga anormal y repentina de las neuronas en el cerebro. La epilepsia es una enfermedad crónica que provoca una disfunción cerebral transitoria. La epilepsia causada por lesiones cerebrales ha sido confirmada por muchos experimentos con animales y observaciones clínicas (B. Yang & Lin, 2019).

Sin embargo, la mayoría de los fármacos utilizados para la epilepsia tienen efectos secundarios sobre la función cerebral, por ejemplo, alteración del estado de ánimo o de la función neurocognitiva, reducción de la excitación neuronal e inhibición de la actividad normal. Recientemente se ha demostrado que *G. lucidum* y su espora (GLS) tienen efectos antiepilépticos en estudios in vivo e in vitro (C. Zhao et al., 2019).

De acuerdo con lo reportado por Aguire-Moreno et al (2013), sobre la actividad de una fracción de polisacáridos denominada GLOS aislada de cultivo de micelio de una cepa de *G. lucidum*, reportaron que la fracción GLOS redujeron el estado epiléptico como pretratamiento inducido por el AK. León-Rivera et al (2019) reportaron la

actividad de polisacáridos de *G. curtissi*, una cepa originaria del estado Morelos que mostro el efecto en la inhibición de las convulsiones, esta no fue dependiente de la dosis, en todas las dosis las ratas sólo mostraron el comportamiento del estadio 1. Estos reportes son similares a los descritos en el presente trabajo, sugiriendo que el extracto de *Ganoderma sp.* es un compuesto natural con potencial actividad anticonvulsiva.

El AK, se ha utilizado ampliamente en la investigación neurobiológica durante los últimos años. El AK administrado a ratas indujo convulsiones y causó la muerte neuronal del hipocampo y la corteza. La muerte neuronal puede deberse a la apoptosis desencadenada por la activación de varios factores de transducción como la caspasa-3, Bcl-2 y Bax,¹⁷ lo que sugiere que el control de la apoptosis puede ser una importante protección del hipocampo y la corteza tras los ataques epilépticos (Lothman & Collins, 1981; B. Yang & Lin, 2019; Z.-Y. Zhou et al., 2010). El pretratamiento con el extracto de *Ganoderma sp.* protegió a las neuronas del hipocampo y la corteza contra la excitotoxicidad inducida por el AK. Estos resultados sugieren que el pretratamiento con *Ganoderma sp.* atenuó la señal apoptótica inducida por el tratamiento con AK, resultando en la protección de la degeneración neuronal. El pretratamiento con *Ganoderma sp.* también protegió a las neuronas del hipocampo y de la corteza contra la neurotoxicidad.

Como respuesta por defecto a las lesiones causadas por la excitotoxicidad y una variedad de enfermedades neurodegenerativas (incluyendo la epilepsia), las células inducen una variedad de proteínas, entre ellas las proteínas de choque térmico que confieren protección celular contra los insultos (M. H. Zhang et al., 2018). En el presente estudio, los niveles de expresión de Hsp60 o Hsp70 aumentaron por la administración de AK. Estos resultados sugieren que la apoptosis neuronal podría estar implicada en la inducción de las convulsiones por AK, este puede iniciar una cascada de apoptosis neuronal que contribuye al daño neuronal sustancial, a las convulsiones y al deterioro del comportamiento, el pretratamiento con *Ganoderma sp.* redujo la expresión de HSP60 o HSP70 tras la administración de AK, mostrando los efectos neuroprotectores de *Ganoderma sp.* Los resultados del presente estudio sugieren que las proteínas

antiapoptóticas pueden servir como potenciales dianas terapéuticas para la protección del cerebro dañado en casos de inducción de convulsiones por AK.

Estudios anteriores han demostrado que la administración de extractos de *G. lucidum* (que contienen polisacáridos y ergosterol) ejercen efectos neuroprotectores mediante la producción de factores proinflamatorios y citotóxicos derivados de la microglía (A. Aguirre-Moreno et al., 2013; Leon-Rivera et al., 2019; C. Zhao et al., 2019). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el micelio de *Ganoderma sp.* produce polisacáridos con actividad neuroprotectora en ratas sometidas a la inducción de convulsiones por AK, y que un mecanismo apoptótico puede estar implicado en el efecto neuroprotector de *Ganoderma sp.*

2.5 CONCLUSIONES

El análisis histopatológico con AK mostró que este agente es capaz de causar gran daño en las neuronas en diferentes grados de degeneración, picnosis, necrosis y edema intersticial intenso en las zonas del hipocampo (CA1, CA3 y Giro dentado) y corteza, así como marcada astrocitosis reactiva y poca expresión de Neu-N. Mientras que las del grupo *Ganoderma sp.*+ AK no mostraron daño significativo a nivel neuronal, ya que revelaron una mayor expresión de Neu-N, es decir, una gran viabilidad celular, escaso edema intersticial y ligera actividad astrocítica. Con estos resultados y al ser comparados con la literatura podemos inferir que los polisacáridos de *Ganoderma sp.* cuentan con una actividad neuroprotectora y anticonvulsivante contra los efectos inducidos por el AK en el hipocampo y la corteza.

CAPÍTULO III

3 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE *GANODERMA*

3.1 ANTECEDENTES

3.1.1 INTRODUCCIÓN

El término inmunidad ha hecho referencia a la protección frente a la enfermedad y, de forma más específica, frente a las enfermedades infecciosas, se compone de células y moléculas (anticuerpos, antígenos, linfocitos B (células B), basófilos, proteínas, citocinas, células dendríticas, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, célula natural killer (NK), monocitos, entre otros) que son responsables de la respuesta inmunitaria. La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa contra los microbios infecciosos (Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, & Pillai, 2015).

El sistema inmune en la edad adulta tiene una madurez mayor comparado con el sistema inmune neonatal, en este caso la inmunidad celular y humoral de los recién nacidos no está completamente desarrollada (la actividad fagocítica, la síntesis de las Igs, la actividad del complemento, la función de los linfocitos y las defensas antioxidantes) por lo cual son más susceptibles a la infección. Estas características del sistema inmune neonatal están relacionadas con las características de «inmunodeficiencia de tipo transitoria» y la necesidad de tolerancia ante el encuentro repentino con muchos antígenos, entre ellos autoantígenos y antígenos no nocivos durante el nacimiento. Por lo tanto, prácticamente todas las líneas del sistema inmune se encuentran reducidas, tanto en cantidad como en calidad. Sin embargo, esto deja al neonato muy susceptible a la infección por patógenos.

Dado a que el sistema inmune es indispensable y que los neonatos se encuentran entre la población más susceptible a enfermedades graves y muertes por infección, se han buscado alternativas que ayuden a promover una mejor función del mismo, en este proceso la medicina tradicional ha jugado un papel importante, teniendo así que los hongos medicinales han tomado relevancia para este uso.

Los hongos medicinales tienen una historia establecida en el uso de la medicina tradicional, más de 50 hongos conocidos albergan compuestos orgánicos inmunoreguladores de peso molecular y estructura muy diversas. Entre los hongos que se encuentran reportados con estos efectos son los siguientes: *Agaricus subrufescens*, *Cordyceps sinensis*, *G. lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*.

Los inmunomoduladores de los hongos exhiben actividades estimulantes tanto para el sistema inmunológico innato como para el adaptativo. Proliferan y activan componentes innatos del sistema inmunológico, como las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos, y estimulan la expresión y secreción de citocinas.

Se sabe que estos polisacáridos poseen diversas actividades fisiológicas como actividad antitumoral, acción inmunomoduladora, actividad antioxidante, actividad antiviral, acciones antiinflamatorias y anticancerígenas (Rathore et al., 2017).

Uno de los polisacáridos de hongos más estudiados son los provenientes del género *Ganoderma*, los cuales han descrito con efectos inmunomoduladores, es decir, que un gran número de componentes del sistema inmune puedan ser activados, estimulados o madurados por los polisacáridos aislados de este género (Lin, 2005).

En este trabajo evaluamos el efecto de la fracción EPSF-1 aislada de un cultivo sumergido de *Ganoderma sp.*, en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y células mononucleares de sangre de cordón (CBMCs), observando el efecto en diferentes citocinas por la técnica de RT-qPCR en tiempo real y observar la reducción de especies reactivas de oxígeno en CBMCs por citometría de flujo. Los resultados podrían ser útiles para la investigación del efecto inmunomodulador que puede tener a nivel del sistema inmune neonatal.

3.1.2 SISTEMA INMUNE

Históricamente, el término inmunidad ha hecho referencia a la protección frente a la enfermedad y, de forma más específica, frente a las enfermedades infecciosas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el **sistema inmunitario**, y a su respuesta conjunta y coordinada a la introducción de sustancias extrañas se le llama **respuesta inmunitaria** (Abul K. Abbas et al., 2015).

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa contra los microbios infecciosos. Sin embargo, incluso sustancias extrañas no infecciosas pueden desencadenar respuestas inmunitarias. Además, en algunas situaciones, los mecanismos que normalmente protegen a los individuos de la infección y eliminan las sustancias extrañas, también son capaces de provocar lesiones tisulares y enfermedad. Por tanto, una definición más concreta de la respuesta inmunitaria es la de una reacción a los componentes de los microbios, así como a macromoléculas, como proteínas, polisacáridos y pequeñas sustancias químicas, que son reconocidos como extraños, independientemente de la consecuencia fisiológica o patológica de tal reacción (Abul K. Abbas et al., 2015).

3.1.3 INMUNIDAD INNATA

El primer modo mediante el cual el sistema inmunitario se protege frente a los microorganismos patógenos es negándoles la entrada a través de distintas barreras físicas. Éstas son la piel, las mucosas que recubren las vías respiratoria, digestiva y reproductora. Una vez que un microorganismo ha atravesado las defensas físicas del cuerpo se enfrenta al sistema inmunitario. Este sistema se divide en dos ramas y ambas comienzan a trabajar inmediatamente, una responde con rapidez contra familias de microorganismos y la otra se produce lentamente y es específica frente a los organismos infecciosos específicos. Éstos son los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, respectivamente, ambos sistemas dependen uno del otro (Arif, Mufti, Griffin, & Kitchen, 2012).

El sistema inmune innato se caracteriza por presentar una respuesta relativamente rápida, así como reconocer patrones moleculares de los diferentes patógenos (Teixeira, Almeida, & Gazzinelli, 2002). Sus barreras de protección son físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales. Además, hay células inmunes innatas, entre estas células tenemos a células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos citolíticos NK, también se tienen proteínas llamadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata. Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de

microbios relacionados y pueden no distinguir diferencias ligeras entre microbios (**figura 3-1**) (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015).

La principal función de estas células es el reconocimiento y destrucción de agentes extraños al organismo y potencialmente patógenos, a través de mecanismos efectores directos y/o generación de señales de alarma (como quimiocinas y citocinas) que coadyuvan con la generación de una respuesta inmune adaptativa (Teixeira et al., 2002).

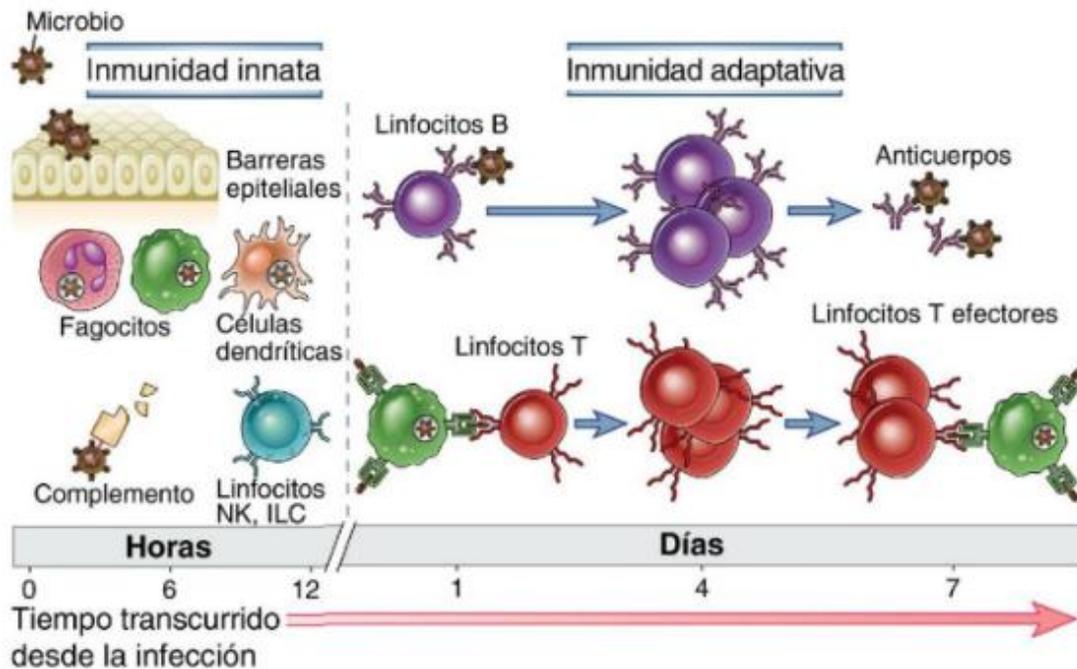


Figura 3-1. Inmunidad innata e inmunidad adaptativa

3.1.4 MONOCITOS

Los monocitos circulantes de sangre periférica representan entre el 5-10% de los leucocitos. Constituyen una población leucocitaria heterogénea con la función de iniciar la inflamación y la eliminación directa de microorganismos patogénicos. Se encuentran vigilando el tejido vascular o permaneciendo infiltrados en los tejidos periféricos ante una posible invasión microbiana. Son críticos en la eliminación de bacterias, hongos y parásitos. Morfológicamente presentan un núcleo bilobulado y arriñonado que ocupa dos tercios de la célula y la define como célula mononuclear. Se originan en la médula ósea y derivan de las células hematopoyéticas pluripotenciales que produce la línea

mieloide, Son liberados al torrente sanguíneo donde permanecerán poco tiempo, desde unas pocas horas (6-8) hasta un máximo de tres días. Los monocitos se clasifican en diferentes subpoblaciones funcionales atendiendo a la expresión de receptores, quimiorreceptores, moléculas de adhesión y patrones de reconocimiento, todo ello relacionado con su velocidad de extravasación, su capacidad fagocítica y la cantidad o tipo de citoquinas producidas. Los monocitos presentes en el torrente sanguíneo se pueden dividir en tres subpoblaciones sanguíneas funcionalmente diferentes: monocitos clásicos, inflamatorios y reguladores. Los primeros se encargarían de la eliminación de los patógenos, los segundos de los procesos inflamatorios y los terceros de la inmunomodulación positiva o negativa del sistema inmune (Sanz, Lahoz, Reina, & Martín, 2017).

3.1.5 INMUNIDAD ADAPTATIVA

Hay otras respuestas inmunitarias estimuladas por la exposición a microorganismos infecciosos que aumentan en magnitud y capacidades defensivas con cada exposición sucesiva a un microbio en particular. Debido a que esta forma de inmunidad surge como respuesta a la infección y se adapta a ella, se denomina **inmunidad adaptativa** (Abul K. Abbas et al., 2015).

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por tener una especificidad frente a moléculas diferentes, presentar la capacidad de generar una memoria inmunológica (responder de forma más intensa a exposiciones repetidas al mismo microbio), reconocer y reaccionar a un gran número de sustancias microbianas y de otro tipo, distinguir entre diferentes microbios y moléculas, incluso estrechamente relacionadas, y por esta razón también se denomina **inmunidad específica**. Se denomina a veces inmunidad adquirida, para subrayar que se «adquiere» por medio de la experiencia, los principales componentes de la inmunidad adaptativa son unas células llamadas **linfocitos** y sus productos de secreción, como los anticuerpos (**figura 3-2**) (Abul K. Abbas et al., 2015).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario y que sirven para eliminar microbios de distintos tipos.

La **inmunidad humoral** cuenta con moléculas presentes en la sangre y en las secreciones mucosas, que reciben el nombre de anticuerpos, producidas por células denominadas linfocitos B (o también células B). Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la patogenicidad de los microorganismos y los marcan como una diana para su eliminación por diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas. La **inmunidad celular** queda a cargo de los linfocitos T (también llamados células T). Los microbios intracelulares, como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del anfitrión, donde los anticuerpos circulantes no los tienen a su alcance. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas por medio de células citotóxicas para suprimir los reservorios de la infección (figura X) (Abul K. Abbas et al., 2015).

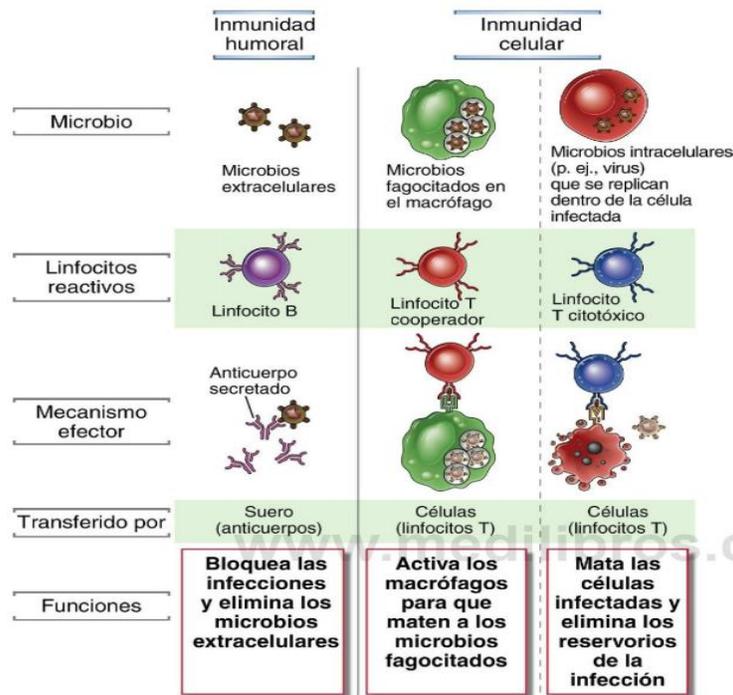


Figura 3-2. Tipos de inmunidad adaptativa

3.1.6 LINFOCITOS

Son las principales células que participan en la respuesta inmunitaria adaptativa. Pueden subdividirse ampliamente en tres poblaciones principales con base en diferencias funcionales y fenotípicas: linfocitos B (células B), linfocitos T (células T) y células NK que mencionamos anteriormente dentro de las células del sistema inmune innato. Los linfocitos son células relativamente sin características sobresalientes, que son difíciles de distinguir desde el punto de vista morfológico. Por ende, depende mucho de las proteínas de superficie que expresan para diferenciar entre subpoblaciones de linfocitos (Owen, Punt, & Stranford, 2014).

- **LINFOCITOS B**

Son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Las células B vírgenes reconocen antígenos a través de su receptor de membrana que es una inmunoglobulina IgM. Una vez activadas por el antígeno, éstas se diferencian a células plasmáticas, que son las células encargadas de secretar el anticuerpo soluble a las mucosas o al torrente sanguíneo, que se encargaran de neutralizar, opsonizar, inducir la granulación de células inmunes o coadyuvar a la destrucción de la célula marcada, mediante la fijación del complemento o la activación de mecanismos citotóxicos dependientes de anticuerpos. Todas las moléculas de inmunoglobulinas tienen características estructurales comunes. Se componen de dos distintas cadenas proteicas (la ligera y la pesada) formando un tetrámero de proteínas unidas mediante enlaces disulfuro. Este tetrámero que compone a los anticuerpos consta de dos regiones funcionales, una región variable y otra constante. La alta especificidad de los anticuerpos se debe a la región variable, ya que esta región de cada anticuerpo es el producto de la recombinación de genes de las cadenas pesadas y ligeras durante la maduración de los linfocitos B (Cresswell, 1994).

- **LINFOCITOS T**

Los linfocitos T clásicos, se dividen en dos subpoblaciones funcionalmente distintas, células T cooperadoras (Th) ($CD4^+CD8^-$) y células T citotóxicas (Tc) ($CD4^-CD8^+$). Las principales funciones de los linfocitos T son regular la respuesta inmune

frente antígenos proteicos y ayudar en su calidad de células efectoras en la eliminación de microorganismos intracelulares. Las células T no producen anticuerpos, sus receptores para antígeno son moléculas de membrana con reconocimiento específico para antígenos, estructuralmente relacionadas con los anticuerpos. Los linfocitos T cooperadores y citotóxicos reconocen antígenos peptídicos unidos a proteínas que están codificadas por los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Constant & Bottomly, 1997).

3.1.7 SISTEMA INMUNE NEONATAL

La etapa neonatal está caracterizada por pasar de un ambiente estéril al mundo exterior, esto ocasiona que el recién nacido tenga que ser capaz de defenderse contra los microorganismos del medio exterior. Esto lo enfrenta a tener que defenderse de patógenos potenciales sin generar una reacción exagerada en su encuentro repentino con antígenos. El estado de tolerancia en las células inmunes neonatales hace que se presente un mayor riesgo de infección en el recién nacido. La inmunidad celular y humoral de los recién nacidos no está completamente desarrollada (la actividad fagocítica, la síntesis de las Igs, la actividad del complemento o la función de los linfocitos) por lo que éstos son los más propensos a desarrollar infecciones, además de que durante el periodo intrauterino no existe un estímulo inmunológico significativo que active las reacciones inmunitarias preventivas. Las características en el sistema inmune neonatal está relacionada con las características de «inmunodeficiencia de tipo transitoria» que se asienta en este periodo de la vida, ya que prácticamente todas las líneas del sistema inmune se encuentran reducidas, tanto en cantidad como en calidad. Entre las características inmunes que ponen en riesgo al recién nacido están: la síntesis retardada de la inmunoglobulina M (IgM), dependencia de la inmunoglobulina G (IgG) materna, inmadurez de las barreras físicas naturales (piel, cordón umbilical, pulmón e intestino), agotamiento del depósito de neutrófilos en su forma madura medular, ya que con la exposición a un agente infeccioso, estos neutrófilos tienen una menor capacidad de adherencia, migración, quimiotaxis y fagocitosis, por lo tanto, tienen una menor capacidad bactericida, la inmunidad mediada por los linfocitos T helper y NK está alterada y la memoria inmunológica es deficiente, disminución en la diferenciación de células B, baja respuesta a defensas antioxidantes (Aguirre, Tapia, Aceves, & Bautista,

2013; Paniagua, Pérez, Cruz, & Benítez, 2003; Perez, Robbins, Revhaug, & Saugstad, 2019).

3.1.8 LOS HONGOS MEDICINALES EN EL SISTEMA INMUNE

Existen sustancias en el organismo que son capaces de influenciar la respuesta inmune, de acuerdo a la intensidad y la dirección de su acción. Se pueden clasificar en inmunosupresores, inmunoestimulantes y en inmunonormalizadores.

En la literatura han reportado que los hongos ayudan al sistema inmunológico debido a que más de 50 hongos conocidos albergan compuestos orgánicos inmunoreguladores de peso molecular y estructura muy diversas. Entre los hongos que se encuentran reportados con estos efectos son los siguientes:

Agaricus subrufescens (sin. *A. blazei* o *A. brasiliensis*). Este hongo es comestible y se caracteriza por una fragancia de almendras y un sabor dulce. Contiene compuestos inmunoestimuladores como β -1,3-D-glucanos, glucomanano y proteoglicanos.

Cordyceps sinensis: (sinónimo de *Ophiocordyceps sinensis* o *Cephalosporium sinensis*) se conoce desde hace mil años como hongo medicinal en China y Taiwán. La actividad inmunomoduladora de este hongo se debe a la presencia de polisacáridos y otros compuestos como la cordicepina.

G. lucidum: Nombres comunes: Reishi (JP), Ligzhi (CN), tiene una larga historia en la medicina tradicional japonesa y china. Este hongo es rico en más de 50 tipos de polisacáridos y complejos péptido-polisacáridos además de unos 120 compuestos bioactivos (principalmente triterpenos). La mayoría de estos compuestos pueden actuar como inmunoestimulantes potentes.

Grifola frondosa: Nombre común: Maitake. Este hongo es rico en β -glucano, que activa macrófagos, células NK y linfocinas. También incluye compuestos como el peróxido de ergosterol (EPO) y el lipopolisacárido (LPS) con importantes actividades inmunomoduladoras.

Hericium erinaceus: Nombres comunes: hongo melena de león, hongo diente barbudo y hongo cabeza de mono. Actúa como inmunoestimulante en base a su contenido en polisacáridos bioactivos de estructura β 1,3-ramificada- β -1,2-manano.

Inonotus obliquus: Nombre común: Chaga. Este hongo es un patógeno vegetal que crece en el tronco de los abedules en regiones frías como América del Norte, Siberia y Corea. La actividad inmunomoduladora de este hongo se basa en su alto contenido en β -glucanos.

Lentinula edodes: Nombre común: Shiitake. Se trata de un hongo japonés comestible, famoso por sus propiedades inmunomoduladoras. Es rico en un tipo especial de polisacárido llamado lentinan (1-3- β -D-glucano con ramas de 1-6- β -D-glucopiranosido).

Pleurotus ostreatus: Nombre común: Hongo ostra. Se cultiva ampliamente en diferentes partes del mundo. Este hongo incluye diferentes tipos de polisacáridos que pertenecen a las familias de β -glucanos, heteroglicanos y proteoglicanos. El pleurano β - (1-3 / 1-6) -D-glucano es el polisacárido más eficaz y mejor estudiado de este hongo.

Poria cocos: Nombres comunes: Fu Ling (CN), Tuckahoe (EE. UU.). Este hongo, utilizado en la medicina tradicional, posee actividad inmunoestimuladora debido a un tipo especial de FIP y proteína de *Poria cocos* (PCP).

Trametes versicolor: Nombre común: Cola de pavo. Tiene fuertes efectos inmunomoduladores debido a un polisacárido llamado Krestin (PSK) y también contiene un FIP llamado tvC (El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013).

Los inmunomoduladores de los hongos exhiben actividades estimulantes tanto para el sistema inmunológico innato como para el adaptativo. Proliferan y activan componentes innatos del sistema inmunológico, como las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos, y estimulan la expresión y secreción de citocinas. Estas citocinas, a su vez, activan la inmunidad adaptativa mediante la promoción de las células B para la producción de anticuerpos y la estimulación de la diferenciación de las células T a las células T helper (Th) 1 y Th2, que median las inmunidades celular y humoral, respectivamente. En general, los inmunomoduladores de hongos se

clasifican en cuatro grupos principales: a) lectinas inmunomoduladoras; b) terpenos y terpenoides inmunomoduladores; c) proteínas inmunomoduladoras fúngicas (FIP); y d) polisacáridos inmunomoduladores.

Los hongos se evalúan actualmente por su valor nutricional y aceptabilidad, así como por sus propiedades farmacológicas. Muchos, si no todos, los hongos basidiomicetos superiores contienen polisacáridos biológicamente activos en cuerpo fructíferos, cultivo de micelio y cultivo sumergido (El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013; Solomon P Wasser, 2010).

3.1.9 POLISACÁRIDOS INMUNOMODULADORES

En general, los polisacáridos de hongos están muy diversificados en su composición de azúcares, estructura de polímero de la cadena principal, grado de ramificación, conformación, peso molecular y otras propiedades físicas, que en conjunto tienen efectos significativos sobre la bioactividad y modo de acción del polisacárido. En general, los polisacáridos de alto peso molecular suelen exhibir una mayor bioactividad. Los polisacáridos de bajo peso molecular pueden penetrar en las células inmunitarias y ejercer efectos estimulantes. Sin embargo, la superioridad de los polisacáridos de alto peso molecular (que no pueden penetrar las células) no se ha discutido claramente en la literatura. La actividad superior de los polisacáridos de alto peso molecular puede atribuirse a la mejor afinidad de unión a los receptores de carbohidratos de las células inmunes. En la mayoría de los casos, los polisacáridos inmunomoduladores bioactivos se caracterizan por una cadena principal de 1-3, - β -D-glucano con un pequeño número de cadenas ramificadas cortas con enlaces 1-6 (El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013).

Se sabe que estos polisacáridos poseen diversas actividades fisiológicas como actividad antitumoral, acción inmunomoduladora, actividad antioxidante, actividad antiviral, acciones antiinflamatorias y anticancerígenas. La acción antitumoral de los polisacáridos está mediada por un mecanismo inmunitario dependiente del timo, que implica la activación de macrófagos citotóxicos, monocitos, neutrófilos, células asesinas naturales, células dendríticas y mensajeros químicos (citocinas, como interleucinas, interferones) y factores estimulantes de colonias que desencadena las

respuestas de fase aguda y complementaria. Ya se han aislado y caracterizado polisacáridos de hongos como pleurano de la especie *Pleurotus*, lentinan y erotionina en *L. edodes*, ganoderan de *G. lucidium* y agaritina de *Agaricus* y calocyban de *Calocybe indica*. Todo el polisacárido del hongo contiene una estructura de β -glucosa, pero el patrón y el grado de ramificación varían de una especie a otra. Sin embargo, también se han encontrado en los hongos algunos polisacáridos que tienen galactosa o manosa como columna vertebral (Rathore et al., 2017).

3.1.10 ESTUDIOS EN EL SISTEMA INMUNE CON GANODERMA

Los polisacáridos con efectos inmunomoduladores han sido estudiados desde hace tiempo, incluyendo el incremento de las funciones de las células presentadoras de antígenos, sistema fagocítico mononuclear, inmunidad humoral y celular. Esto implica que un gran número de componentes del sistema inmune puedan ser activados, estimulados o madurados un ejemplo son los descritos en la **tabla 3-1** donde se muestra una revisión realizada por Lin en el 2005 de los diferentes mecanismos de regulación celular y humoral por polisacáridos de *G. lucidium* (Lin, 2005).

Tabla 3-1. Efectos de polisacáridos de *G. lucidium* en células del sistema inmunológico

Células	Efectos
Macrófagos	<p>Mejoran la fagocitosis</p> <p>Promueven la producción de IL-1, TNF-α y la expresión del ARNm del TNF-α</p> <p>Previene el daño inducido por agentes oxidantes</p> <p>Protege las membranas mitocondriales y alivia el daño de la membrana por radicales libres</p> <p>Incrementan el C^{2+} intracelular</p> <p>Inducen la formación de IP_3 y DAG</p> <p>Incrementa la actividad PKC</p> <p>Activan los macrófagos vía TLR4 y sus rutas de señalización</p>
Neutrófilos	<p>Incrementa la actividad PKC, MAPK, HCK y tirosincinasa</p> <p>Inhiben la apoptosis espontánea e inducida por Fas</p>
Células dendríticas	<p>Promueve la maduración e iniciación de la respuesta inmune inducida por DC</p> <p>Promueve la citotoxicidad inducida por DC</p> <p>Incrementan la producción de IFN-γ</p>

	Induce la activación y la maduración de DC humanas vía NF κ B y p38 MAPK
Células NK	Mejoran la actividad de células NK Incrementan la citotoxicidad mediada por células NK
Linfocitos T	Incrementan proliferación de células T inducidas por ConA Promueve la producción de IL-2 y IFN- γ Incrementan a síntesis de ADN y mejoran actividad de ADN polimerasa α Incrementan el % de linfocitos CD5+, CD4+ y CD8+ Incrementan la producción de IP $_3$ y DAG Incrementan la actividad PKA y PKC
Linfocitos B	Incrementa la proliferación de linfocitos inducida por lipopolisacárido Incrementan la secreción de inmunoglobulina Estimulan la expresión de PKC

IL=interleucina; TNF= Factor de necrosis tumoral; IP $_3$ = inositol trifosfato; DAG=diacilglicerol; DC=células dendríticas; PK= proteínasa; IFN= interferón; ConA=concanavalina A; Fas= proteína de superficie con dominio citoplasmático de muerte celular; NF κ B= factor nuclear- κ B; MAPK= mitogen-activated protein kinase; HCK=hemopoietic cell kinase; TLR4= receptor toll-like 4; Ig= inmonoglobulina; NK= natural killer

Al tener una amplia gama de efectos terapéuticos y siendo uno de ellos como inmunomodulador, su estudio sobre esta actividad ha estado presente por mucho tiempo.

Zhang *et al.* (2002) reportaron un proteoglicano a partir del cuerpo fructífero de *G. lucidum* denominado GLIS teniendo una relación carbohidrato: proteína de 11.5: 1., los carbohidratos presentes son D-glucosa, D-galactosa y D-manosa. GLIS estimuló la proliferación de linfocitos de bazo de ratón, lo que resulta en un aumento de tres a cuatro veces en el porcentaje de células B. También se observó un aumento ligero en la producción de IL-2, mientras IL-4 no tuvo cambios, mejoró la expresión de proteína quinasa C α y C γ en células B. Concluyendo que GLIS es un estimulante de las células B. (Jingsong Zhang, 2002)

Marin Berovič *et al.* (2003) reportaron la obtención de una fracción de polisacáridos extracelulares y cuatro fracciones de polisacáridos intracelulares a partir de la cepa de *G. lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd, MZKI G97 mediante cultivo sumergido, obteniendo mayor mente β -D-glucanos. Los efectos inmunoestimuladores de las fracciones se ensayaron en la inducción de la síntesis de citocinas TNF- α e IFN- γ en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) aisladas de

una cepa leucocitaria. La actividad inductora del TNF- α es comparable con la romurtida, que se ha utilizado como terapia de soporte en pacientes con cáncer tratados con radioterapia y / o quimioterapia. (Marin Berovic, 2003)

Kuo *et al.* (2006) probaron el micelio de *G. lucidum* producido en cultivo sumergido en la mejora de la respuesta inmune innata reportando que el micelio estimulaba la producción de TNF- α e IL-6 después de 8 horas de tratamiento en sangre humana completa. La liberación de IFN- γ a partir de sangre completa humana también se mejoró después de un cultivo de 3 días (Mei-Chun Kuo, 2006)

Zhu *et al.* (2007) diseñaron un experimento para determinar la actividad *in vivo* de los polisacáridos de *G. lucidum* (GI-PS) para potenciar la actividad de células efectoras inmunológicas en ratones inmunosuprimidos. Observando que los ratones tratados con GI-PS comparados contra ciclofosfamida tuvo una aceleración en la recuperación en las células de la medula ósea, glóbulos rojos y blancos, y una proliferación mayor de las NK, NKT (*natural killer T*), células T y B, también mostraron una actividad los linfocitos T citotóxicos y una actividad para las células NK. Estos resultados dan una pauta para la utilización de *G. lucidum* contra la inmunosupresión inducida por las quimioterapias. (Xiao-Ling Zhua, 2007)

Chia-Che Tsai *et al.* (2012) obtuvieron a partir de *G. lucidum* un oligosacárido soluble en agua denominado GLPS-SF2. Esta fracción indujo CD69 en células mononucleares de sangre periférica humana. Este oligosacárido mostró propiedad inmune específica con baja inducción de monocitos, activación celular altamente estimulada y proliferación de células NK y T. (Chia-Che Tsai, 2012)

Habijanic *et al.* (2015) reportaron la obtención de 5 fracciones a partir de una cepa original de *G. lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd, MZKI G97 aislada de hábitats eslovenos mediante cultivo sumergido en un biorreactor de tanque agitado, en la cual probaron la capacidad de estas para inducir la producción de citosinas inflamatorias innatas, así como para modular las respuestas de citocinas de linfocitos activados. Los resultados mostraron que los polisacáridos de *G. lucidum* indujeron cantidades moderadas a elevadas de citocinas inflamatorias innatas (TNF- α , IL-12 e IFN- γ) y que mejoran la respuesta Th1 con altos niveles de IFN- γ e IL-2, y muestran bajo o ningún impacto en

la producción de IL-4 e IL-10. Todas las fracciones de polisacárido probadas indujeron producción de IL-17 a diferentes niveles de concentración (J. B. Habijaníc, Marin; Boh, Bojana; Plankl, Mojca; Wraber, Branka., 2015).

3.1.11 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Se considera radical libre (RL) o especie reactiva de oxígeno (ERO) aquella que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, se producen en el metabolismo del oxígeno en todos los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con todas las moléculas que se encuentran a su alrededor, empezando con aquellas que se encuentran muy cercanas a su sitio de formación. En la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas: anión súper óxido, peróxido de hidrógeno, radical hidróxido y oxígeno singulete (**figura 3-3**). Los radicales libres derivados del oxígeno son considerados los más importantes radicales producidos por los seres vivos (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2006; Carrillo Esper et al., 2016)

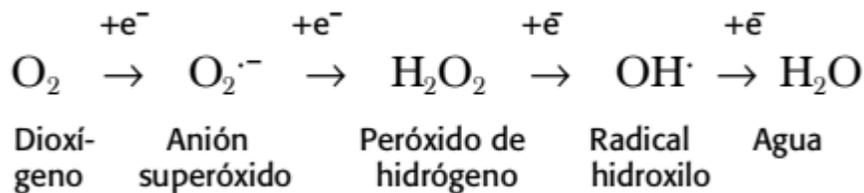


Figura 3-3. Adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno (Pedraza Chaverri & Cárdenas Rodríguez, 2006)

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libres que tienen un papel indiscutible en los procesos fisiológicos habituales, sin embargo, al mismo tiempo, pueden ejercer efectos tóxicos. Las ERO se producen como consecuencia del metabolismo y son esenciales para la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, un proceso crítico para el sistema inmunológico. Éstas también juegan un papel vital en la transducción de señales, que es importante para la comunicación y función de las células (Carrillo Esper et al., 2016).

Existen varias fuentes capaces de producir ERO, dentro de ellas las mitocondrias constituyen las más importantes, aunque existen otras como los peroxisomas (organelos del citosol muy ricas en oxidasa). Los leucocitos polimorfonucleares y los monocitos secretan ERO en un proceso que se conoce como estallido respiratorio en respuesta a la infección y a otras proteínas como complemento, interleucinas y la enzima xantina deshidrogenasa, que se encuentran en los endotelio, durante los procesos inflamatorios (Corrales & Ariza, 2012; Mayor Oxilia, 2010). En las reacciones de oxidación celular, el anión superóxido normalmente se forma primero, y sus efectos se pueden magnificar porque produce otros tipos de radicales libres que dañan las células y agentes oxidantes, sin embargo, la acción dañina del anión hidroxilo es mayor, por esta razón muchos productos químicos como los compuestos fenólicos se han utilizado como una fuente para eliminar los radicales libres, pero este generalmente tiene un efecto secundario (F. Liu, Ooi, & S.T., 1997).

Por otro lado, en los últimos 20 años se ha incrementado la evidencia que demuestra que las ERO pueden ser las causantes de distintos padecimientos, incluyendo las enfermedades coronarias, el cáncer y el envejecimiento (Carrillo Esper et al., 2016).

A pesar de que la actividad antioxidante esta mayormente estudiada en líneas celulares o en células mononucleares de sangre periférica (**PBMCs**), existen pocos reportes sobre las especies reactivas de oxígeno en células mononucleares de sangre de cordón (**CBMCs**).

Galindo-Albarran *et al.* observo que la producción de radicales libres de las células T CD8+ neonatales fue mucho mayor en respuesta al dihidroetidio en comparación con las células adultas, aunque no tan alta como la de los neutrófilos (**figura 3.4**). La mayor respuesta de dihidroetidio está de acuerdo con una mayor expresión de los genes involucrados en la producción de ROS, como el canal de protones HVCV1 , Subunidades de NADPH oxidasa (NCF, NCF2 y NCF4) y genes de lipoxigenasa (ALOX5 y ALOX12) en células T neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016).

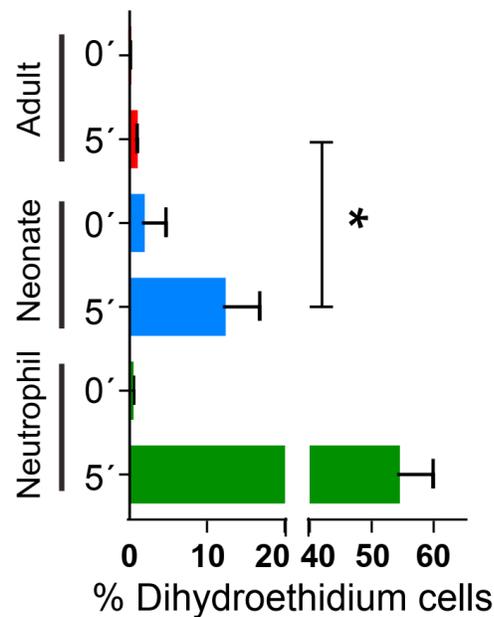


Figura 3-4. Citometría de flujo de la oxidación de dihidroethidio de las células T CD8⁺ y los neutrófilos

En otro estudio realizado por Sánchez-Villanueva *et al.* (2019). Se evaluaron los niveles de ERO citosólicos (c) y mitocondriales (m) en células T CD8⁺ sin tratamiento previo. Células T de recién nacidos y adultos humanos, a nivel basal (**figura 3-5**) y después de la estimulación con TCR. Los resultados obtenidos muestran que la producción de ERO en particular mitocondrial es mayor en las células neonatales y está acompañado de una baja respuesta de las células T CD8⁺ de recién nacidos, en particular, en aquellas que tienen altos niveles de ERO mitocondrial. Un modelo lógico generado por Sánchez-Villanueva *et al.* (2019) sugiere que estos altos niveles de ERO pueden ser responsables de la baja respuesta neonatal (Sánchez-Villanueva *et al.*, 2019).

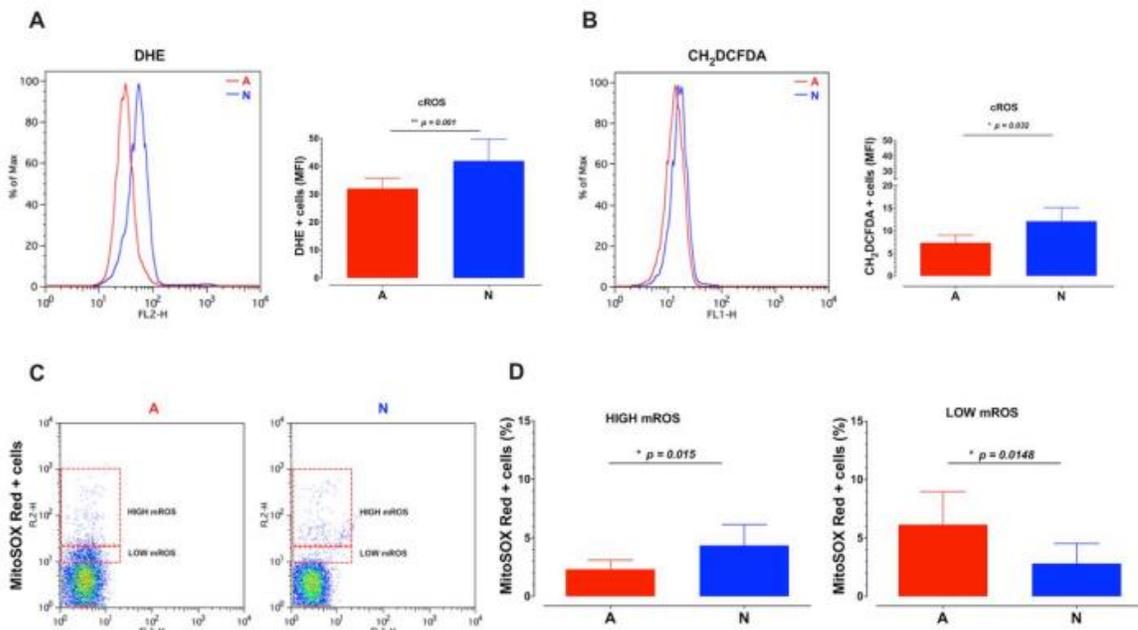


Figura 3-5. Medición de ERO en linfocitos T CD8+ neonatales y de adulto y su efecto en la activación celular

3.1.12 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares, dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen RL. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL. El antioxidante al colisionar con él, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico. Los antioxidantes minimizan el daño oxidativo en sistemas biológicos, previniendo la formación de ERO.

No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL. De lo dicho anteriormente se deduce que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no (**tabla 3-2**). Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta) (Carrillo

Esper et al., 2016; Corrales & Ariza, 2012; Pedraza Chaverri & Cárdenas Rodríguez, 2006).

Los antioxidantes pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios; o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres (captación del oxígeno, unión a metales pesados, etc.), en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios (Carrillo Esper et al., 2016).

Tabla 3-2. Mecanismos de defensa antioxidante

Mecanismos de defensa	Función	Participantes
Enzimáticos	Favorece la remoción de radicales libres	Enzimas Glutación peroxidasa Catalasa Superoxido dismutasa
No enzimáticos	Defensa antioxidante en el organismo	Atocoferol (vitamina E) Ácido ascórbico (vitamina C) β -caroteno Proteínas transportadoras de metales de transición Captadores de radicales libres.

3.1.13 ESTRÉS OXIDATIVO

Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando hay una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida. La sobreproducción de ERO provoca estrés oxidativo. Cuando la generación de estas especies excede la capacidad del sistema para neutralizarlas y eliminarlas, se producen tales tensiones. A altas concentraciones, las ERO pueden dañar la estructura celular, el ácido nucleico, los lípidos y las proteínas. Las ERO atacan fácilmente la membrana lipídica mitocondrial, ya que las mitocondrias son la fuente más importante de ERO, provocando la muerte celular programada (apoptosis) y la célula se destruye por una reacción en cadena generada de la alta concentración de ERO. El daño del ADN inducido por ERO implica

roturas de ADN de cadena simple o bicatenaria, modificaciones de purina, pirimidina o desoxirribosa y enlaces cruzados de ADN. La modificación permanente del ADN puede resultar en mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento. Las ERO pueden oxidar las cadenas laterales de todos los aminoácidos, en particular los residuos de cisteína y metionina en las proteínas (Khatua, Paul, & Acharya, 2013).

3.1.14 ESTUDIOS DE *GANODERMA* SOBRE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La actividad antioxidante de los polisacáridos y triterpenoides presentes en *Ganoderma* ha sido reportada desde principios del año 2000. Estos polisacáridos también fueron reportados como protectores de células del sistema inmune al daño oxidativo (Ayala Sánchez, Villarreal Gómez, Rico Mora, & Soria Mercado, 2016).

Los extractos de hongos que contienen polisacáridos han tomado un gran interés como sustancias captadoras de radicales libres que provienen de una fuente natural y a su vez no son tóxicas. Diferentes estudios han mostrado que los extractos de polisacáridos provenientes de *G. lucidum* tienen un efecto en la eliminación de los aniones $O_2^{\cdot-}$ y OH^- (F. Liu et al., 1997).

En general, las propiedades antioxidantes de los polisacáridos están influenciadas por características químicas como peso molecular, grado de ramificación, tipos de monosacáridos, proporción de monosacáridos, asociaciones intermoleculares de polisacáridos, ramificación glicosídica y modificación de polisacáridos.

Lo et al (2011) informaron que, entre los monosacáridos, ramnosa como el más importante factor determinante asociado a propiedades antioxidantes. También encontraron arabinosa 1 → 4 y manosa 1 → 2 eslabones de la cadena lateral pueden estar significativamente relacionados con el poder reductor mientras que el enlace glucosa 1 → 6 y los enlaces de arabinosa 1 → 4 están relacionados con la eliminación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Chen et al (2008) extrajeron un polisacárido unido a proteína soluble en agua proveniente de cuerpo fructífero de *G. atrum* que contienen manosa: galactosa: glucosa exhibe una fuerte actividad antioxidante ya que este polisacárido presentó una alta actividad en la eliminación de radicales libres (Y. Chen et al., 2008). Li et al 2017

probaron el mismo polisacárido observando que PSG-1 inhibió la sobreproducción de ERO al potenciar la actividad antioxidante del superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (W.-J. Li et al., 2017).

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se obtuvieron paquetes de concentrados leucocitarios de sangre periférica de adultos sanos. La sangre de cordón umbilical se obtuvo de neonatos de término nacidos por parto natural justo después del parto y antes de ser expulsada la placenta. Todo el protocolo fue aprobado por el convenio con el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea, el Hospital J. Parres de Cuernavaca y el Hospital General de Temixco.

3.2.2 PURIFICACIÓN DE SANGRE

A partir de las muestras recolectadas, el día de la captura se realizó una purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y células mononucleares de sangre de cordón (CBMCs) mediante un gradiente de densidad con Ficoll.

En breve se toman 20 mL de sangre, para posteriormente diluirla con PBS 1X (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos) y mezclar por inversión. En un tubo FALCON estéril se coloca Ficoll, posteriormente se vierte la mezcla de sangre + PBS 1X lentamente sin romper el gradiente formado. Después de la centrifugación, las células mononucleares quedan entre el ficoll y el suero con PBS. Se extrae esa capa blanca (PBMCs o CBMCs) para lavarla y centrifugarla. Al pellet obtenido se adiciono medio RPMI 5% para posteriormente realizar conteo de células.

3.2.3 DIDROHETIDIO (DHE)

El indicador de superóxido con didrohetidio, también llamado hidroetidina, muestra una fluorescencia azul en el citosol hasta que se oxida, donde se intercala dentro del ADN de la célula y tiñe su núcleo de un rojo fluorescente brillante. El dihidroetidio también está disponible en una solución de 5 mM convenientemente envasada y estabilizada en DMSO (D23107).

3.2.4 REACTIVO MITOSOX

El reactivo rojo MitoSOX™ es un novedoso colorante fluorogénico que se dirige específicamente a las mitocondrias de las células vivas. La oxidación del reactivo rojo MitoSOX™ por superóxido produce fluorescencia roja. Su oxidación se lleva a cabo

por Oxidación rápida por superóxidos, no por otros sistemas de generación de especies reactivas de nitrógeno (ERN) o de especies reactivas de oxígeno (ERO). Se dirige de forma rápida y selectiva

3.2.5 TINCIÓN ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Se utilizan de 1 a 2 millones de células (PBMCs) por punto, se realizaron tres experimentos.

En el primer experimento las células se estimularon con concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml de la fracción EPS-F1, durante una hora.

En el segundo experimento se adiciono 10 µl de H₂O₂ (1.5 µM) a células de adulto durante diez minutos, posteriormente se les realizo un lavado, para estimular con concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml de la fracción EPS-F1, durante una hora.

En el tercer experimento las células se estimularon con concentraciones de 25, 50 y 100 µg de la fracción EPS-F1, durante una hora y posteriormente se adiciono 10 µl de H₂O₂ (1.5 µM) durante 10 minutos.

A los 3 experimentos se les adiciono 300 µl de didrohetidio (DHE), durante quince minutos en oscuridad, realizar lavado, adicionar 500 µl de FacsJuice, y medir.

Posteriormente de realizar el experimento se analizó por Citometría de flujo en un citómetro de flujo Invitrogen™ Attune™ NxT Acoustic Focusing. El análisis se llevó acabo con FlowJo es un paquete de software para analizar datos de citometría de flujo.

3.2.6 TINCIÓN MULTIPARAMÉTRICA

Se utilizarón de 1 a 2 millones de células (CBMCs) por punto. Para la tinción multiparamétrica se utilizaron los siguientes anticuerpos, CD4, CD8, CD3, CD19, CD14, DHE y MitoSOX.

Las células se estimularon con concentraciones de 50 y 100 µg/ml de la fracción EPS-F1, durante una hora.

Para la realización de la tinción con los diferentes anticuerpos, las muestras se lavaron y se dejaron con el menor volumen posible, ressupender en seco, una vez

resuspendido agregar el anticuerpo acoplado a fluoróforo e incubar durante 25 min en hielo y oscuridad.

Se adicionaron 300 μ l de didrohetidio (DHE) y MitoSOX, durante quince minutos en oscuridad, realizar lavado, adicionar 500 μ l de FacsJuice, y medir.

Se analizó por Citometría de flujo en un citómetro de flujo Invitrogen™ Attune™ NxT Acoustic Focusing. El análisis se llevó acabo con FlowJo es un paquete de software para analizar datos de citometría de flujo.

3.2.7 EXTRACCIÓN DE RNA

Se decantó el pellet celular resuspendido con RPMI 5%, después de colectar las células y centrifugarlas. Se adiciono 1ml Trizol y posteriormente 200 μ l de cloroformo. Se vortexeó durante 1min y centrifugó a 4°C por 15 min a 12500 rpm. Se recuperó el sobrenadante transparente en un tubo ependor estéril y adicionó 500 μ l de isopropanol e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó durante 10 min a 12500 rpm, decantando el sobrenadante, se realizó un lavado con EtOH al 75%, se centrifugó por 10 min a 7500 rpm, se decantó y suspendió el pellet en 30 μ l agua libre de nucleasas tratada con DEPC (Pirocarbonato de dietilo), para leer la concentración de ARN.

3.2.8 EXTRACCIÓN DE CDNA

Para la reacción de cDNA se realizó una mezcla de un 1 μ l oligo dT, 4 μ l de Buffer de reacción 5X, 2 μ l de dNTP mix 10 μ M y 1 μ L de Enzima Transcriptasa Reversa, esta mezcla es por muestra. Una vez realizada la mezcla se procedió a tomar 500ng de RNA para posteriormente de ahí calcular los μ L RNA, posteriormente incubar durante 1h a 42°C, transcurrido el tiempo incubar nuevamente a 72°C durante 10 min. En esta reacción solo se obtiene cDNA a partir del ARNm.

3.2.9 DISEÑO DE CEBADORES PARA CDNA

Los cebadores para los genes se diseñaron con la herramienta “Primer-BLAST” de NCBI considerando el salto de exón (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Con el programa en línea “MFE primer” se corroboró que los cebadores son específicos de producto (K. Wang et al., 2019).

3.2.10 ANÁLISIS POR RT-QPCR

La transcripción de cada uno de los genes de interés se evaluó mediante la técnica de La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR) con el método de SYBR Green. La expresión de los genes se cuantificó de forma relativa con el método de la curva estándar y fue normalizada con la expresión del gen de referencia Beta-2 microglobulina (B2M). Para la elaboración de las curvas estándar de cada par de cebadores se hicieron diluciones seriadas de cDNA, los datos obtenidos de las curvas de amplificación se graficaron para obtener la ecuación de la recta con la que posteriormente se calculó la concentración relativa de cada gen.

3.3 RESULTADOS

Como se mencionó en la introducción, se ha reportado que los extractos de *Ganoderma* tienen un efecto sobre el sistema inmune y sobre la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las especies reactivas de oxígeno se acumulan tanto en el citoplasma como en la mitocondria Para determinar si el extracto soluble de polisacáridos de *Ganoderma sp* tenía un efecto sobre la presencia de ERO, evaluamos por citometría de flujo tanto a cERO como a mERO por citometría de flujo en PBMCs y CBMCs humanos. Las células mononucleares mayoritarias son los linfocitos T y B y los monocitos.

3.3.1 ANÁLISIS DE ERO DE LA FRACCIÓN EPS-F1 EN PBMCs CON DHE

Para evaluar la presencia de cERO, se realizó un análisis por citometría en donde las células PBMCs (células de adulto) se trataron con concentraciones de 25, 50 y 100 µg de EPS-F1 de *Ganoderma sp.* durante 1 hora antes de evaluar la fluorescencia en el citómetro por tinción con DHE para evaluar la producción de ERO en el citosol. Como control se utilizaron células PBMCs no tratadas con el extracto. Por el tamaño y granularidad de cada población, se dividieron las células en dos regiones (**figura 3-6**) para su análisis: monocitos (células más grandes y granulosas) y linfocitos (células poco complejas y pequeñas).

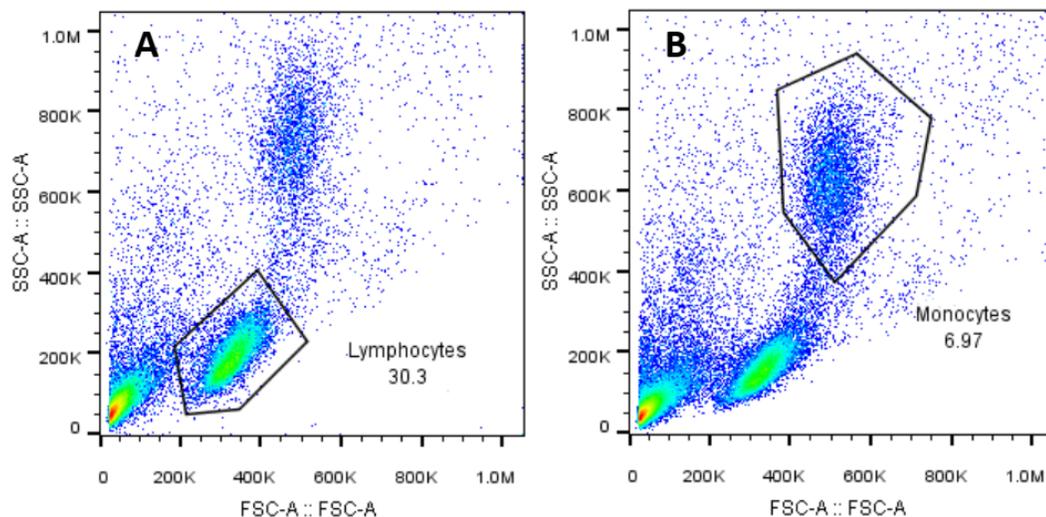


Figura 3-6. Citometría de flujo de las poblaciones A) región de linfocitos; B) región de monocitos.

Las mediciones cuantitativas de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se realizaron de la región de linfocitos que fue positiva para DHE, observando que hay una diferencia significativa en la reducción de las cERO con una concentración del extracto de 100 μg (figura 3-7).

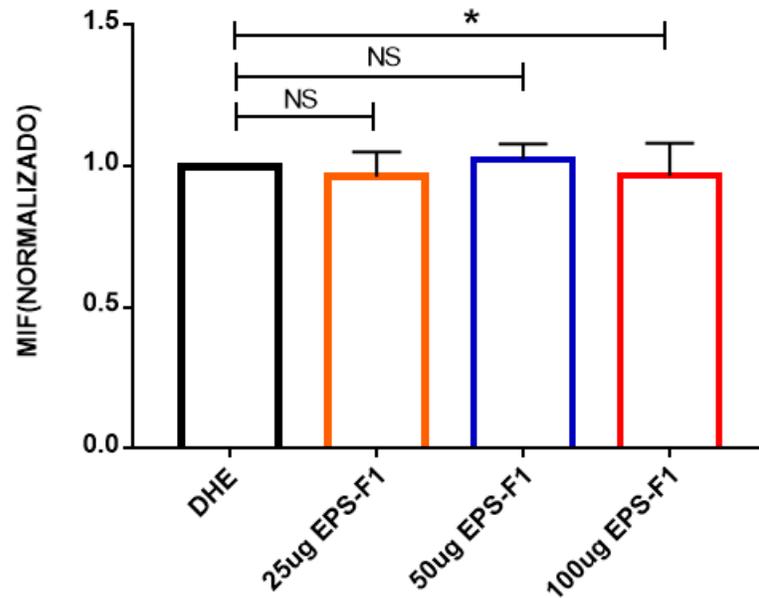


Figura 3-7. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05

Las mediciones cuantitativas de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se realizaron de la región de monocitos que fue positiva para DHE, observando que hay una diferencia significativa con una concentración de 100 μg , sin embargo, en este caso es un aumento de las cERO (figura 3-8).

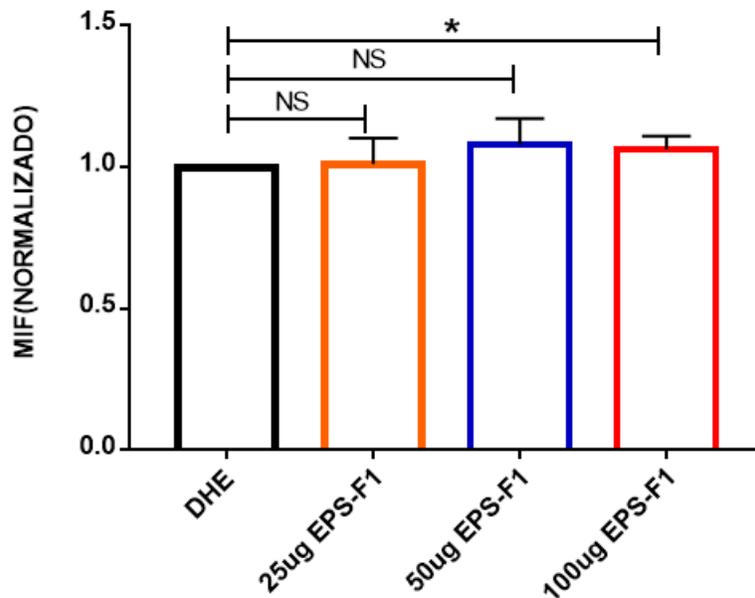


Figura 3-8. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05

Al no tener una cantidad considerable de ERO se optó por la inducción de ERO utilizando peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

En un primer experimento se colocó el peróxido de hidrogeno antes de ser tratadas con las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu g/ml$ de EPS-F1 de *Ganoderma sp.*, posteriormente las mediciones cuantitativas de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se realizaron de la región de linfocitos que fue positiva para DHE, observando que no hubo una diferencia significativa en la reducción de las cERO en ninguna de las diferentes concentraciones de EPS-F1 (**figura 3-9**)

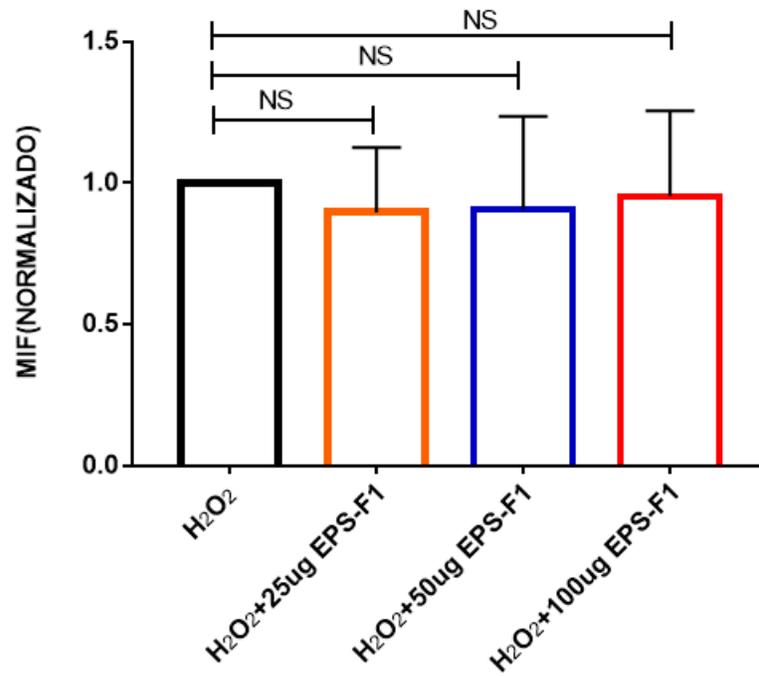


Figura 3-9. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05

Las mediciones cuantitativas de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se realizaron de la región de monocitos que fue positiva para DHE, observando que no hay una diferencia significativa en la reducción de las cERO en ninguna de las diferentes concentraciones de EPS-F1 (**figura 3-10**)

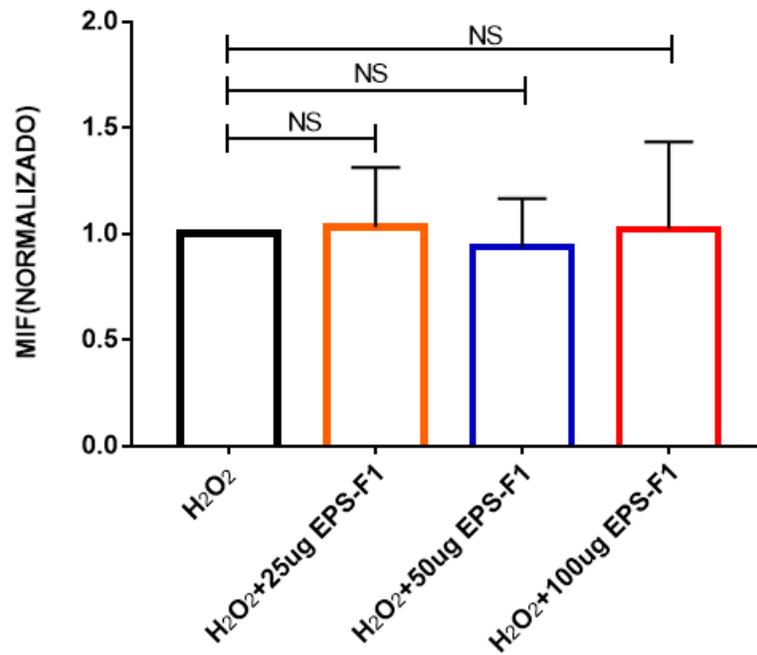


Figura 3-10. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4.

Al observar que no había una disminución de las especies reactivas usándolo con un tratamiento posterior a la inducción de las EROS, se realizó un segundo experimento en el cual primero se colocaron las diferentes concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de EPS-F1 de *Ganoderma sp.* para posteriormente adicionar el peróxido de hidrógeno.

Observamos que para la región de linfocitos positiva para DHE no hubo una diferencia significativa en la reducción de ERO, sin embargo, observamos una tendencia a la reducción de estas especies en presencia del 25 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (**figura 3-11**).

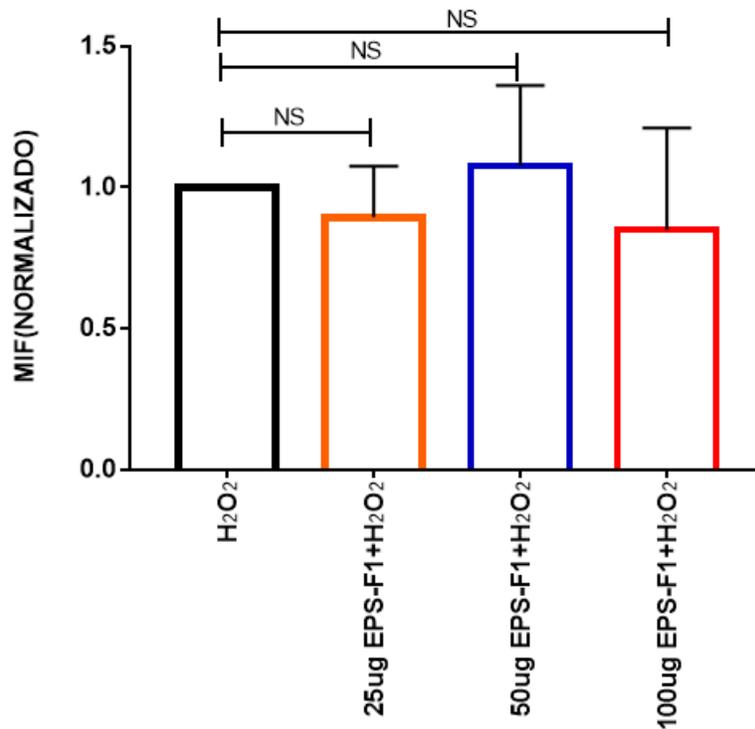


Figura 3-11. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 5.

En la región de monocitos positiva para DHE, hubo una diferencia significativa en la reducción de cERO, para la concentración de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, las desviaciones estándar son grandes, observando que hay una gran variabilidad en las muestras. Esta puede deberse a la variabilidad de los individuos y también a la toxicidad por el H₂O₂ en las células (figura 3-12).

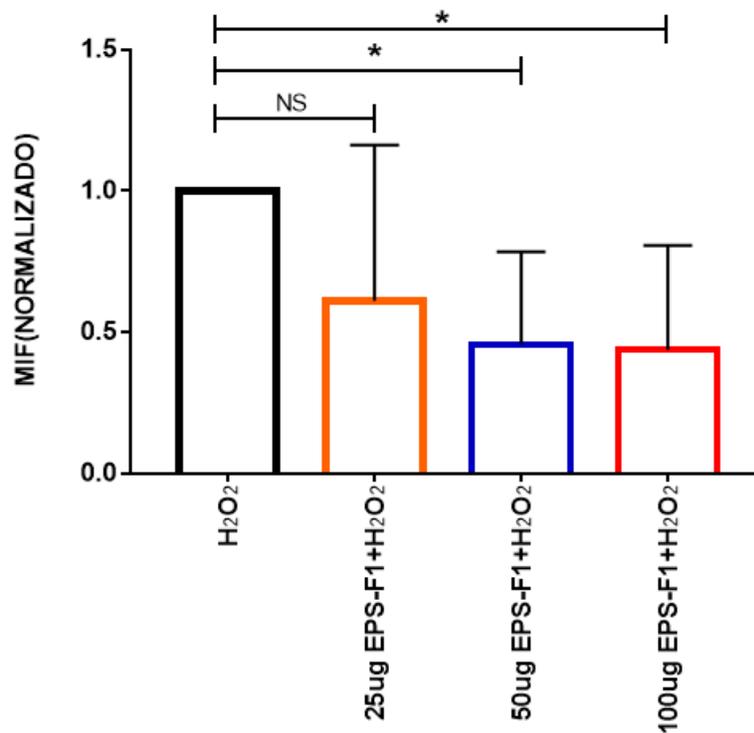


Figura 3-12. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 5. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

3.3.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA FRACCIÓN EPS-F1 EN LOS NIVELES DE ERO CITOSOL Y MITOCONDRIAL DE CBMCs

En el laboratorio de Inmunología Celular se ha observado que las células de neonato tienen mayores niveles ERO que las células de adultos, por lo cual se realizó un experimento exploratorio para observar el comportamiento de las células neonatales y su respuesta al EPS-F1 de *Ganoderma sp.*

Las células se tiñeron con DHE para evaluar la producción de cERO en el citosol y con MitoSOX para evaluar la producción de mERO en la mitocondria, las CBMCs (células neonatales) se trataron con concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de EPS-F1 de *Ganoderma sp.* durante 1 hora. Las células se teñidas con DHE y MitoSOX se compararon con el grupo control en este caso células CBMCs no tratadas.

Las mediciones cuantitativas de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se realizaron de la región de linfocitos que fue positiva para DHE y MitoSOX,

respectivamente. Observamos que para el caso de DHE no hubo una diferencia significativa en la reducción de las cERO, mientras que para la región de linfocitos positiva para mERO hubo una diferencia significativa con una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de EPS-F1 (**figura 3-13**).

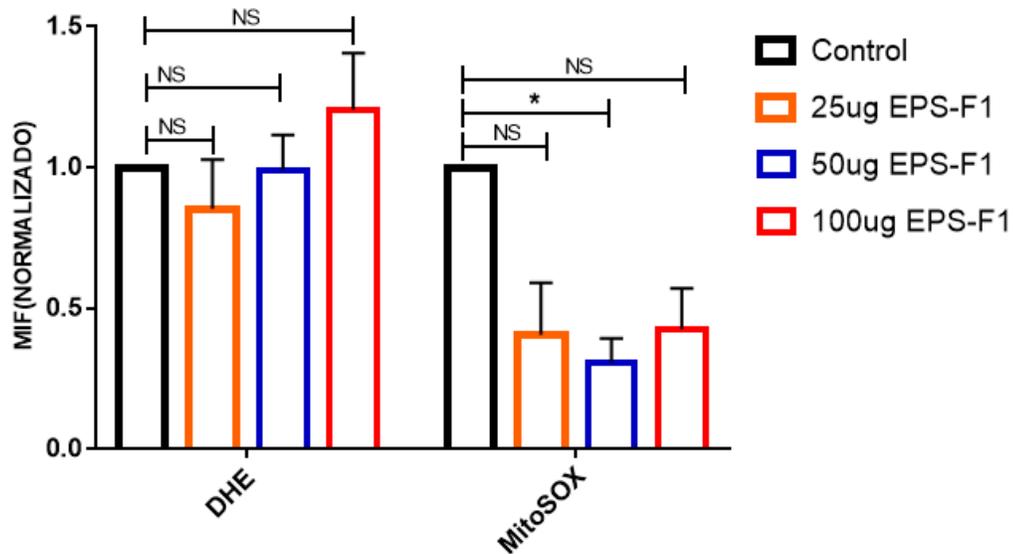


Figura 3-13. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de linfocitos positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 3. Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

Las células se tiñeron con DHE para evaluar la producción de cEROs en la región de monocitos. En la **figura 3-14** se muestra que no hubo una diferencia significativa en la reducción de las ERO.

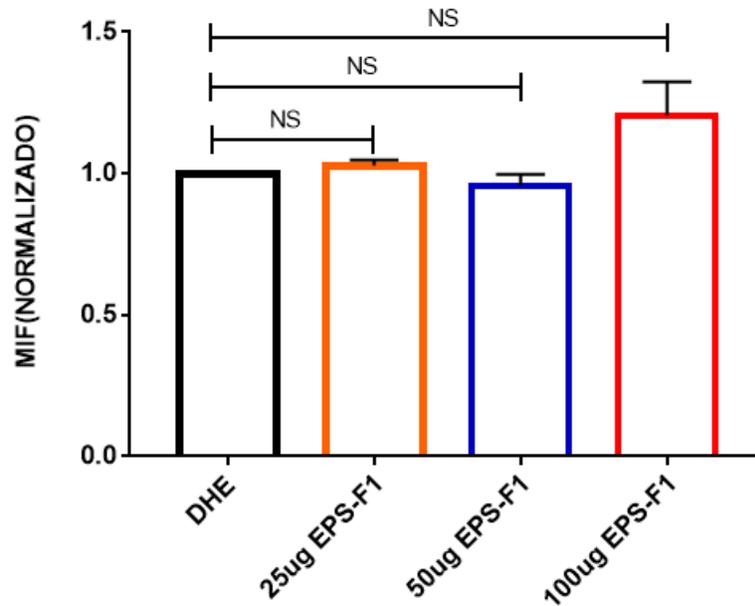


Figura 3-14. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de monocitos positivos para de DHE después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 3. Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

3.3.3 TINCIÓN MULTIPARAMETRÍCA

Para tener una evaluación más precisa de los distintos grupos celulares que componen a las células mononucleares, realizamos tinciones multiparamétricas, es decir, además de evaluar las ERO, evaluamos moléculas específicas de cada grupo celular. Así, se midieron los linfocitos T cooperadores con la molécula CD4⁺, los linfocitos T citotóxicos con CD8⁺, los linfocitos B con CD19 y los monocitos con CD14, las concentraciones utilizadas de la fracción EPS-F1 fueron 50 y 100 µg/ml. Para evitar la toxicidad por H₂O₂ en las células de adultos, estas evaluaciones sólo se realizaron en las células neonatales, que tienen alta presencia de ERO sin necesidad de tratarlos. Realizamos tres experimentos independientes para estas evaluaciones.

En la **figura 3-15** se puede observar que no hubo una diferencia significativa en las células CD4⁺ positivas para DHE, sin embargo, en las células CD4⁺ positivas para MitoSOX, hubo una diferencia significativa en la reducción de mERO para la concentración de 50 µg/ml de EPS-F1.

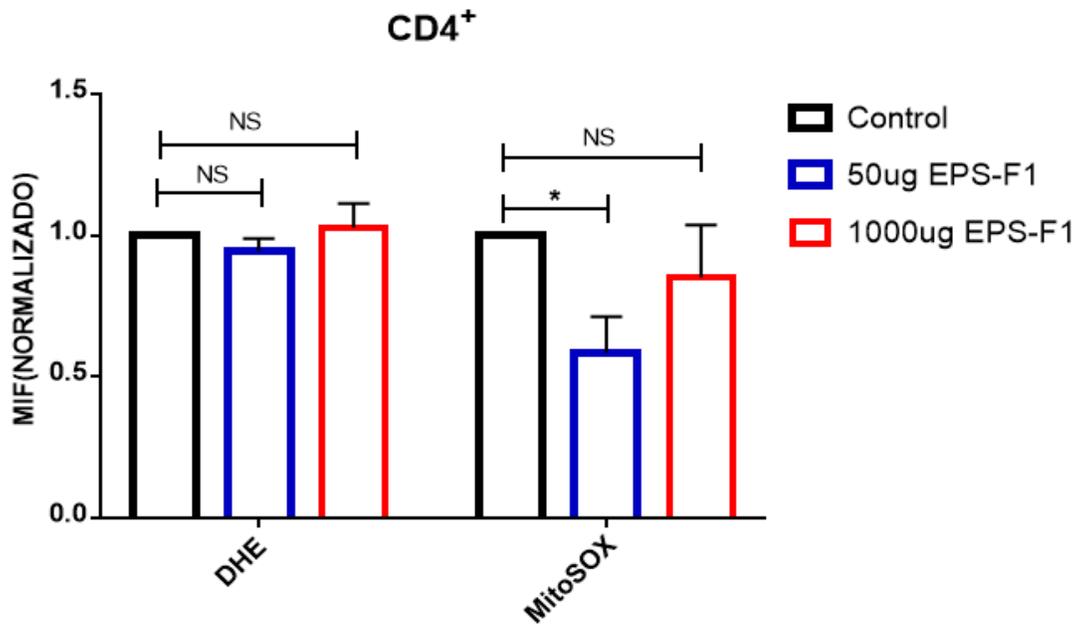


Figura 3-15. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD4⁺ positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4 y n=3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

En la **figura 3-16** se puede observar que de manera similar a las células T CD4⁺, no hubo una diferencia significativa en las células CD8⁺ positivas para cERO, sin embargo, las células CD8⁺ positivas para mERO, hubo una diferencia significativa en la reducción de mERO para la concentración de 50 µg/ml.

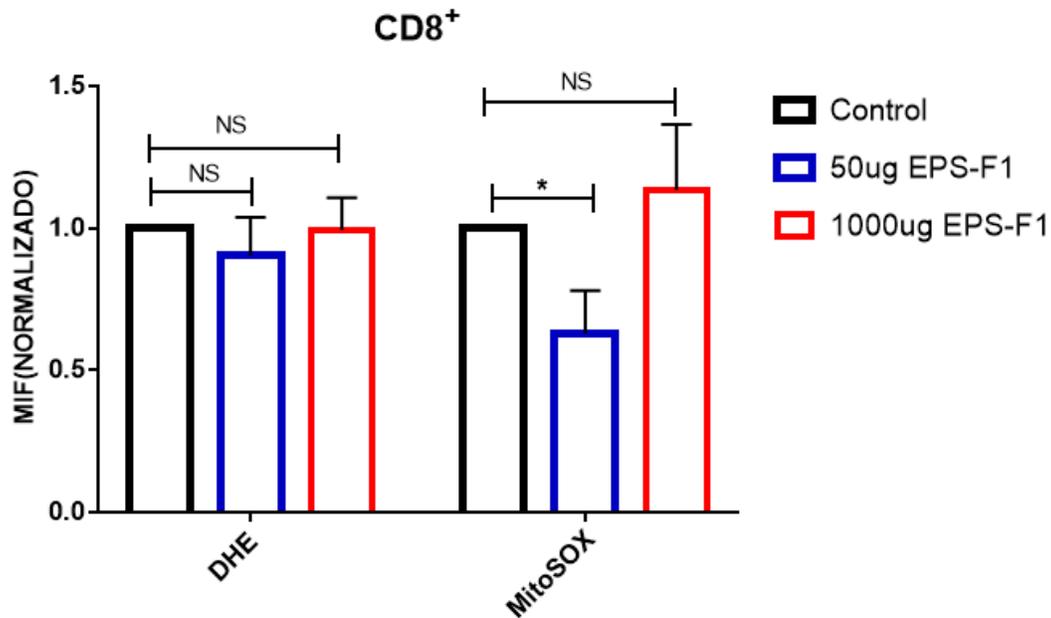


Figura 3-16. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD8⁺ positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4 y n=3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

La tinción multiparamétrica se llevó acabo colocando el anticuerpo CD19, para observar el efecto del extracto sobre los linfocitos B. En la **figura 3-17** podemos ver que hubo una diferencia significativa en la reducción de ERO con la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ en cERO, mientras para mERO, no se observó una diferencia significativa en ninguna de las dos concentraciones.

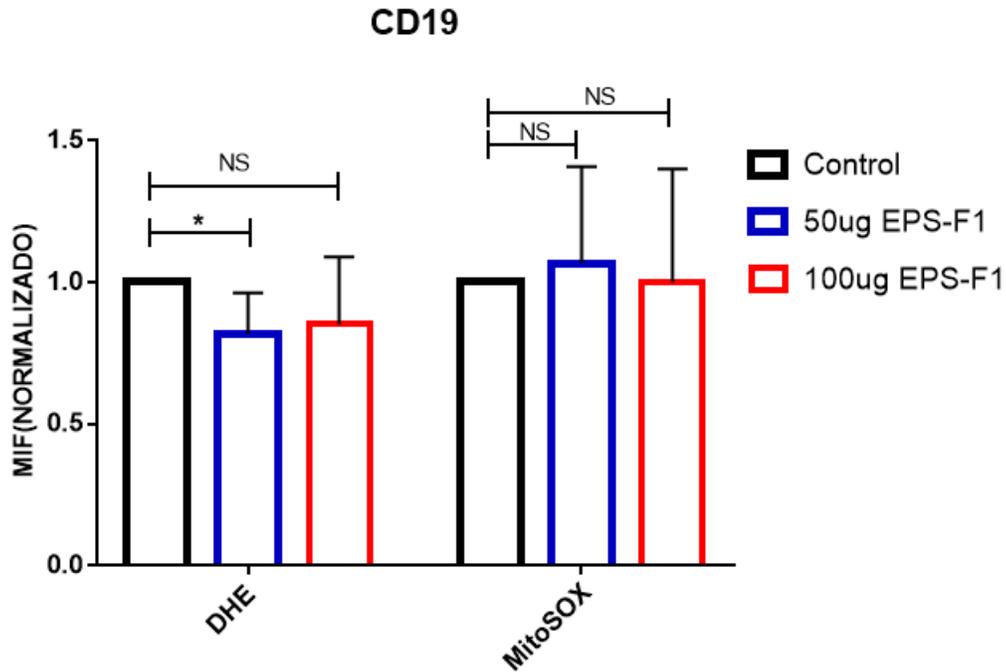


Figura 3-17. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD19 positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de Ganoderma sp. medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 4 y n=3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

En el caso de los monocitos, en la **figura 3-18** se puede observar que hubo una diferencia significativa en las células CD14+ para cERO en la concentración del extracto de 50 μg , sin embargo, las células CD14 + para mERO, no existió una diferencia significativa en la reducción de ERO.

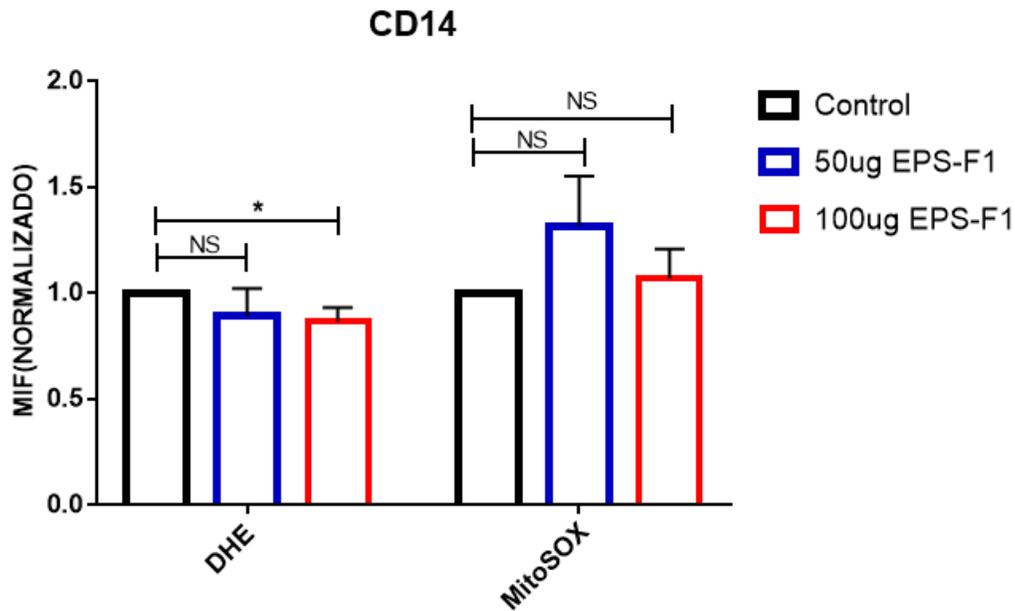


Figura 3-18. Cuantificación de la IMF(normalizada) correspondiente a la región de CD14 positivos para de DHE y MitoSOX después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por citometría de flujo. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 3. . Mostrando una diferencia significativa de *P<0.05.

3.3.4 EXPRESIÓN RELATIVA DE INTERLEUCINAS POR RT-QPCR EN TIEMPO REAL EN CÉLULAS PBMCs Y CBMCs

Para la evaluación de la expresión de genes de citocinas, realizamos el diseño de cebadores. Esto se realizó con el programa Primer-BLAST y se utilizaron para evaluar la transcripción por RT-qPCR. En la **Tabla 3-3** se muestran la lista de cebadores.

Tabla 3-3. Lista de cebadores diseñados para RT-qPCR

Gen	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse
IL-6	TTCCAAAgATgTAgCCgCCC	ACCAgCAAgTCTCCTCATTg
TNF- α	CTgTAgCCCATgTTgTAgCAAAC	ATgAggTACAaggCCCTCTgAT
IL-2	CCAAgAAggCCACAgAACTgA	ATggTTgCTgTCTCATCAgCAT
IL-4	CTTTgCTgCCTCCAAgAACAC	CCAACgTACTCTggTTggCT

IL-1 β AACCTCTTCgAggCACAAgg

gTCCTggAAggAgCACTTCAT

Después de observar que el extracto EPS-F1 de *Ganoderma sp.* tuvo un efecto significativo sobre la concentración de los ERO en los linfocitos T, decidimos evaluar el efecto de este extracto sobre la expresión de citocinas importantes en la función de los mismos. Para esto se estimularon las células con anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD3 (parte del receptor de antígenos de los linfocitos T) y CD28 (coreceptor de activación de los linfocitos T), que simulan la unión de las células T con un antígeno en presencia o ausencia de 50 o 100 μ g del extracto.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la evaluación por RT-qPCR de la expresión de citocinas en células PBMCs y CBMCs sometidas a estímulos diferentes: sin estímulo (SE), CD3/CD28 y CD3/CD28/EPS-F1 (50 y 100 μ g).

En la **figura 3-19** se observa que tanto para la IL-2 e IL-4 la expresión relativa es baja, al agregar CD3 y CD28 para simular una activación por antígeno se observa que para la IL-2 e IL-4 es mayor tanto en PBMCs como en CBMCs. En todos los casos. Como se esperaría la respuesta de las células neonatales fue menor tanto a nivel basal como estimulado. Para ambos tipos de células se realizó una estimulación con CD3/CD28 posteriormente un tratamiento con la fracción EPS-F1 a concentraciones de 50 y 100 μ g/ml.

Observamos que para las células PBMCs hubo un aumento en la expresión de IL-2, IL-4 e IFN- γ , sin embargo, estadísticamente no presentaron diferencias significativas.

En las células CBMCs para la citosina IL-2 e IFN- γ no hubo un aumento en la expresión relativa, sin embargo, para la citosina IL-4 se muestra que en la concentración de 50 μ g/ml hubo una tendencia de aumento de la expresión, pero sin tener estadísticamente una diferencia significativa.

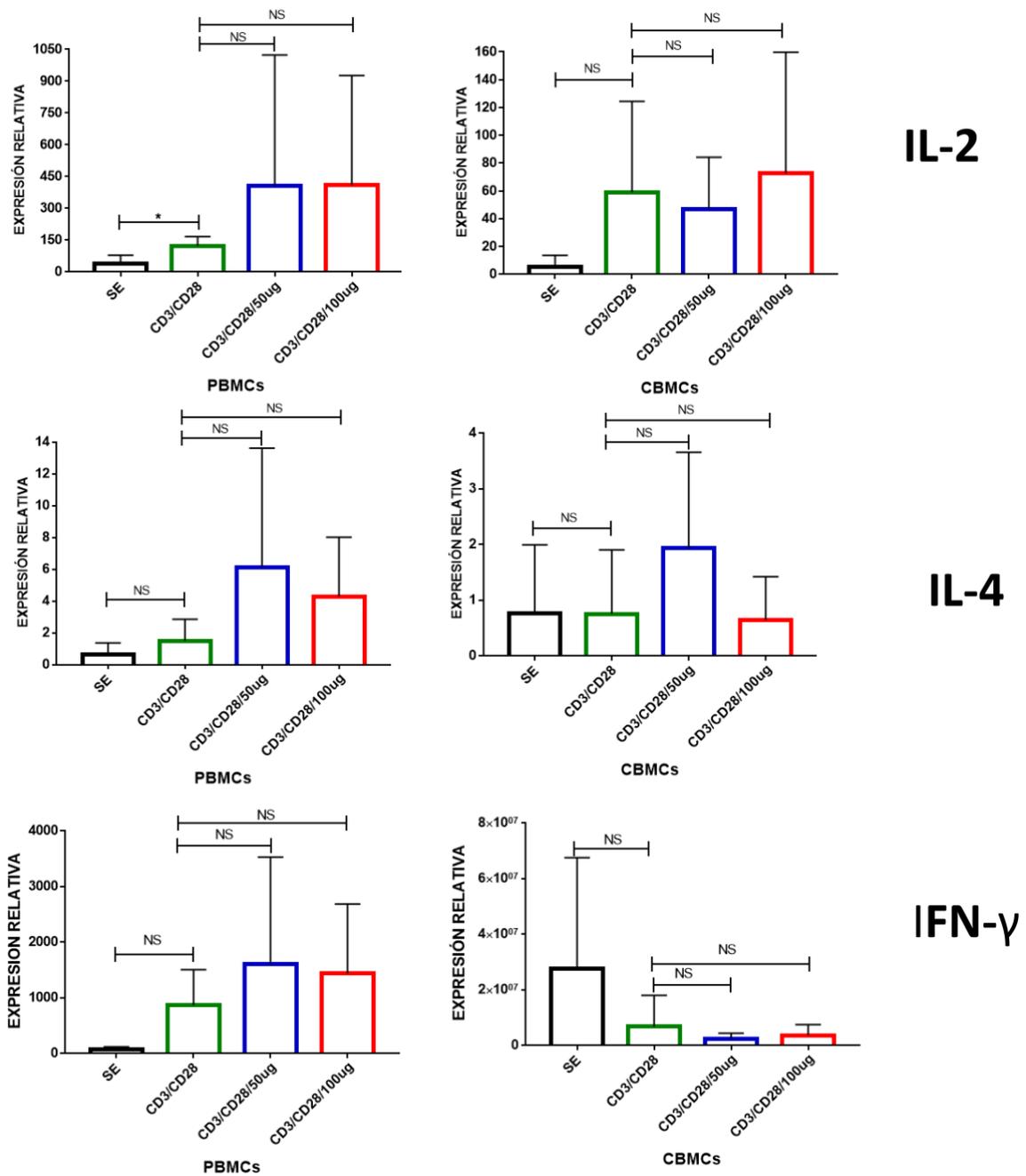


Figura 3-19. Expresión relativa de las citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ en células PBMCs y CBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por RT-qPCR en tiempo real.

Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 3.

Se evaluaron citocinas inducidas por los monocitos por medio de la evaluación por RT-qPCR en células PBMCs y CBMCs.

En la **figura 3-20** se observa que tanto para la IL-1 β y TNF- α la expresión en la muestra SE es baja, cuando estas células son expuestas a CD3 y CD28 y a CD3/CD28/EPS-F1 se observó que hubo un aumento en la expresión de las citocinas, a pesar de esto no hay diferencias significativas, se realizó este mismo procedimiento en células CBMCs pero no hubo amplificación.

Para la IL-6 tanto en PBMCs y CBMCs en estado SE como en el estimulado con CD3/CD28 se observó una expresión relativa similar, sin embargo, cuando ambas células son tratadas con la fracción EPS-F1 la concentración de 50 μ g/ml se observó una tendencia a un aumento en la expresión de TNF- α e IL-1 β , que, debido a la variabilidad entre muestras, no tuvo significancia estadística. En el caso de la IL-6, los niveles se incrementaron más con la concentración de 100 μ g/ml.

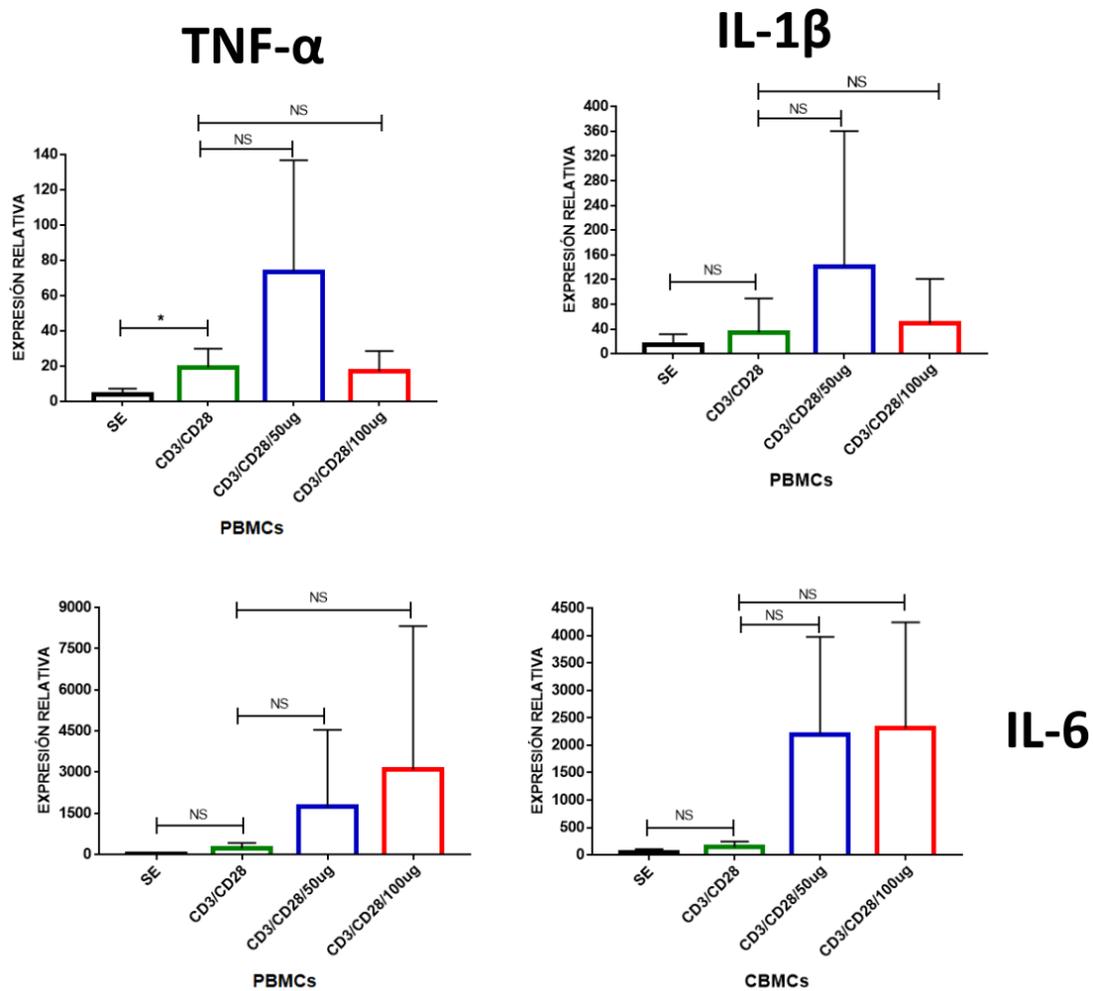


Figura 3-20. Expresión relativa de las citocinas IL-6, IL-1 β y TNF- α en células PBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $(\bar{x}) \pm \sigma n = 3$. Mostrando una diferencia significativa de * $P < 0.05$.

Se evaluaron genes asociados a especies reactivas de oxígeno por medio de la evaluación por RT-qPCR en células PBMCs y CBMCs.

La proteína mitocondrial agrupada homóloga (CLUH), la subunidad del receptor de importación mitocondrial TOM34 (TOMM34), el superóxido dismutasa (SOD1) y el glutatión peroxidasa (GPX1) mostraron una expresión mayor en la muestra SE y fue mayor en células PBMCs que en células CBMCs.

En ninguno de los tratamientos hubo diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, se ven tendencias que a continuación se describen.

Para GPX-1 se observa una disminución de la expresión de estas respuestas a la estimulación con CD3/CD28 tanto en PBMCs y CBMCs. El tratamiento con la EPS-F1 no causó cambios significativos en la expresión de este gen (**figura 3-21**).

Para SOD 1 se observa una disminución de la expresión de estas respuestas a la estimulación con CD3/CD28 tanto en CBMCs. El tratamiento con la EPS-F1 mostró un aumento en la expresión de este gen en la concentración de 50 µg/ml (**figura 3-21**).

Para CLUH se observa un aumento de la expresión de estas respuestas a la estimulación con CD3/CD28 tanto en PBMCs y CBMCs. El tratamiento con la EPS-F1 no causó cambios significativos en la expresión de este gen, sin embargo, en las células PBMCs se observó un aumento de la expresión del gen con la concentración de 50 µg/ml (**figura 3-22**).

Para TOMM34 se observa un aumento de la expresión de estas respuestas a la estimulación con CD3/CD28 CBMCs. El tratamiento con la EPS-F1 no causó cambios significativos en la expresión de este gen, sin embargo, en las células PBMCs se observó un aumento de la expresión del gen con la concentración de 50 µg/ml, mientras que en las células CBMCs con la concentración de 100 µg/ml (**figura 3-22**).

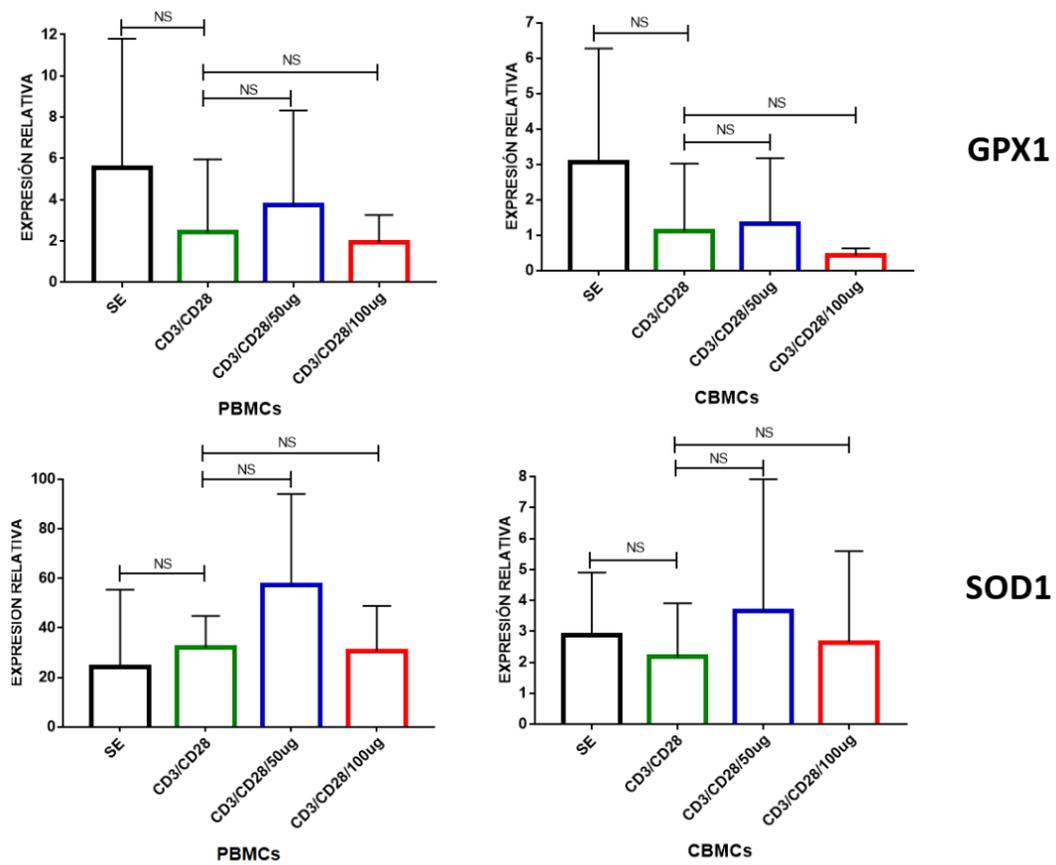


Figura 3-21. Expresión relativa de las citocinas GPX1 y SOD1 en células PBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 3.

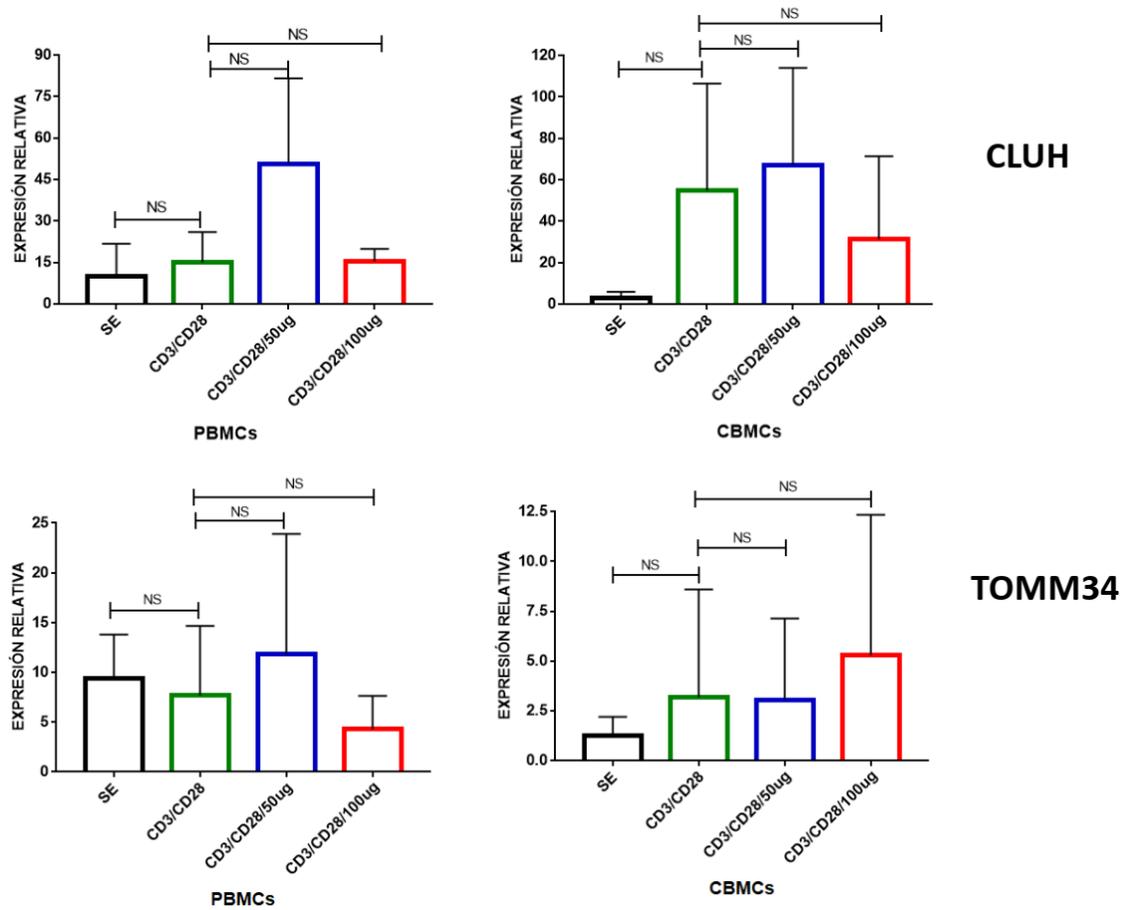


Figura 3-22. Expresión relativa de las citocinas GPX1 y SOD1 en células PBMCs después de la exposición a concentraciones de la fracción EPS-F1 de *Ganoderma sp.* medida por qPCR en tiempo real. Los datos se presentaron $\bar{x} \pm \sigma$ n = 3.

3.4 DISCUSIÓN

La gran mayoría de hongos basidiomicetos contienen compuestos biológicamente activos en los cuerpos fructíferos, el cultivo de micelio y el cultivo sumergido. La mayoría de los hongos con actividades inmunomoduladoras pertenecen a la clase de los Basidiomicetos. Los polisacáridos se consideran los principales responsables de las actividades farmacológicas del hongo *Ganoderma*. Numerosas investigaciones han demostrado que los polisacáridos son los componentes más importantes y responsables de la actividad inmunomoduladora (Ren, Zhang, & Zhang, 2021).

Estos polisacáridos inmunomoduladores, son sustancias que tienen la capacidad de estimular o deprimir el sistema inmunitario, y puede ayudar al cuerpo a combatir el cáncer, las infecciones u otras enfermedades.

Como se mencionó en los antecedentes, se ha reportado que los polisacáridos de *Ganoderma* tienen un efecto sobre el sistema inmune y sobre la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por lo cual se decidió observar si la fracción de polisacáridos EPS-F1 de *Ganoderma sp.* tenía un efecto inmunomodulador.

En este aspecto las ERO pueden regular importantes procesos fisiológicos dependiendo del tipo de célula, del oxidante que las genere, de su intensidad y del tiempo de desequilibrio redox. Las ERO modulan diversas vías de señalización influenciando la síntesis de enzimas antioxidantes, los procesos de reparación, la inflamación y las transformaciones oncogénicas. En este último caso, actuando sobre distintos estadios del ciclo celular, controlan la migración, la proliferación, la sobrevivencia y la apoptosis, sin embargo, cuando se producen en forma excesiva las ERO inducen estrés oxidativo y con ello a daños celulares (Marotte & Zeni, 2013).

De acuerdo a lo ya reportado dentro del grupo de investigación por Galindo-Albarrán et al. 2016 y Sánchez-Villanueva et al 2019 donde observan una cantidad mayor de especies reactivas de oxígeno en células neonatales en comparación con las células de adulto (Galindo-Albarrán et al., 2016; Sánchez-Villanueva et al., 2019), se decidió determinar si la fracción EPS-F1 tenía un efecto sobre la presencia de ERO, evaluando por citometría de flujo tanto a cERO (especies reactivas de oxígeno en el citosol) a mERO (especies reactivas de oxígeno en la mitocondria) por citometría de

flujo en células PBMCs y CBMCs humanos. Las células mononucleares mayoritarias son los linfocitos T y B y los monocitos.

En las PBMCs se pudo observar una reducción de cERO y en las CBMCs se pudo observar una reducción de cERO y mERO, la reducción de ERO intracelular es de gran importancia ya que juega un papel fundamental en diferentes enfermedades que desencadenan una producción excesiva de ERO provocando estrés oxidativo y múltiples procesos patológicos (Carrillo Esper et al., 2016).

Diversos estudios han abordado la actividad de polisacáridos de *Ganoderma in vitro* e *in vivo*, sin embargo, en lo relacionado con la inmunidad neonatal la información disponible es escasa, al observar que había una mayor producción de ERO en células neonatales y que estas no necesitaban de algún agente que promoviera su producción se decidió realizar una tinción multiparamétrica que permitiera evaluar los distintos grupos celulares que componen a las células mononucleares.

Los resultados obtenidos muestran una reducción de mERO en las células T CD4⁺ y CD8⁺ en células CBMCs, esto es de gran importancia porque a pesar de que los niveles normales de especies ERO favorecen el proceso de activación de los linfocitos T, un ambiente intracelular altamente oxidado, por estrés oxidativo o reductivo, tiene un impacto negativo e irreversible en el estado de oxidación de varias proteínas de señalización temprana del TCR (receptor de linfocitos T), pueden afectar la estabilidad mitocondrial y conducir a la formación del poro mitocondrial, el cual es una de las señales iniciales que desencadenan el inicio de la apoptosis (Simeoni & Bogeski, 2015).

De igual manera se midió la expresión de diferentes citocinas, entre ellas la IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 Y TNF- α , las cuales juegan un papel importante en el funcionamiento del sistema inmune estas son reguladas y/o producidas por los linfocitos T, actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T, promueven la proliferación de linfocitos B, ayudan a la activación de macrófagos y a su vez son secretas por ellos mismos; la expresión de estas citocinas tuvo una tendencia a aumentar cuando fueron tratadas con la fracción EPS-F1. Existen reportes sobre el efecto que tiene *Ganoderma* en las citocinas, entre ellos Lin 2005 realiza una revisión de la actividad donde mencionó que los polisacáridos de *G. lucidum* tienen un efecto

en los linfocitos T promoviendo la producción de IL-2 y IFN- γ ; Habijanik et al 2015 reportó que fracciones de polisacáridos de *G. lucidum* de cultivo sumergido indujeron cantidades moderadas a altas de citocinas inflamatorias innatas, los resultados indican que los polisacáridos mejoran la respuesta Th1 con niveles altos de IFN- γ e IL-2, y muestran un impacto bajo o nulo en la producción de IL-4, a diferencia de lo reportado para la IL-4 por Habijanik et al 2015, en el presente trabajo si se observa una mayor producción de la IL-4. Zhang et al 2014 reportan que la administración de PSG-1 polisacárido de *G. atrum* aumentó significativamente los niveles de TNF- α , IL-2 e IFN- γ en el suero de ratones portadores de tumores. (J. Habijanik et al., 2015; Lin, 2005; S. Zhang, Nie, Huang, Feng, & Xie, 2014), sin embargo, aunque los resultados son similares en el aumento de estas citocinas en el presente trabajo no se logró observar una diferencia significativa estadística, lo cual puede ser indicativo de la necesidad de tener un mayor número de muestras analizar, ya que al ser células humanas tienen comportamiento distinto. Asimismo, la eliminación de células de memoria, pudo disminuir las diferencias debido a que cada individuo tiene una historia inmunológica diferente. A pesar de esto los resultados sugieren que los polisacáridos están teniendo una acción sobre las células inmunes, aumentando la expresión de las citocinas, de acuerdo a reportes anteriores.

De igual manera se midieron genes que son expresados como defensa antioxidante, en los reportes sobre Ganoderma en su actividad antioxidante la hablan de este por la capacidad de captar radicales libres, sin embargo, son muy pocos los que hablan sobre el efecto que tiene sobre las defensas antioxidantes enzimáticas como lo son superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. En el presente trabajo se observó que hay una tendencia al aumento en la expresión de estas proteínas, sin embargo, la necesidad de más muestras que ya no se pudieron obtener por la pandemia para encontrar significancia en el efecto de la fracción EPS-F1.

La importancia de los resultados obtenidos en las células CBMCs en las que encontramos una disminución en la cantidad de ERO mitocondriales es muy significativo. Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en los primeros meses de los neonatos, ya que este no tiene un sistema antioxidante

completamente desarrollado en comparación con el sistema antioxidante en la edad adulta.

Cabe resaltar muchos de los estudios realizados para la actividad antioxidante como inmunomoduladora son realizados en líneas celulares, así como en ratones.

El estudio de células humanas es importante, aunque se requerirían de más muestras para obtener significancia estadística, que por la pandemia ya no se lograron obtener.

3.5 CONCLUSIONES

La fracción EPS-F1 tiene un efecto en la reducción de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial en los linfocitos T tanto en CD4⁺ y CD8⁺ neonatales. Tiene una tendencia a promover la expresión de citocinas del sistema inmune, así como las proteínas antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). Inmunidad innata. In ELSEVIER (Ed.), *Inmunología celular y molecular* (8 ed., pp. 51-69).
- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (E. CASTELLANO Ed. 8° ed.).
- Aguirre-Moreno, A., Villeda-Hernandez, J., Campos-Pena, V., Herrera-Ruiz, M., Montiel-Arcos, E., Tello, I., . . . Leon-Rivera, I. (2013). Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Oligosaccharides from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(6), 555-568. doi:10.1615/IntJMedMushr.v15.i6.40
- Aguirre-Moreno, A. V.-H., Juana; Campos-Peña, Victoria; HerreraRuiz, Maribel; Montiel, Elizur; Tello, Isaac; Río-Portilla, Federico del; Río-Portilla, Federico del; Rivera, Ismael Leon. (2013). Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Oligosaccharides from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(6), 555–568. doi:10.1615/IntJMedMushr.v15.i6.40
- Aguirre, A. G. H., Tapia, J. R., Aceves, R. S., & Bautista, V. M. H. (2013). El sistema inmune neonatal y su relación con la infección. *Alergia, Asma e Inmunología pediátricas*, 22(3), 101-113.
- Amaral, A. E., Carbonero, E. R., Simaño, R. d. C. s. G., Kadowaki, M. K., Sasaki, G. L., Osaku, C. A., . . . Iacomini, M. (2008). An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. *Carbohydrate Polymers*, 72, 473-478. . doi:10.1016/j.carbpol.2007.09.016
- Arango-Dávila, C. A. (2004). EL CEREBRO: DE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCIÓN A LA PSICOPATOLOGÍA. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 33(1), 126-154.
- Arif, S., Mufti, A., Griffin, J., & Kitchen, G. (2012). *Lo esencial en Hematología e Inmunología* (4 ed.): ELSEVIER.
- Ayala Sánchez, N. E., Villarreal Gómez, L. J., Rico Mora, R., & Soria Mercado, I. E. (2016). Los Hongos como fuente de recursos farmacológicos: *Ganoderma lucidum*; *Grifola frondosa*; y *Pleurotus ostreatus*. *REPOSITORIO NACIONAL CONACYT*.
- Badalyan, S., & Rapor, S. (2020). AGARICOMYCETES MEDICINAL MUSHROOMS WITH POTENTIAL NEUROPROTECTIVE ACTIVITY GROWING IN ARMENIA. *Proceedings of the Yerevan State University, Chemistry and Biology*, 54(3).
- Bao, X.-F., Wang, X.-S., Dong, Q., Fang, J.-N., & Li, X.-Y. (2002). Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 59(2), 175-181. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00450-2)

- Benkeblia, N. (2015). Ganoderma lucidum Polysaccharides and Terpenoids: Profile and Health Benefits. *Journal of Food Nutrition and Dietetics*, 1(1), 1-6. doi:10.19104/jfnd.2015.101
- Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B., & Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103(1), 77-86. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00069-5)
- Bishop, K. S., Kao, C. H. J., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M., & Ferguson, L. R. (2015). From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114, 56-65. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.02.015>
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., & Zhi-Bin, L. (2007). Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology annual review*, 13, 265-301.
- Brodal, P. (2004). *The central nervous system: structure and function*: oxford university Press.
- Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 164-173.
- Carrillo Esper, R., Díaz Ponce Medrano, J. A., Peña Pérez, C. A., Flores Rivera, O. I., Neri Maldonado, R., Zepeda Mendoza, A. D., . . . Ortiz Trujillo, A. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(1), 6-18.
- Chang, M.-Y., Tsai, G.-J., & Houg, J.-Y. (2006). Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4), 407-414.
- Chen, D.-H., & Chen, W. K.-D. (2003). Determination of Ganoderic acids in Triterpenoid Constituents of *Ganoderma tsugae*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(3), 195-201.
- Chen, J., Zhou, J., Zhang, L., Nakamura, Y., & Norisuye, T. (1998). Chemical Structure of the Water-Insoluble Polysaccharide Isolated from the Fruiting Body of *Ganoderma lucidum*. *Polymer Journal*, 30, 838. doi:10.1295/polymj.30.838
- Chen, R.-Y., & Yu, D.-Q. (1999). Studies on the Triterpenoid Constituents of the Spores of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). 1(2), 147-152. doi:10.1615/IntJMedMushrooms.v1.i2.40
- Chen, Y., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Li, C., & Wang, Y.-X. (2008). Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry*, 107, 231-241. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.021

- Chia-Che Tsai, F.-L. Y., Zih-You Huang, Chien-Sheng Chen, Yu-Liang Yang, Kuo-Feng Hua, Jianjun Li, Shui-Tein Chen and Shih-Hsiung Wu. (2012). Oligosaccharide and Peptidoglycan of *Ganoderma lucidum* Activate the Immune Response in Human Mononuclear Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2830-2837.
- Collins, P., & Ferrier, R. (1995). *Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products*.
- Constant, S. L., & Bottomly, K. (1997). INDUCTION OF TH1 AND TH2 CD4+ T CELL RESPONSES: The Alternative Approaches. *Annual Review of Immunology*, 15, 297–322.
- Corrales, L. C., & Ariza, M. M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18).
- Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol.*, 12, 259-293.
- Débora, F., & Néstor, C. MONOGRAFÍA SOBRE LAS PROPIEDADES MEDICINALES DEL HONGO REISHI (*Ganoderma lucidum*). 12.
- El Enshasy, H. A., & Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol*, 31(12), 668-677. doi:10.1016/j.tibtech.2013.09.003
- Elisashvili, V. (2012). Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(3), 211-239. doi:10.1615/IntJMedMushr.v14.i3.10
- Estrada Rojo, F., Morales Gómez, J., Tabla Ramón, E., Solís Luna, B., Navarro Argüelles, H. A., Martínez Vargas, M., . . . Navarro, L. (2012). Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55(4), 16-29.
- Faden, A. I., & Stoica, B. (2007). Neuroprotection: challenges and opportunities. *Archives of neurology*, 64(6), 794-800.
- Fang, Q.-H., & Zhong, J.-J. (2002a). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37, 769–774.
- Fang, Q.-H., & Zhong, J.-J. (2002b). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10(1), 61-65. doi:[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9)
- Galindo-Albarrán, Ariel O., López-Portales, Oscar H., Gutiérrez-Reyna, Darely Y., Rodríguez-Jorge, O., Sánchez-Villanueva, José A., Ramírez-Pliego, O., . . . Santana, M. A. (2016). CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Reports*, 17(8), 2151-2160. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.056>
- Guo, L., Xie, J., Ruan, Y., Zhou, L., Zhu, H., Yun, X., . . . Gu, J. (2009). Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the

- spores of *Ganoderma lucidum*. *International Immunopharmacology*, 9(10), 1175-1182. doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.06.005>
- Guzmán, G. (2004). Los hongos de El Edén Quintana Roo: introducción a la micobiota tropical de México. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(5), 282-282.
- Habijanac, J., Berovic, M., Boh, B., Plankl, M., & Wraber, B. (2015). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. *New Biotechnology*, 32(1), 85-95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.07.007>
- Habijanac, J. B., Marin; Boh, Bojana; Plankl, Mojca; Wraber, Branka. (2015). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. . *New Biotechnology*, 32(1), 85-95.
- Han, H.-F., Nakamura, N., & Hattori, M. (2006). Protective effects of an acidic polysaccharide isolated from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* against murine hepatic injury induced by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. *Journal of Natural Medicines*, 60(4), 295-302. doi:10.1007/s11418-006-0004-z
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1998). *El Reino de los hongos: micología básica y aplicada*. (2 ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hsieh, C., & Yang, F.-C. (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 91(1), 105-109. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00157-3)
- <https://tiposdecelulas.net/celulas-gliales/>.
- <https://www.abcfichas.com/la-neurona-estructura-y-funcion/>. Retrieved from <https://www.abcfichas.com/la-neurona-estructura-y-funcion/>
- Huang, S., Mao, J., Ding, K., Zhou, Y., Zeng, X., Yang, W., . . . Xia, P. (2017). Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* promote cognitive function and neural progenitor proliferation in mouse model of Alzheimer's disease. *Stem cell reports*, 8(1), 84-94.
- Jingsong Zhang, Q. T., Martin Zimmerman-Kordmann, Werner Reutter, Hua Fan. (2002). Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sciences*, 71(623–638).
- Jong, S. C., & Birmingham, J. M. (1992). Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*. In S. L. Neidleman & A. I. Laskin (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 37, pp. 101-134): Academic Press.
- Khatua, S., Paul, S., & Acharya, K. (2013). Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: a review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6(5), 3.
- Kim, H.-M., Kim, S.-W., Hwang, H.-J., Park, M.-K., Mahmoud, Y. A.-G., Choi, J.-W., & Yun, J.-W. (2006). Influence of agitation intensity and aeration rate on

- production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(8), 1240-1247.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvic, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1), 144-153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>
- Kües, U., & Liu, Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(2), 141-152. doi:10.1007/s002530000396
- Lee, W., Fujihashi, A., Govindarajulu, M., Ramesh, S., Deruiter, J., Majrashi, M., . . . Agrawal, D. C. (2019). Role of mushrooms in neurodegenerative diseases. *Medicinal Mushrooms*, 223-249.
- Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J. K., Ka, K. H., & Park, S. Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2), 249-254. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.009>
- Leon-Rivera, I., Villeda-Hernandez, J., Montiel-Arcos, E., Tello, I., Rios, M. Y., Estrada-Sot, S., . . . Hurtado, G. (2019). Neuroprotective Effects of *Ganoderma curtisii* Polysaccharides After Kainic Acid-Seizure Induced. *Pharmacognosy Journal*, 11(5).
- Li, J., Gu, F., Cai, C., Hu, M., Fan, L., Hao, J., & Yu, G. (2020). Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 806-813.
- Li, W.-J., Li, L., Zhen, W.-Y., Wang, L.-F., Pan, M., Lv, J.-Q., . . . Xie, M.-Y. (2017). *Ganoderma atrum* polysaccharide ameliorates ROS generation and apoptosis in spleen and thymus of immunosuppressed mice. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 199-208. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.033>
- Li, Y.-Q., Fang, L., & Zhang, K.-C. (2007). Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 68(2), 323-328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.001>
- Lin, Z.-B. (2005). Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmacological Sciences*, 99(2), 144-153. doi:10.1254/jphs.CRJ05008X
- Liu, F., Ooi, V. E. C., & S.T., C. (1997). Free Radical Scavenging Activities of Mushroom Polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60(10), 763-771. doi:10.1016/S0024-3205(97)00004-0

- Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W., & Gao, X. (2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(4), 451-457. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.006>
- López-Peña, D., Gutiérrez, A., Hernández-Navarro, E., Valenzuela, R., & Esqueda, M. (2016). Diversidad y distribución de *Ganoderma* (Polyporales: Ganodermataceae) en Sonora, México. *Botanical Sciences*, 94(2), 431-439. doi:10.17129/botsci.463
- Lothman, E. W., & Collins, R. C. (1981). Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain research*, 218(1-2), 299-318.
- 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*, 7(2), 125-133. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.05.002>
- Marin Berovic, J. H., Irena Zore, Branka Wraber, Damjan Hodzar, Bojana Boh, Franc Pohleven (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103, 77-86.
- Marotte, C., & Zeni, S. N. (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas.
- Martínez-Gómez, A. (2014). Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas. *Revista de Medicina e Investigación*, 2(2), 75-84. doi:10.1016/S2214-3106(15)30002-9
- Mayor Oxilia, R. (2010). Oxidative stress and antioxidant defense system. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.
- Mei-Chun Kuo, C.-Y. W., Choi-Lan Hab, Ming-Jiuan Wu,. (2006). *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF-kB. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 217-222.
- Mikkelsen, M. S., Jespersen, B. M., Møller, B. L., Lærke, H. N., Larsen, F. H., & Engelsen, S. B. (2010). Comparative spectroscopic and rheological studies on crude and purified soluble barley and oat β -glucan preparations. *Food Research International*, 43(10), 2417-2424. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.016>
- Miles, P. G., & Chang, S. T. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press.
- Miyazaki, T., & Nishijima, M. (1981). Studies on Fungal Polysaccharides. XXVII. Structural Examination of a Water-soluble, Antitumor Polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 29(12), 3611-3616. doi:10.1248/cpb.29.3611

- Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., & Li, J. (1995). Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*, 11(1), 151-166. doi:10.1080/87559129509541025
- Nie, S., Zhang, H., Li, W., & Xie, M. (2013). Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1(1), 10-20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.01.001>
- Núñez-Urquiza, V. (2017). "OBTENCIÓN DE POLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA EN CULTIVO SUMERGIDO DE *Ganoderma lucidum*". (MAESTRO EN CIENCIAS), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos.
- Olivares, G. (2001). *Aislamiento, caracterización y cultivo de tres cepas silvestres de Ganoderma lucidum (Leyss.:Fr) P. Karts. sobre olote de maíz, en Cuernavaca, Morelos*. (Licenciatura), Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
- Owen, Punt, & Stranford. (2014). *Inmunología* (7 ed.). Mc Graw Hill Education.
- Pala, S. A., & Wani, A. H. (2011). Mushrooms: The entities with multifarious medicinal properties. *Journal of Pharmacy Research*, 4(12), 4721-4726.
- Pan, D., Wang, L., Chen, C., Teng, B., Wang, C., Xu, Z., . . . Zhou, P. (2012). Structure characterization of a novel neutral polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Food Chemistry*, 135(3), 1097-1103. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.071
- Paniagua, M. J. P., Pérez, R. D. B., Cruz, M. d. I. L. G., & Benítez, J. M. Z. (2003). El sistema inmune del recién nacido. *Alergia, Asma e Inmunología pediátricas*, 12(2), 18-23.
- Pedraza Chaverri, J., & Cárdenas Rodríguez, N. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164-173.
- Peng, Y., Zhang, L., Zeng, F., & Xu, Y. (2003). Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. *Carbohydrate Polymers*, 54(3), 297-303. doi:[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00190-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00190-5)
- Perez, M., Robbins, M. E., Revhaug, C., & Saugstad, O. D. (2019). Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radical Biology and Medicine*, 142, 61-72.
- Poirier, J. (2004). *El sistema nervioso: Siglo XXI*.
- Rathore, H., Prasad, S., & Sharma, S. (2017). Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition*, 5(2), 35-46. doi:10.1016/j.phanu.2017.02.001
- Ren, L., Zhang, J., & Zhang, T. (2021). Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells. *Food Chemistry*, 340, 127933.

- Richter, C., Wittstein, K., Kirk, P. M., & Stadler, M. (2015). An assessment of the taxonomy and chemotaxonomy of *Ganoderma*. *Fungal Diversity*, 71(1), 1-15. doi:10.1007/s13225-014-0313-6
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., & Taylor, P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 687-709. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.003>
- Sabaratnam, V., & Phan, C.-W. (2018). Neuroactive components of culinary and medicinal mushrooms with potential to mitigate age-related neurodegenerative diseases. *Discovery and development of neuroprotective agents from natural products*, 401-413.
- Salgado, I. T. (2010). *Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional Ganoderma (fungi, Ganodermataceae), conocido como Reishi en los mercados internacionales , y su relevancia para el desarrollo regional*. (Doctorado), Colegio de Posgraduados,
- Sánchez-Villanueva, J. A., Rodríguez-Jorge, O., Ramírez-Pliego, O., Rosas Salgado, G., Abou-Jaoudé, W., Hernandez, C., . . . Santana, M. A. (2019). Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8+ T cell activation. *PloS one*, 14(12), e0226388-e0226388. doi:10.1371/journal.pone.0226388
- Sanz, J. M., Lahoz, A. G., Reina, M. S., & Martín, A. P. (2017). Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(24), 1369-1378.
- Sasaki, T., Arai, Y., Ikekawa, T., Chihara, G., & Fukuoka, F. (1971). Antitumor Polysaccharides from Some Polyporaceae, *Ganoderma applanatum* (PERS.) PAT and *Phellinus linteus* (BERK. et CURT) AOSHIMA. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 19(4), 821-826. doi:10.1248/cpb.19.821
- Sawetsuwannakun, M. K. (2011). *GENETICS AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF GANODERMA LUCIDUM STRAINS*. (Master of Science), Silpakorn University, Tailandia.
- Simeoni, L., & Bogeski, I. (2015). Redox regulation of T-cell receptor signaling. *Biological Chemistry*, 396(5), 555-569.
- Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., & Misaki, A. (1985). Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharides Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(9), 2641-2653. doi:10.1271/bbb1961.49.2641
- Tang, Y.-J., & Zhong, J.-J. (2002). Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor. *Biotechnology letters*, 24(12), 1023-1026.
- Tang, Y.-J., Zhu, L.-W., Li, H.-M., & Li, D.-S. (2007). Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors--Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technology & Biotechnology*, 45(3).

- Teixeira, M. M., Almeida, I. C., & Gazzinelli, R. T. (2002). Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection* 4 883–886.
- Tello, S., Issac, Montiel-Arcos, E., Leon-Rivera, I., & Martínez-Carrera, D. (2016). Propiedades funcionales novedosas de *Ganoderma lucidum*: actividad neuroprotectora y anticonvulsiva. *Ciencia, tecnología e innovación*, 811-826.
- Testé, M. I. S., & Salman, C. J. D. G. (2007). Neuroprotección en la isquemia cerebral. Experiencias con la eritropoyetina humana recombinante. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 16(1).
- Torres-Torres, M. G., Ryvarde, L., & Guzmán-Dávalos, L. (2015). *Ganoderma* subgenus *Ganoderma* in Mexico. *Revista mexicana de micología*, 41, 27-45.
- Wang, G., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayuzumi, H., . . . Li, J. (1993). Antitumor Active Polysaccharides from the Chinese Mushroom Songshan Lingzhi, the Fruiting Body of *Ganoderma tsugae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(6), 894-900. doi:10.1271/bbb.57.894
- Wang, H., & Wang, S. (2006). Effects of *G. lucidum* spores on NMDAR1 immunoreaction of the cerebral cortex and hippocampus in seizures rats induced by pentylene tetrazol. *Heilongjiang Med Pharm*, 29(1), 11-13.
- Wang, K., Li, H., Xu, Y., Shao, Q., Yi, J., Wang, R., . . . Cai, H. (2019). MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. *Nucleic acids research*, 47(W1), W610-W613.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 283-288. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011>
- Wasser, S. P. (2005). Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 603-622. doi:10.1081/E-EDS-120022119
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(1), 1-16.
- Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1323-1332. doi:10.1007/s00253-010-3067-4
- Weininger, S. J., & Stermitz, F. R. (1988). *Química orgánica*: Reverté.
- Xiao-Ling Zhua, A.-F. C., Zhi-Bin Lin. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 219-226.
- Yang, B., & Lin, Z. (2019). *Ganoderma and Health: Pharmacology and Clinical Application*: Springer.
- Yang, F.-C., Hsieh, C., & Chen, H.-M. (2003). Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process*

- Biochemistry*, 39(1), 21-26. doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00255-8)
- Yang, F.-C., & Liao, C.-B. (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*, 33(5), 547-553. doi:10.1016/S0032-9592(98)00023-5
- Ye, L., Li, J., Zhang, J., & Pan, Y. (2010). NMR characterization for polysaccharide moiety of a glycopeptide. *Fitoterapia*, 81(2), 93-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.08.007>
- Ye, L., Zhang, J., Ye, X., Tang, Q., Liu, Y., Gong, C., . . . Pan, Y. (2008). Structural elucidation of the polysaccharide moiety of a glycopeptide (GLPCW-II) from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, 343(4), 746-752. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.004>
- Zhang, H., Li, W.-J., Nie, S.-P., Chen, Y., Wang, Y.-X., & Xie, M.-Y. (2012). Structural characterisation of a novel bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum*. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 1047-1054. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.061>
- Zhang, H., Nie, S.-P., Yin, J.-Y., Wang, Y.-X., & Xie, M.-Y. (2014). Structural characterization of a heterogalactan purified from fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Hydrocolloids*, 36, 339-347.
- Zhang, J., Wang, Y., & Zhang, J. (2012). The effect of Reishi mushroom powder on protection of amygdala lighting model rat neurons and its mechanism. *Chin J Biochem Pharm*, 33(2), 145-147.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4-19. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.07.013>
- Zhang, M. H., Zhou, X. M., Cui, J. Z., Wang, K. J., Feng, Y., & Zhang, H. A. (2018). Neuroprotective effects of dexmedetomidine on traumatic brain injury: Involvement of neuronal apoptosis and HSP70 expression. *Molecular medicine reports*, 17(6), 8079-8086.
- Zhang, R., Xu, S., Cai, Y., Zhou, M., Zuo, X., & Chan, P. (2011). *Ganoderma lucidum* protects dopaminergic neuron degeneration through inhibition of microglial activation. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2011.
- Zhang, S., Nie, S., Huang, D., Feng, Y., & Xie, M. (2014). A novel polysaccharide from *Ganoderma atrum* exerts antitumor activity by activating mitochondria-mediated apoptotic pathway and boosting the immune system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1581-1589.
- Zhao, C., Zhang, C., Xing, Z., Ahmad, Z., Li, J.-S., & Chang, M.-W. (2019). Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1160-1178. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.076>

- Zhao, L., Dong, Y., Chen, G., & Hu, Q. (2010). Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 783-789. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.029>
- Zhao, S., Kang, Y., Zhang, S., Wang, S., WANG, S.-q., MA, X.-r., & ZHANG, T. (2007). Effect of *Ganoderma lucidum* spores powder on the expression of IGF-1, NF- κ B and apoptosis of nerve cells in the brain from epileptic rat. *Chin J Pathophys*, 23(8), 1153-1156.
- Zhong, J.-J., & Tang, Y.-J. (2004). Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms for Production of Valuable Bioactive Metabolites. In J.-J. Zhong (Ed.), *Biomanufacturing* (pp. 25-59). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Zhou, Y., Qu, Z.-q., Zeng, Y.-s., Lin, Y.-k., Li, Y., Chung, P., . . . Hägg, U. (2012). Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus. *Experimental and toxicologic pathology*, 64(7-8), 673-680.
- Zhou, Z.-Y., Tang, Y.-P., Xiang, J., Wua, P., Jin, H.-M., Wang, Z., . . . Cai, D.-F. (2010). Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 154-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.023>
- Zuleta, E. B. (2007). *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano*: Universidad de Antioquia.