

## Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderma sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida

OROZCO-BAROCIO, Arturo †\*, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA, Salvador

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jalisco

Recibido Enero 14, 2017; Aceptado Marzo 04, 2017

### Resumen

La bioactividad del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* ha sido bien documentada, pero hay poca información sobre las propiedades medicinales de su caldo de cultivo de células suspendidas (también conocidos como cultivos sumergidos), ni de las otras especies del género *Ganoderma*. El objetivo de este estudio fue probar el potencial antimicrobiano y el efecto inmunoestimulador del concentrado del caldo de cultivo sumergido del micelio de *Ganoderma sichuanense*. Se probó la actividad antimicrobiana mediante el método de Daalgard, y el efecto inmunoestimulador fue probado en el modelo de inmunosupresión del Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. Los resultados mostraron un aumento de la sobrevivencia de los ratones tratados con 100 mg/kg del Concentrado del caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense*, así como el restablecimiento de la proliferación de los esplenocitos de los ratones inmunosuprimidos con el linfoma, en concordancia a este fenómeno también se vio un aumento en los niveles séricos de IL-2 en estos ratones con linfoma.

**Ganoderma, Linfoma, Antimicrobiano, Inmunoestimulador**

### Abstract

The bioactividad from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* has been well documented, but there is little information about the medicinal properties of its breeding ground of suspended cells (also known as submerged crops), nor from the other species of the genus *Ganoderma*. The objective of this study was to test the antimicrobial potential and effect immunostimulatory of concentrate broth of submerged culture of mycelium of *Ganoderma sichuanense*. It proved the antimicrobial activity by using the Daalgard method, and the immunostimulatory effect was tested in the model of immunosuppression of the murine Lymphoma L5178Y in solid phase. The results showed an increase in the survival of mice treated with 100 mg/kg of the concentrate of the submerged culture of *G. sichuanense*, as well as the restoration of the proliferation of Splenocytes of mice immunosuppressed with lymphoma, in accordance to this phenomenon also saw an increase in the sera levels of IL-2 in these lymphoma-bearing mice.

**Ganoderma Lymphoma, Antimicrobial, Immunostimulator**

**Citación:** OROZCO-BAROCIO, Arturo, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA, Salvador. Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderma sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-10: 1-12.

\*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: arorozcob@prodigy.net.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

## Introducción

El género *Ganoderma* incluye cerca de 80 especies de setas, de las cuales varias se han utilizado durante siglos en la Medicina Tradicional Asiática por sus propiedades medicinales que incluye efectos antibacterianos, inmunomoduladores, anticancerosos, antioxidantes, cardiovasculares, antialérgicos, hepatoprotectores y antidiabéticos, entre otros (Berovič *et al*, 2003; Čilerdžić, *et al* 2016; Suárez-Arroyo *et al*, 2017). Los efectos antitumorales de *Ganoderma* son atribuidos a la interrupción del ciclo celular, la inducción de la apoptosis y citotoxicidad, la inducción de la diferenciación, supresión de angiogénesis y migración celular, e inmunomodulación (Dai, *et al* 2017).

Los principales compuestos bioactivos producidos por *Ganoderma* responsables de sus efectos curativos son los Triterpenos, los Peptidoglucanos y los Polisacáridos (Kao, *et al* 2013; Xu, *et al* 2011; Yue, *et al* 2010). Los cuales son obtenidos a partir del organismo completo o de alguna de sus partes (cuerpo fructífero, estipe o pie, esporas, micelio) (Paterson, 2006; Soccol, *et al* 2016; Zeng, *et al* 2009), mediante diferentes métodos de extracción que van desde la utilización de metanol, etanol, agua, y otros solventes orgánicos (Ofodile, *et al* 2005; Soccol, *et al* 2016; Zeng, *et al* 2009).

Las especies de *Ganoderma* son encontrados en todo el mundo y se caracterizan por distintos rasgos morfológicos y anatómicos que incluyen la forma y el tamaño del basidiocarpo, el color del píleo o sombrero y del estipe o pie, así como el tamaño y la forma del cuerpo fructífero (Gill, *et al* 2015). Debido a su diversidad existen controversias en su clasificación y la mayoría de las especies que se han utilizado en la medicina tradicional pertenecen a la especie *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karts (Kwon, *et al* 2016; Welti, *et al* 2015).

Actualmente, existe un creciente interés por encontrar fuentes alternativas naturales de antibióticos y antimicóticos debido a la mayor resistencia que presentan los microorganismos a las drogas comerciales. Las setas sintetizan compuestos antimicrobianos como respuesta a su ambiente, que podrían ser utilizados como nuevos fármacos (Čilerdžić, *et al* 2016; Sridhar, *et al* 2011; Yamaç, *et al* 2006). Por otro lado, el cáncer es uno de los males críticos que conducen a la muerte de millones de personas en todo el mundo.

El objetivo de la terapia convencional contra el cáncer es matar las células tumorales sin afectar a las células normales. Sin embargo, la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos no sólo son citotóxicos a las células cancerosas, sino también a las células sanas. El uso clínico de estos agentes es limitado por su toxicidad y daños colaterales. Teniendo en cuenta esto, es necesario el descubrimiento de, nuevos agentes efectivos con pocos o ningún efecto secundario.

El género *Ganoderma* es rico en estas sustancias activas, en particular los polisacáridos, con efectos inmunoestimulantes y antitumorales que han sido aisladas de los extractos acuosos del cuerpo fructífero y los micelios (Kuo, *et al* 2006; Smina, *et al* 2017). Sin embargo, el hecho de que numerosos compuestos biológicamente activos en los hongos son de naturaleza extracelular, se justifica la necesidad de estudios más detallados de los productos bioactivos vertidos por los hongos en el medio de cultivo sumergidos o de células suspendidas (Čilerdžić, *et al* 2016; Paterson, 2006).

Los basidiocarpos o cuerpos fructíferos de *G. lucidum* son comúnmente usados como suplementos alimenticios, pero su cantidad en la naturaleza es limitada y el cultivo tradicional toma demasiado tiempo y es muy difícil controlar el proceso para satisfacer las crecientes demandas del mercado (Ofodile, *et al* 2005; Carrieri, *et al* 2017; Liu, *et al* 2010).

Por lo que, numerosos estudios proponen el cultivo sumergido del micelio, como una forma alternativa de producir metabolitos activos intra y extracelulares (Tang, *et al* 2002). Hoy en día, en el mercado de los alimentos sanos los basidiocarpos son cada vez más sustituidos por el micelio obtenido mediante el cultivo sumergido (o Cultivo de células suspendidas); sin embargo, la bioactividad del caldo de cultivo líquido es casi desconocida (Berovič, *et al* 2003; Li, *et al* 2007). Entre las aproximadamente 250 especies pertenecientes al género *Ganoderma*, *G. lucidum* es la más estudiada debido a su gran potencial medicinal y comercial, mientras que las otras especies de este género no han sido bastante estudiadas (Ćilerdžić, *et al* 2016).

## Objetivos

### Objetivo General

Investigar el efecto antibacteriano del extracto acuoso del cuerpo fructífero, de *Ganoderma sichuanense* una especie estrechamente relacionada con *G. lucidum* (Ćilerdžić, *et al* 2016; Wang, *et al* 2012; Welti, *et al* 2015), así como la actividad inmunomoduladora del Concentrado de los compuestos extracelulares heterogéneos producidos por el micelio de *G. sichuanense* en el Caldo de Fermentación del Cultivo Sumergido de células suspendidas (CCFCSdeGano).

### Objetivos específicos

- Investigar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del cuerpo fructífero de *G. sichuanense* en bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Eschericia coli* (ATCC® 9637™) y *Candida albicans* (obtenidos por el Instituto Dermatológico de Jalisco, México).

- Determinar el efecto inmunomodulador *in vivo*, en ratones Balb/c inmunosuprimidos por el Linfoma Murino L5178Y mediante el inóculo de  $1 \times 10^6$  células en el músculo gastrocnemio derecho, por medio de las siguientes pruebas:
- A) La valoración de la sobrevida de los ratones con el Linfoma tratados y no con 100 mg/Kg de peso corporal del concentrado del caldo de fermentación del cultivo sumergido del micelio de *G. sichuanense* (CCFCSdeGano);
- B) El estudio del desarrollo o evolución de la masa tumoral del Linfoma inoculado en el músculo gastrocnemio derecho de los ratones tratados y no con 100 mg/Kg del CCFCSdeGano por 20 días diariamente;
- C) La determinación de la respuesta Inmune Adaptativa de tipo Celular por el Índice de Proliferación de los esplenocitos de ratones tratados y no con la misma cantidad del CCFCSdeGano; y
- D) La evaluación de las concentraciones de los niveles séricos de las Citocinas: Factor de Necrosis Tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), Interferon gamma ( $IFN\gamma$ ) e Interleucina 2 (IL-2) de ratones tratados y no con el CCFCSdeGano.

## Material y Métodos

### Cultivo de Células Suspendidas

El Concentrado de los compuestos extracelulares heterogéneos producidos por el micelio de *G. sichuanense* en el Caldo de Fermentación del Cultivo Sumergido de células suspendidas (CCFCSdeGano) fue proporcionado por el Biol. Sergio Fausto Guerra, encargado de la producción de *Ganoderma*, en el Laboratorio de Biología Aplicada del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (UdeG).

## Medición de la Actividad Antimicrobiana

Se efectuaron 12 ensayos biológicos para probar la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos del Cuerpo fructífero de Ganoderma, usando el método de microdilución convencional (Dalgaard, *et al* 1994), seguido de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) usando el ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Ong, *et al* 2002). Cada muestra se ensayó frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) y *Eschericia coli* (ATCC® 9637™).

## Ratones

Los ratones de la cepa Balb/c machos de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de 22 a 25 g, fueron alojados y mantenidos en condiciones normales del laboratorio con ciclos de luz-obscuridad de 12/12 h con acceso libre a comida y agua estándar para roedores de acuerdo a las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la World Medical Association (WMA): Declaration of Helsinki (emanada por la 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000).

Los protocolos del uso de animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (U de G).

## Línea celular del Linfoma

La línea celular del Linfoma Murino L5178Y fue derivada de un linfoma murino de origen tímico de los ratones de la cepa DBA/2 (h-2D/d), y fue mantenido en forma ascítica por inoculación intraperitoneal (i.p.) de  $1 \times 10^6$  células semanalmente en ratones singénicos Balb/c (h-2D/d) (Puebla-Pérez, *et al* 1998).

## Estimación de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La actividad del Concentrado del caldo de fermentación del micelio de *G. sichuanense* (CCFCSdeGano) sobre la tasa de sobrevida fue evaluada *in vivo* en 16 ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  células de linfoma en el músculo gastrocnemio derecho; al azar se formaron dos grupos con 8 roedores cada uno. A un grupo se les trató con 100  $\mu$ l Solución Balanceada de Hanks's estéril y al segundo grupo se les trató con 100 mg/Kg de peso corporal del CCFCSdeGano disueltos en 100  $\mu$ l de Solución Balanceada de Hanks's estéril. Para ambos grupos el tratamiento se inició 48 hrs después de la inoculación del linfoma, diariamente por vía oral.

Los ratones fueron observados diariamente, registrando el día de muerte de cada uno de ellos. El tiempo de sobrevida fue evaluado y representado por las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier y la Estimación de Riesgo (ER) fue valorada con la siguiente fórmula (Fernández, 1995):

$$ER = \frac{\frac{\text{Observados del gpo Ctrl}}{\text{Esperados del gpo Ctrl}}}{\frac{\text{Observados del gpo Gano}}{\text{Esperados del gpo Gano}}} \quad (1)$$

## Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

Se utilizaron 2 grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Todos los ratones fueron inoculados con  $1 \times 10^6$  células de linfoma suspendidas en 100  $\mu$ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Los ratones fueron tratados 48 hrs después del inóculo con 100 mg/Kg del CCFCSdeGano disueltos en 100  $\mu$ l de Solución de Hank's estéril, para el grupo experimental y el grupo control solo recibió 100  $\mu$ l de Solución de Hank's estéril. La vía de administración fue oral, con dosis diarias por 20 días.

El volumen del tumor fue medido diariamente usando un vernier electrónico (Digimatic Caliper Mitutoyo Corporation, Japan), iniciando un día antes de la inoculación del linfoma y durante el tiempo del tratamiento. El volumen del tumor (en  $mm^3$ ) fue estimado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. Tumor (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Largo} \times \text{Ancho}^2}{2} \quad (2)$$

### Determinación del Índice de Linfoproliferación *ex vivo*

Para determinar si la Respuesta Inmune de tipo Celular, en este modelo de inmunosupresión por el Linfoma Murino, fue modificada por efecto del CCFCs de Gano, se utilizaron 3 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos, sin tratamiento y sin tumor; el grupo con linfoma, sin tratamiento y el grupo con linfoma y tratamiento de 100 mg/Kg del CCFCs de Gano, en un volumen de 100  $\mu$ l de Solución de Hank's, administrado diariamente, por 20 días.

Al término del tratamiento los doce ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el Bazo para realizar un cultivo primario de linfocitos. Estos son separados por un gradiente de densidad de polisucrosa (HISTOPAQUE 1083, SIGMA), mediante centrifugación diferencial.

Los linfocitos se cultivan por 72 hrs, con una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pozo, en placas de cultivo de 96 pozos (CORNING), en una incubadora a 37° C y con el 5% de CO<sub>2</sub>; se sembraron 6 pozos por bazo, 3 de ellos se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) adicionado con el 10% de Suero Fetal de Ternera, y a los 3 restantes, además del medio de cultivo se les agregó 5 mg de Concanavalina A (SIGMA), un mitógeno que estimula el desarrollo celular.

Al término del tiempo de replicación celular, a cada pozo se les agregaron 40  $\mu$ l de 3(4,5-dietildiazol- 2- il) 2, 5 difenil bromuro de tretazolio (MTT) disueltos en solución de buffer de fosfatos (PBS) a una concentración de 5 mg/ml, se incubaron durante 4 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Enseguida se agregaron 160  $\mu$ l de Buffer de Lisis (SDS al 20% en N, N Dimetilformamida al 50% a pH 4.7). Posteriormente, se incubó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante toda la noche y se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) (Hansen, *et al* 1989; Mossman, 1983). Se determinó el índice de Proliferación (IP) según el siguiente cociente:

$$IP = \frac{\text{Absorvancia de células con mitógeno}}{\text{Absorvancia de células sin mitógeno}} \quad (3)$$

### Determinación de los niveles séricos de Citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ e IL-2

Para valorar la producción de las Citocinas en suero, se utilizaron 3 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos, sin tratamiento y sin tumor; el grupo con linfoma, sin tratamiento y el grupo con linfoma y tratamiento de 100 mg/Kg del CCFCs de Gano, en un volumen de 100  $\mu$ l de Solución de Hank's, administrado diariamente, por 20 días. Al término del tratamiento a los doce ratones se les obtuvo sangre por punción cardiaca y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el suero fue colectado para detectar los niveles de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-2 mediante kits de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante (eBioscience).

### Análisis Estadístico

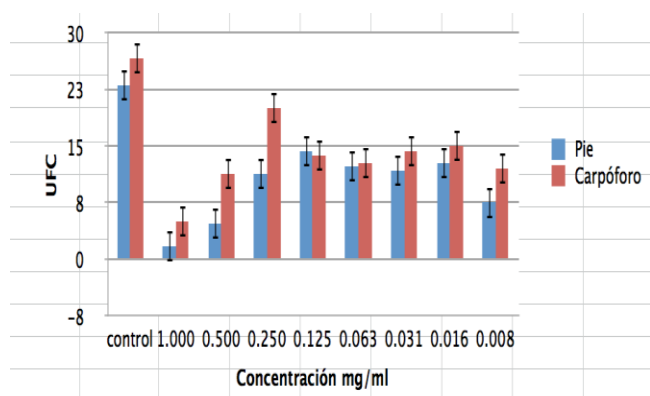
Para los experimentos de sobrevivencia se utilizarán las pruebas de Kaplan – Meier y la Estimación de Riesgo con el estadístico  $J_i^2 (X^2)$ ; para el desarrollo del tumor se utilizó la Comparación de Pendientes con el estadístico *t de Student* y para las pruebas del Índice de Proliferación y los niveles de interleucinas, se utilizó el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA).

Y las Diferencia Significativas Mínimas (DSM). Todos los experimentos comparados a una significancia de  $p = 0.05$ .

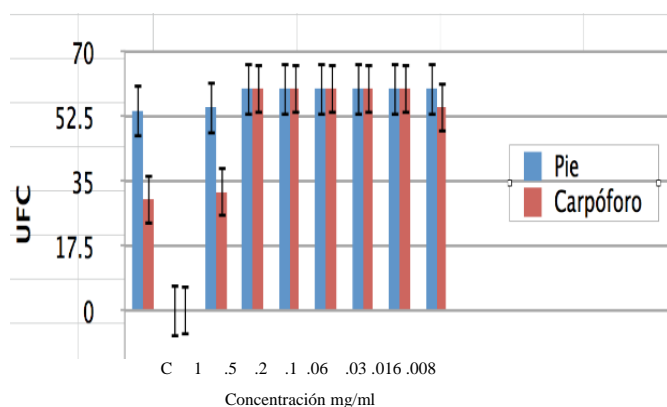
## Resultados

### Actividad Antimicrobiana

Los extractos acuosos del cuerpo fructífero de *G. sichuanense* muestran actividad antimicrobiana consistente en diluciones seriadas probando el efecto dosis-respuesta, contra bacterias Gram Positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) y Gram Negativas como *Eschericia coli* (ATCC® 9637™), como puede observarse en el grafico 1.



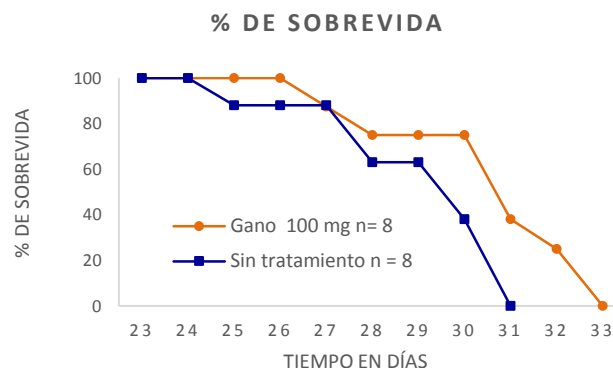
**Grafico 1** Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *E. coli* vs diferentes concentraciones del extracto acuoso del carpóforo de *G. sichuanense*.



**Grafico 2** Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *S. aureus* vs diferentes concentraciones del extracto acuoso del carpóforo de *G. sichuanense*

### Estimación de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

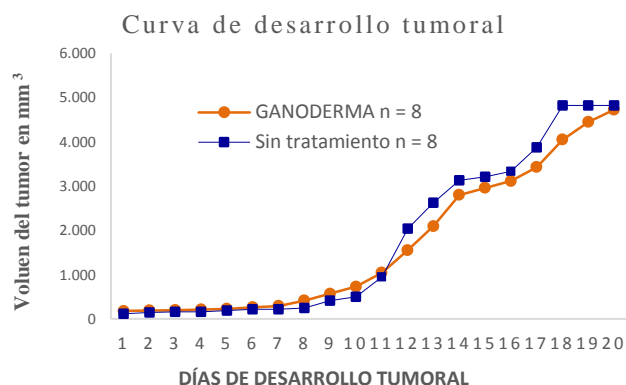
La sobrevida de los ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  células de Linfoma Murino L5178Y en el músculo gastrocnemio derecho y tratados y no con 100 mg/Kg de peso corporal de Concentrado del caldo de fermentación del micelio de *G. sichuanense* (CCFCSdeGano), fue significativamente mayor ( $p = 0.05$ ) en los ratones con tratamiento (gpo. Gano) versus los ratones no tratados (gpo. Ctrl); el promedio de vida para el grupo tratado fue de 30 días y el del grupo sin tratamiento fue de 28 días. Por otro lado, la Estimación del Riesgo, significa que los ratones sin tratamiento tienen 2.8 veces más riesgo de morir por el tumor que los ratones tratados (Grafico 3).



**Grafico 3.** % Sobrevida de ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 100 mg/kg de Concentrado de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* ( $p=0.05$ )

### Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

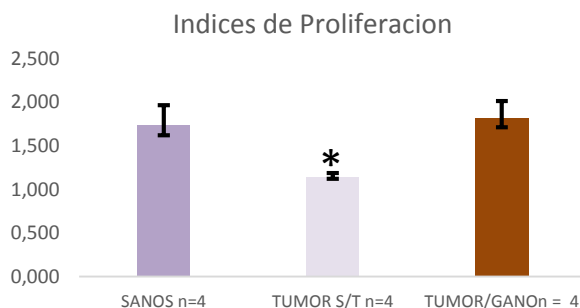
En cuanto al desarrollo del tumor, no hubo diferencia significativa ( $p = 0.05$ ), los tumores crecen al mismo ritmo en ambos grupos de roedores (Grafico 4).



**Gráfico 4** Curva de desarrollo tumoral de ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 100 mg/kg de Concentrado de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* durante 20 días ( $p=0.05$ )

### Determinación del Índice de Linfoproliferación *ex vivo*

Al valorar el Índice de Proliferación observamos que el modelo de inmunosupresión del Linfoma murino L5178Y es eficaz, ya que reduce considerablemente la Respuesta Inmune de tipo Celular del ratón con Linfoma, en relación a los datos del IP del grupo de ratones sanos sin tratamiento y sin tumor, en cuanto al efecto del CCFCSdeGano, restituye significativamente ( $p=0.05$ ) esta inmunosupresión a los linfocitos esplénicos de los ratones con tumor (Gráfico 5)



**Figura 4** Índices de proliferación de esplenocitos de ratones inoculados con  $1 \times 10^6$  células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 100 mg/kg de Concentrado de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* durante 20 días. \*Tumor vs Sanos y Gano ( $p=0.05$ )

### Cuantificación de los niveles séricos de Citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ e IL-2

La cuantificación de los niveles séricos de las Citocinas en pg/ml, mediante la técnica de ELISA, nos muestra que el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es significativamente diferente entre los grupos ( $p=0.05$ ), disminuyendo su concentración en los ratones de los grupos con Tumor, tratados y no con el CCFCSdeGano. Por el contrario el Interferón gamma (IFN $\gamma$ ), del grupo de ratones sanos es diferente significativamente con los grupos de Tumor sin tratamiento (Tumor S/T) y Tumor con tratamiento del CCFCSdeGano ( $p = 0.05$ ) y sin tener diferencias significativas entre estos últimos grupos.

Finalmente los niveles de la Interleucina 2 (IL-2) son más elevados en el grupo con tumor y tratados con CCFCSdeGano, siendo diferente significativamente con los otros dos grupos, en cambio, entre el grupo de tumor S/T y el grupo sano, no existen diferencias significativas ( $p=0.05$ ) (Tabla 1).

Citocina	gpo Sano	gpo Tumor S/T	gpo Ganoderma
TNF $\alpha$	91.6 $\pm$ 2	67.1 $\pm$ 4	39.1 $\pm$ 8
IFN $\gamma$	187.6 $\pm$ 6.1	504.3 $\pm$ 177	567.6 $\pm$ 100
IL-2	65.8 $\pm$ 9	68.6 $\pm$ 14	91.5 $\pm$ 14

**Tabla 1** Valores séricos en pg/ml de Citocinas Promedio  $\pm$  DS

### Conclusiones

Las interacciones patológicas entre las células cancerosas y las células inmunes del hospedero en el microambiente tumoral crea una red inmunosupresora que promueve el crecimiento tumoral, protege el tumor del ataque inmune y atenúa la eficacia inmunoterapéutica (Zou, 2005). El Linfoma Murino L5178Y en fase sólida es un buen modelo de inmunosupresión y nos permite evaluar los efectos inmunomoduladores de sustancias con esta actividad.

Nuestros resultados experimentales confirmaron que el concentrado de cultivo sumergido del micelio de *Ganoderma sichuanense* (CCFCSdeGano) tiene efectos inmunoestimulantes en este modelo de Linfoma; así como se ha confirmado en otros estudios donde cultivos sumergidos de género *Ganoderma*, también tienen dicho efecto (Berovič, *et al* 2003; Čilerdžić, *et al* 2016; Carrieri, *et al* 2017). Aunque el desarrollo del tumor no tuvo diferencia entre los ratones tratados con el concentrado del cultivo sumergido del micelio de *G. sichuanense* (fig.3), la esperanza de vida sí se vió favorecida, ya que el riesgo de muerte de los ratones no tratados fue casi tres veces más que los tratados con el concentrado de *Ganoderma*, aumentando la esperanza de vida por 2 días (fig.2).

Por otro lado, el Índice de Proliferación (IP), que es la relación entre la multiplicación de las células en reposo y la multiplicación de las células estimuladas por el mitógeno, se observa que en el grupo inmunosuprimido con el Linfoma está significativamente disminuido comparado con el IP del grupo de los ratones sanos, y que el tratamiento del CCFCSdeGano estimula considerablemente esta respuesta (fig.4); la proliferación celular es una manera de medir la respuesta inmune adaptativa de tipo celular cuya capacidad de reproducción de los linfocitos es una evidencia del efecto inmunoestimulador que tienen los bioproductos del caldo concentrado del cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense*.

Uno de los enfoques importantes para evaluar la actividad inmunomoduladora de una sustancia en particular es mediante la valoración de la síntesis de citocinas. Las citocinas son moléculas de señalización producidas y secretadas, principalmente por las células inmunes activadas. Son esenciales para el mantenimiento de las funciones del organismo y desempeñan un importante papel en el control de la homeostasis del individuo mediante la vigilancia de la proliferación, diferenciación celular y la apoptosis.

Así como las funciones de defensa tales como las respuestas inmunes y las reacciones inflamatorias (Abbas, *et al* 2015; Berovič, *et al* 2003; Ruijun, *et al* 2015). La IL-2 es una importante molécula de la red de citocinas que realiza actividades biológicas como la promoción de la mitosis en los linfocitos, el aumento de la función citolítica de las células Asesinas Naturales (NK) y la ayuda en la generación de anticuerpos (Rosenberg, 2014).

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citocina que deriva de los monocitos activados y tiene varias actividades antitumorales como, la necrosis y apoptosis celular y la activación de otras citocinas (Ohri *et al* 2010; Somintara, *et al* 2016). El INF $\gamma$  es una de las principales citocinas que regulan el Sistema inmune y su principal función es aumentar la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I) y activar a los Macrófagos contra bacterias y agentes infecciosos exógenos (Alokail, *et al* 2014; Li, *et al* 2016). En el Cáncer, la secreción de las citocinas IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  incrementan la capacidad inmunológica antitumoral del organismo (Gerber, *et al* 2013; Ni, *et al* 2013).

En nuestro estudio valoramos las concentraciones séricas de las citocinas IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , en los ratones sanos, sin tumor ni tratamiento y en ratones inmunosuprimidos con el Linfoma Murino L5178Y en fase sólida, sin tratamiento y tratados con el concentrado del caldo de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* por 20 días de forma oral con 100 mg/kg de peso corporal (Tabla 1). Considerando que la IL-2 tiene efecto sobre la maduración y activación de los linfocitos podemos inferir que esta citocina intervino en que los índices de proliferación (IP) hayan sido restablecidos en la respuesta inmune suprimida de los ratones con tumor, y que los bioproductos del caldo de cultivo sumergido del micelio tienen propiedades estimuladoras de la producción de la IL-2.



Por otro lado, el efecto del IFN $\gamma$  que estimula toda la maquinaria inmunológica en presencia de antígenos extraños, es estimulado por puro efecto del desarrollo del tumor y el concentrado de Ganoderma no tiene algún efecto directo, en cambio el TNF $\alpha$  se encontró disminuido en los ratones tratados con el concentrado de Ganoderma a diferencia de otros reportes donde esta citocina es estimulada en su producción (Berovič, *et al* 2003; Carrieri, *et al* 2017; Xu, *et al* 2011). Finalmente, podemos concluir que el concentrado del caldo del cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* tiene un efecto inmunoestimulador en el modelo de inmunosupresión del Linfoma Murino L5178Y, permitiendo a los ratones una sobrevivencia y una restitución de la respuesta inmune innata de tipo celular. Asimismo la respuesta antimicrobiana observada en los experimentos correspondientes, demuestran que los extractos acuosos del carpóforo y el pie de *G. sichuanense* contienen moléculas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas de una manera dosis-respuesta, en el experimento de diluciones seriadas (Fig. 1).

Dichas moléculas pueden ser orgánicas como las mencionadas en la introducción, pero también pueden ser péptidos pequeños con actividad antimicrobiana como consta en un reporte (Wang 2006) y en experimentos recién realizados en nuestro laboratorio. Lo anterior refuerza el concepto de que el género Ganoderma posee cualidades antimicrobianas naturales que pueden ser usadas como una alternativa frente a la resistencia bacteriana observada contra los antibióticos convencionales.

### Agradecimiento

Este trabajo se realizó con el apoyo del programa de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2015, de la Subsecretaría de Educación Superior, Dirección General de Educación Superior Universitaria de la SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA. MÉXICO. Y del apoyo de P3E de la Universidad de Guadalajara.

### Referencias

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2015). Cellular and Molecular Immunology, 8th ed. Saunders, Elsevier Inc. pp. 199-240.

Alokail, M.S., Al-Daghri, N.M., Mohammed, A.K., Vanhoutte, P. and Alenad, A. (2014). Increased TNF  $\alpha$ , IL-6 and ErbB2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from breast cancer patients. *Med Oncol.* 31(8),38. doi: 10.1007/s12032-014-0038-0.

Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B. and Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J Biotechnol.* (103), 77–86.

Carrieri, R., Manco, R., Sapio, D., Iannaccone, M., Fulgione, A., Papaiani, M., de Falco, B., Grauso, L., Tarantino, P., Ianniello, F., Lanzotti, V., Lahoz, E. and Capparelli, R. (2017). Structural data and immunomodulatory properties of a water-soluble heteroglycan extracted from the mycelium of an Italian isolate of *Ganoderma lucidum*. *Natural Product research.* doi.org/10.1080/14786419.2017.1278593.

Čilerdžić, J., Kosanić, M., Stajić, M., Vukojević, J. y Ranković B. (2016). Species of Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) Fermentation Broth: A Novel Antioxidant and Antimicrobial Agent. *International Journal of Medicinal Mushrooms,* 18(5), 397–404.

Dai, J., Miller, M. A., Everetts, N. J., Wang, X., Li, P., Li, Y., Xu, J-H. y Yao, G. (2017). Elimination of quiescent slow-cycling cells via reducing quiescence depth by natural compounds purified from *Ganoderma lucidum*. *Oncotarget,* 8(8), 13770-13781.

Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Karina Neumeyer, K. and McMeekin, T.A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* (23), 391-404.

Fernández, P. (1995) Análisis de Supervivencia. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo.A Coruña (España) *Cad Aten Primaria* 2: 130-135

Gerber, S.A., Sedlacek, A.L., Cron, K.R., Murphy, S.P., Frelinger, J.G. and Lord, E.M. (2013). IFN- $\gamma$  mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *Am J Pathol.* 182(6), 2345-54. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.041

Gill, B.S., Sharma, P., Raj Kumar, R. y Kumar, S. (2015). Misconstrued versatility of *Ganoderma lucidum*: a key player in multi-targeted cellular signaling. *Tumor Biol.* DOI 10.1007/s13277-015-4709-z.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further develop of precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal Immunol Methods.* (119), 203-210.

Kao, Ch.H.J, Jesuthasan, A.C., Bishop, K.S., Glucina, M.P. and Ferguson, L.R. (2013). Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*, 3(2), 48-65.

Kuo, M.C.H., Weng, CH.Y., Ha, CH.L. and Wu, M.J. (2006). *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF-B. *Journal of Ethnopharmacology* (103), 217-222.

Kwon, O.CH., Park, Y.J., Kim, H.I., Kong, W.S., Cho, J.H. y Lee, CH.S. (2016). Taxonomic Position and Species Identity of the Cultivated Yeongji *Ganoderma lucidum* in Korea. *Mycrobiology* 44(1): 1-6.  
dx.doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.1.1.

ISSN 2410-3551

ECORFAN® Todos los derechos reservados.

Li, W., Tian, Y.H., Liu, Y., Wang, Z., Tang, S., Zhang, J. and Wang, Y.P. (2016). Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis. *J Toxicol Sci.* 41(3), 417-28. doi: 10.2131/jts.41.417.

Li, Y.Q., Fang, L. and Zhang, K.C. (2007). Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym.* (68), 323-328.

Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W. and Gao, X.(2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int J Biol Macromol.* (46), 451-457.

Mossman, M. (1983). Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: aplication to proliferation and citotoxicity assays. *Journal Immunol Methods.* (65), 55 - 63.

Ni, C., Wu, P., Zhu, X., Ye, J., Zhang, Z., Chen, Z., Zhang, T., Zhang, T., Wang, K., Wu, D., Qiu, F. and Huang, J. (2013). IFN- $\gamma$  selectively exerts pro-apoptotic effects on tumor-initiating label-retaining colon cancer cells. *Cancer Lett.* 9:336(1):174-84. doi: 10.1016/j.canlet.2013.04.029.

Ofodile, L.N., Kokubum, N.U., Grayer, R.J., Ogundipe, O.T. and Simmonds, M.S. (2005) Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytother Res.* (19):310-313.

Ohri, C.M., Shikotra, A., Green, R.H., Waller, D.A. and Bradding, P. (2010). Tumour necrosis factor-alpha expression in tumour islets confers a survival advantage in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* (10), 323. doi: 10.1186/1471-2407-10-323.

- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 10;347 (15):1151-60
- Paterson, R.R.M. (2006). Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, (67), 1985–2001.
- Puebla-Pérez, A.M., Huacuja-Ruiz, L., Rodríguez-Orozco, G., Villaseñor-García, M.M., Miranda-Beltrán, M.L., Celis, A. and Sandoval-Ramírez, L. (1998). Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Research.* (12), 545-548
- Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol.* (192), 5451–5458
- Ruijun, W., Shi, W., Yijun X., Mengwuliji, T., Lijuan, Z, and Yumin, W. (2015). Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia*. *Int J Biol Macromol.* (72), 771-775 doi: 0.1016/j.ijbiomac.2014.09.026.
- Smina, T.P, Nitha, B., Devasagayam, T.P.A. and Janardhanan, K.K. (2017). *Ganoderma lucidum* total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals. *Mutation Research* (813), 45–51. Doi: org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.010.
- Soccol, C.R., Bissoqui, L.Y., Rodrigues, C., Rubel, R., Sella, S.R.B.R., Leifa, F., Porto de Souza Vandenberghe, L. y Soccol, V.T. (2016). Pharmacological Properties of Biocompounds from Spores of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes): A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(9), 757–767.
- Somintara, S., Leardkamolkarn, V., Suttiarporn, P., and Mahatheeranont, S. (2016). Anti-Tumor and Immune Enhancing Activities of Rice Bran Gramisterol on Acute Myelogenous Leukemia. *PLoS ONE* 11(1): e0146869. doi:10.1371/journal.
- Sridhar, S., Sivaprakasam, E., Balakuma,r R.and Kavitha, D.(2011). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts. *World J Sci Technol.* 1(6):8–11.
- Suárez-Arroyo, I.J., Loperena-Alvarez, Y., Rosario-Acevedo, R. y Martínez-Montemayor, M.M. (2017). *Ganoderma* spp.: A Promising Adjuvant Treatment for Breast Cancer. *Medicines*, (4)15. doi:10.3390/medicines4010015.
- Tang, Y.J. and Zhong, J.J.(2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb Tech.*(31,20–8
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D1087-1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
- Wang, H., & Ng, T. B. (2006). Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27(1), 27-30. doi:10.1016/j.peptides.2005.06.009
- Wang, X-C., Xi, R-J., Li, Y., Wang, D-M. and Yao, Y-J. (2012). The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. *PLoS ONE* 7(7): e40857. doi:10.1371/journal.pone.0040857.
- Welti, S., Moreau, P.A., Decock, C., Danel, C., Duhal, N., Favel, A. y Courtecuisse, R. (2015). Oxygenated lanostane-type triterpenes profiling in laccate *Ganoderma* chemotaxonomy. *Mycol Progress* (14):45. DOI 10.1007/s11557-015-1066-7.

Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., y Wang, Y. (2011). *Ganoderma lucidum* polysaccharides: Immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am. J. Chin. Med.*, (39), 15–27. doi: 10.1142/S0192415X11008610.

Yamaç, M. and Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharm Biol.* 44(9): 660–667.

Yue, Q.X., Song, X.Y., Ma, C., Feng, L.X., Guan, S.H., Wu, W.Y., Yang, M., Jiang, B.H., Liu, X., y Cui, Y.J. (2010). Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of Hela cells. *Phytomedicine*, (17), 606–613.

Zeng, R.Y., Xia Luo, X., Wei, W., Yu, M.Y., Rui-Tao He, R.H., Xiao-Ping Zhang, X.P. and Zheng, L.Y. (2009). Antioxidant properties and antioxidant components of extracts from mushroom *Ganoderma sinensis*. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7 (1): 75-82.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* (5), 263–274. doi:10.1038/nrc1586