



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Aislamiento, caracterización y evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica de los ácidos triterpenoides obtenidos en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. VIRIDIANA ASPRÓN MONCADA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha L. Macías Rubalcava

Instituto de Química, UNAM

Dr. Humberto García Arellano

División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM

Ciudad de México. ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PMDCB/917/2018

Asprón Moncada Viridiana
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 16 de abril del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Aislamiento, caracterización y evaluación in vitro de la actividad citotóxica de los ácidos triterpenoides obtenidos en cultivo sumergido en *Humphreya coffeata***", dirigida por el/la Dr(a). **Trujillo Roldán Mauricio Alberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Ayala Aceves Marcela
VOCAL	Aguilar Laurent María Isabel
VOCAL	Olvera Carranza Clarita
VOCAL	Carrero Sánchez Julio César
SECRETARIO	Quirasco Baruch Maricarmen

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 16 de abril de 2018.
COORDINADORA


Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con una beca de dos años para la realización del proyecto. No. de becario 699232.

Se contó con apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir al Congreso XXXI de la Sociedad Mexicana de Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 y presentar los avances del trabajo.

Finalmente, se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Problemas Nacionales 247473, CONACyT INNOVAPYME: 230042, PAPPIT-UNAM IN209113, IN 210013.

Agradecimientos personales

A los doctores Mauricio y Adriana, por ayudarme y apoyarme siempre.

A Monserrat García por tenerme mucha paciencia con todas las preguntas que le hice.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Martha y el Dr. Humberto, por las correcciones y la ayuda que me dieron.

A las personas en el laboratorio que me ayudaron siempre y me recordaron que hay que seguir adelante a pesar de todo: Ramsés y Ramsés, Gerardo, Giroshi, Sara, Greta, Daniel, Diego, y Lorena.

A mi familia por estar siempre: mis padres, Jorge y Lais, que los quiero tanto. Paco y Ale, por aguantarme en la casa todos los días y darme empujoncitos. Valeria y Daniela, porque siempre que las veo soy muy feliz.

A los amigos de siempre: Marina, Lauralicia, Liz Paola, Michelle, Paulette, Kevin, y Laura, que aunque los veo cada tres milenios, siempre es como si no hubiera pasado el tiempo.

A los amigos que viven lejos, que aunque no hablen español, son importantísimos para mí: Sum, Miles, Kaahlan, Liz, Jaclyn, Raj, Toren, Rubi, Amy, Fire, Sam, Asy, Jer, Zack, Sarah, Raxa, Condor, Canderson, Sniper, Elie, Shifter, y Cyc. Personas más generosas que ellos no hay, tengo mucha suerte de conocerlos.

A mis padres.
A mis hermanos.
Otra vez, ya sé.

*"We shall not cease from exploration,
and the end of all our exploring
will be to arrive where we started
and know the place for the first time."*

-T. S. Eliot

Contenido

1. Resumen.....	9
2. Antecedentes.....	12
2.1 Introducción.....	12
2.2 <i>Humphreya coffeata</i>	14
2.3 Cultivo sumergido de hongos.....	16
2.4 Ácidos triterpenoides.....	18
2.4.1 Ácidos ganodéricos.....	19
2.4.2 Ácidos lucidénicos.....	20
2.4.3 Otros ácidos triterpenoides.....	21
2.4.4 Biosíntesis de ácidos triterpenoides.....	21
2.4.5 Mecanismo de acción sobre células cancerígenas.....	23
2.4.5.1 Citotoxicidad y apoptosis.....	23
2.4.5.2 Arresto del ciclo celular.....	25
2.4.5.3 Efecto anti-invasivo.....	27
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos.....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6. Estrategia experimental.....	32
7. Metodologías.....	33
7.1 Cepa <i>H. coffeata</i>	33
7.2 Cinéticas de crecimiento de <i>H. coffeata</i>	33
7.3 Cuantificación de triterpenoides totales.....	35
7.4 Extracción y cuantificación de ácidos triterpenoides.....	35
7.5 Prueba de identidad de ácidos triterpenoides en TLC.....	36

7.6 Purificación de ácidos triterpenoides por TLC.....	36
7.7 Evaluación de actividad citotóxica.....	37
7.7.1 Uso de líneas celulares de leucemia.....	37
7.7.2 Ensayo de reducción de resazurina.....	38
7.7.2.1 Ensayo de citotoxicidad con extractos totales de ácidos triterpenoides.....	39
7.7.2.2 Ensayo de citotoxicidad con fracciones de los extractos de ácidos triterpenoides.....	40
7.7.2.3 Extracción de MSP.....	41
7.7.2.4 Ensayo de citotoxicidad con MSP.....	42
8. Resultados y discusión.....	44
8.1 Morfología de <i>H. coffeata</i>	44
8.2 Cinéticas de crecimiento de <i>H. coffeata</i>	45
8.2.1 Parámetros cinéticos.....	45
8.2.2 Evaluación de biomasa y pH de <i>H. coffeata</i>	47
8.2.3 Evaluación de consumo de sustrato y crecimiento exponencial de biomasa de <i>H. coffeata</i>	47
8.2.4 Evaluación de producción de triterpenoides de <i>H. coffeata</i>	52
8.2.4.1 Evaluación de producción de triterpenoides totales en sobrenadante.....	52
8.2.4.2 Extracción y cuantificación de ácidos triterpenoides....	54
8.3 Prueba de identidad de ácidos triterpenoides en TLC.....	56
8.4 Evaluación de actividad citotóxica.....	60
8.4.1 Evaluación de citotoxicidad de extractos totales.....	60
8.4.2 Evaluación de citotoxicidad con fracciones del extracto de glucosa.....	63
8.4.3 Evaluación de citotoxicidad con fracciones del extracto de lactosa.....	68
8.4.4 Evaluación de citotoxicidad con fracciones 1 y 3 del extracto de glucosa con MSP.....	74

9. Conclusiones.....	76
10. Perspectivas.....	77
11. Referencias.....	78
12. Anexos.....	91
12.1 Curva patrón de glucosa.....	91
12.2 Curva patrón de lactosa.....	92
12.3 Curva patrón de ácido ursólico.....	93
12.4 Cálculo de parámetros cinéticos.....	94
12.5 Cálculo de Rf.....	95
12.6 Ensayo de viabilidad celular.....	96
12.7 Cálculo de CC ₅₀	98
12.8 Análisis estadísticos.....	99
12.8.1 Análisis estadístico para obtener diferencias entre bandas de placas TLC.....	99
12.8.2 Ejemplo de análisis estadístico para calcular citotoxicidad celular.....	101
12.8.3 Ejemplo de análisis estadístico para obtener la regresión lineal para el cálculo de CC ₅₀	102
12.8.4 Ejemplo de análisis estadístico para comparar las CC ₅₀ entre diferentes tratamientos.....	102

1. Resumen

Se ha demostrado que el sobrenadante del cultivo sumergido del hongo basidiomiceto *Humphreya coffeata* (Porras-Arboleda, 2007), presenta actividad antitumoral y antioxidante. Este hongo tiene potencial para producir productos farmacéuticos de origen natural que puedan ser utilizados como una terapia para el tratamiento de cáncer más segura que los medicamentos que se utilizan actualmente.

Como se hace con otros hongos *Polyporales*, como los que comprenden el género *Ganoderma* y específicamente *G. lucidum*, se extraen metabolitos del sobrenadante y del cuerpo fructífero de los hongos en cultivo sumergido para evaluarlos. Entre los metabolitos presentes en el sobrenadante de estos hongos se ha encontrado que los ácidos triterpenoides y los exopolisacáridos (EPS) son los metabolitos responsables de la actividad antitumoral, siendo los ácidos triterpenoides los responsables de la apoptosis celular y los EPS responsables de una respuesta inmunomodulatoria (García-García, 2014).

Para el caso de *H. coffeata*, los EPS ya han sido estudiados y se determinó que tienen una actividad antitumoral sobre la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 al utilizar una concentración de 9.5 µg/mL de su liofilizado (García-García, 2014). Sin embargo, no se ha estudiado la producción de los ácidos triterpenoides ni el efecto antitumoral que puedan presentar, así como el efecto de diferentes geometrías de matraces en la producción de ellos en un cultivo sumergido. Debido a esto es importante conocer cuáles son las condiciones de cultivo sumergido adecuadas para la producción de estos ácidos por *H. coffeata* que permitan caracterizar la producción de los mismos y su actividad antitumoral.

En este trabajo se realizaron las cinéticas de crecimiento de *H. coffeata* y se observó que el cultivo donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa fue en el realizado con lactosa en matraces bafleados (21.2 g/L), la menor velocidad específica de crecimiento (0.47 ± 0.02 días⁻¹) y el mayor tiempo de duplicación (1.46 ± 0.04 días),

así como el mayor rendimiento de biomasa/sustrato (425.0 mg_x/g_s). Sin embargo, el mayor rendimiento ácidos triterpenoides/biomasa tanto para micelio como sobrenadante se encontró en la cinética con glucosa en matraces convencionales (1 335.2 µg_p/g_x y 19 093.0 µg_p/g_x, respectivamente).

Se identificaron los ácidos triterpenoides en cada uno de los extractos a través de placas de TLC (Thin Layer Chromatography; Cromatografía en Capa Fina) y se encontraron 3 familias de ellos en los extractos con glucosa y en el extracto con lactosa en matraces bafleados, mientras que en el extracto con lactosa en matraces convencionales se encontraron 4 familias de ácidos triterpenoides. Estas familias de ácidos triterpenoides no se lograron separar en cada uno de sus componentes, por lo que cada una de ellas se evaluó en conjunto.

A las familias de ácidos triterpenoides se les evaluó la citotoxicidad, encontrando que el extracto del cultivo con glucosa y cada una de sus fracciones de ácidos tienen una citotoxicidad mayor que el extracto del cultivo con lactosa y cada una de sus fracciones de ácidos, donde las fracciones 1 y 3 del extracto con glucosa tienen la mayor concentración inhibitoria media siendo de 27.9 ± 4.4 µg/mL y 40.8 ± 3.8 µg/mL respectivamente.

Se realizaron ensayos con monocitos de sangre periférica (MSP) para comparar el efecto de los ácidos triterpenoides sobre células sanas contra el efecto sobre líneas celulares de leucemia, y se observó que para tener una citotoxicidad similar a la obtenida con las líneas celulares de leucemia se necesita una concentración mayor a 100 veces de las fracciones 1 y 3 extracto de glucosa, donde se alcanza una citotoxicidad estadísticamente significativa del $9\% \pm 1\%$, y del $7\% \pm 2\%$, respectivamente.

Se recomienda realizar la purificación de cada una de las fracciones encontradas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) utilizando diferentes mezclas de disolventes formando la fase

móvil para tratar de separar cada una de las moléculas en cada familia de ácidos y poder identificarlas para determinar las moléculas que componen las fracciones 1 y 3 del extracto de glucosa, que podrían considerarse como una alternativa para fármacos de uso para el tratamiento de leucemia de tipo mieloide.

2. Antecedentes

2.1 Introducción

En la industria farmacéutica y alimentaria, los microorganismos se aprovechan cada vez más para la producción de metabolitos bioactivos y enzimas con actividades diversas y que se generan a gran escala para formular productos que beneficien a la sociedad (Chang and Buswell, 1996; Wasser, 2002). Entre los microorganismos que se utilizan para la producción de sustancias con actividades farmacológicas se encuentran los hongos basidiomicetos. Las características morfológicas de los hongos basidiomicetos son la presencia de hifas septadas, un cuerpo fructífero visible y carencia de células móviles. Su pared celular está constituida de quitina, glucanos, mananos y hemicelulosa (Blackwell, 2011).

En el mercado actual, la necesidad de extractos para encontrar nuevos fármacos aumenta constantemente. Sin embargo, en estos extractos no se ha logrado determinar cuál de todos sus componentes es el que posee una actividad farmacológica. El continuo uso de diferentes hongos junto con medicamentos requiere que se investiguen las sustancias presentes para establecer el o los compuestos responsables de sus actividades farmacológicas, determinar una dosis segura y un control de calidad para las personas que lo utilicen (Bishop, *et. al.* 2015).

Entre los basidiomicetos con compuestos que presentan actividad antitumoral se han descrito: *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa*, y *Ganoderma lucidum* (Baby, *et. al.* 2015), donde los extractos obtenidos a partir de estos hongos tienen una importante actividad antitumoral en diferentes líneas celulares cancerígenas (Srisurichana, *et. al.* 2017; Huang, *et. al.* 2017). Los tipos de cáncer en los que se ha encontrado esta actividad son sarcoma, adenocarcinoma de mama, leucemia, entre otros tipos de tumores (Wasser, 2002; Tohtahon, *et. al.* 2017). Aunque la actividad antitumoral está reportada para ellos, no se ha podido utilizar en el desarrollo de fármacos seguros aprobados por la FDA, ya que al realizar ensayos de citotoxicidad se observa que los extractos de estos hongos afectan también a células sanas (Baby, *et. al.* 2015).

G. lucidum, la especie más estudiada de estos hongos, es un basidiomiceto que originario de Asia. En Japón se le conoce como Reishi, mientras que en China se le conoce como Lingzhi y emplea con fines medicinales para diferentes enfermedades desde hace más de 2000 años (Paterson, 2006; Wang, *et. al.* 2012). Actualmente, una gran parte de la población asiática lo utiliza coadministrado con quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer, así como para lidiar con los efectos secundarios de los medicamentos (Gordan, *et. al.* 2011). Su uso se ha popularizado por los efectos antihipertensivo, controlador de diabetes y estimulador de probióticos (Blackwell, 2011; Baby, *et. al.* 2015). En las últimas décadas, se ha observado que *G. lucidum* tiene una gran variedad de sustancias químicas en las que se incluyen triterpenoides, polisacáridos, nucleósidos, esteroides, ácidos grasos, alcaloides, proteínas, péptidos, y elementos inorgánicos (Baby, *et. al.* 2015). Se ha reportado que los triterpenoides en *G. lucidum* eliminan el crecimiento y el comportamiento invasivo de las células cancerígenas (Wang, *et. al.* 2015; Huang, *et. al.* 2017), mientras que los polisacáridos estimulan el sistema inmunológico (Zhu, *et. al.* 2012) que resulta en la producción de citocinas y la activación de la respuesta antitumoral del sistema inmunológico (Silva, 2006; Wang, *et. al.* 2012).

En los ensayos realizados con *G. lucidum* para evaluar la citotoxicidad de los metabolitos extraídos, se utiliza el cuerpo fructífero. Sin embargo, se ha reportado que también se pueden extraer algunos metabolitos de las esporas y cultivos de hongos realizados en un cultivo sumergido (Paterson, 2006). Los triterpenoides aislados a partir de ellos se componen principalmente de ácidos ganodéricos y ácidos lucidénicos encontrados por primera vez en el hongo *G. lucidum*. Ambas familias de triterpenoides han sido investigadas para determinar sus actividades biológicas y su potencial como fármacos (Hsu and Yen 2014).

En este trabajo, el hongo que se utilizó, *Humphreya coffeata*, es taxonómicamente parecido a *G. lucidum* (Porrás-Arboleda, 2007). Sin embargo, hay pocos reportes publicados, por lo que *G. lucidum* se utiliza como modelo de trabajo para la producción de ácidos triterpenoides.

2.2 *Humphreya coffeata*

Recientemente, se ha empezado a estudiar el hongo *H. coffeata* (Figura 1), cuya caracterización ya se ha llevado a cabo (Porras-Arboleda, 2007) y es la siguiente: Reino Fungi, Phylum Basidiomycota, Clase Homobasidiomycetes, Orden *Polyporales*, Familia Ganodermataceae, Género *Humphreya*, Especie *coffeata*.



Figura 1. *Humphreya coffeata* (Porras-Arboleda, 2007).

En el estudio de Porras-Arboleda, *et. al.* (2009) se determinó que el liofilizado del sobrenadante de cultivos sumergidos de este hongo tiene una actividad citotóxica del 60% sobre la línea celular de leucemia Jurkat al usar 250 µg/mL del extracto liofilizado. Al realizar el mismo experimento sobre células sanas HaCaT (queratinocitos) no se reportó actividad citotóxica en la misma concentración (250 µg/mL), sino hasta usar concentraciones del extracto entre 12 000 a 50 000 µg/mL. En células HeLa e InBl (cáncer cervicouterino) se observó proliferación celular a 250 µg/mL. Al ser el extracto total, en este ensayo no se pudo determinar si esta actividad pertenece a los polisacáridos, proteínas extracelulares o a los ácidos ganodéricos producidos por este hongo.

Los ensayos realizados en este estudio fueron los primeros reportes para determinar la cinética de crecimiento de este hongo, en el que se adaptó una cepa silvestre a un modelo de crecimiento en el laboratorio, así como el medio óptimo para su desarrollo con los mejores resultados obtenidos utilizando 50 g/L de lactosa en el medio (8.7 ± 0.5 g/L de biomasa en 20 días) y la mejor producción de exopolisacáridos (6.0 ± 0.6 g/L), en comparación con 20 g/L o 35 g/L de lactosa en el medio, donde se observaron 6.7 ± 0.2 g/L y 6.6 ± 0.4 g/L en la cantidad de

biomasa a los 20 días, respectivamente, y 1.7 ± 0.4 g/L y 1.1 ± 0.1 g/L en producción de exopolisacáridos, respectivamente (Porras-Arboleda, *et. al.* 2009). Con estos resultados se planteó la posibilidad de que los extractos de *H. coffeata* sean investigados con mayor profundidad para conocer el efecto antitumoral es causado por los polisacáridos, los ácidos orgánicos, las proteínas o una combinación de estas sustancias para que puedan ser aprovechadas como terapia alternativa en el tratamiento de cáncer (Porras-Arboleda, *et. al.* 2009).

Posteriormente, se realizó otro estudio con *H. coffeata* (García-García, 2014) en el que se evaluó la influencia de la geometría de los matraces, así como la producción de exopolisacáridos, su aislamiento y su evaluación de actividad citotóxica. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que hay una mejor producción en biomasa y exopolisacáridos (EPS) al utilizar matraces convencionales sin resorte (3.94 ± 0.22 g/L de biomasa y 0.80 ± 0.14 g/L de EPS) y matraces bafleados (3.52 ± 0.07 g/L de biomasa y 0.60 ± 0.04 g/L de EPS), (bafles de 2.5 x 2.0 x 4.5 cm), mientras que al usar matraces convencionales con resortes (1.5 cm de diámetro colocados en el fondo del matraz) se obtuvo la menor cantidad de exopolisacáridos (3.92 ± 0.12 g/L de biomasa y 0.50 ± 0.04 g/L de EPS).

De igual manera, se observó una diferencia en la morfología del hongo al variar la geometría de los matraces. En ambos cultivos se observó la formación de aglomerados que sólo variaron en el tamaño (1-3 cm de diámetro en matraces convencionales, y 1-5 mm de diámetro en matraces bafleados). De igual manera se realizaron ensayos variando el tipo de inóculo (cultivo en medio sólido en forma de disco de 0.5 mm, o cultivo en medio líquido) y la fuente de carbono (glucosa o lactosa). La mayor cantidad de biomasa y la mayor producción de EPS fueron observados al utilizar el medio con fuente de carbono lactosa, con inoculación de medio líquido, para matraz bafleado (11.40 ± 0.07 g/L, y 4.50 ± 0.20 g/L, respectivamente) (García-García, 2014). Finalmente, en el mismo estudio se evaluó la citotoxicidad de los exopolisacáridos obtenidos y se encontró una inhibición de $82.0 \pm 5.3\%$ en el crecimiento de células K562 (leucemia mieloide crónica) cuando

se utilizaron concentraciones de 500 a 2 500 $\mu\text{g/mL}$ de los exopolisacáridos liofilizados (García-García, 2014).

2.3 Cultivo sumergido de hongos

En diversos estudios relacionados al cultivo de hongos basidiomicetos la extracción de compuestos con actividad farmacológica se llevan a cabo (en su mayoría) partiendo de cuerpos fructíferos (Zhou, *et. al.* 2012; Elisashvili, 2012; Fang and Zhong, 2002). Este tipo de cultivos pueden tardar de 3 a 5 meses en crecer, por lo que es necesaria una alternativa para que el crecimiento y la obtención de metabolitos secundarios sea más rápida y de menor costo. Por esta razón se utiliza el cultivo sumergido, que puede llevarse a cabo en un par de meses o incluso días para observar el crecimiento de un hongo bajo condiciones controladas. El objetivo de este método es generar un cultivo en un medio que mejore el metabolismo respiratorio de los hongos miceliares y que permita observar los efectos del estrés ocasionado durante el desarrollo del hongo, así como su efecto sobre la producción de metabolitos secundarios (Wagner, *et. al.* 2004, Zhou, *et. al.* 2012).

La mayoría de los basidiomicetos que crecen en un cultivo sumergido presentan dos tipos de morfologías: pellets y filamentos libres. Estas formas de crecimiento están determinadas por diferentes factores físicos como la temperatura, agitación, aireación, diseño de matraz y de biorreactor pueden afectar las condiciones de cultivo (Fazenda, *et. al.* 2008; Elisashvili, 2012). Las diferentes formas morfológicas pueden ocasionar variaciones en la reología de un cultivo y por lo tanto afectar la producción de metabolitos (Amanullah, *et. al.* 2000; Cho, *et. al.* 2002).

La fuente de carbono que un microorganismo tenga disponible es un elemento de gran importancia, ya que es el mayor componente nutritivo del medio de cultivo y asegura el crecimiento de los microorganismos y la producción de metabolitos de interés (Elisashvili, 2012). Dada la importancia de este elemento, se han evaluado diferentes usos de hongos miceliares con diferentes fuentes de carbono para ver cómo esto afecta la velocidad de crecimiento del hongo, así como su morfología

(Johansen, *et. al.* 1998; Domingues, *et. al.* 2000). Algunas de las fuentes de carbono que son utilizadas en los medios de cultivo para hongos son las que incluyen glucosa, sacarosa y maltosa (Elisashvili, *et. al.* 2009; Fazenda, *et. al.* 2008). La glucosa se ha reportado como la mejor fuente de carbono para la producción de EPS. Se ha reportado que la producción de EPS es mejorada cuando se utilizan disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa, etc.) (Elisashvili, *et. al.* 2009). Para el caso de *H. coffeatta* se sabe que la mejor fuente de carbono es lactosa (Porrás-Arboleda, *et. al.* 2009).

La velocidad de agitación y la aireación durante los cultivos son de suma importancia para la producción de metabolitos secundarios y el control en el crecimiento de agregados miceliales en hongos como *C. militaris* y *G. lucidum* (Yang and Liao, 1998; Park, *et. al.* 2002). Este fenómeno pudiese ser causado por el estrés hidrodinámico que sufre el microorganismo. Los matraces bafleados o los biorreactores con turbinas someten al micelio a ruptura constante por el impacto que sufre al chocar contra las paredes (Park, *et. al.* 2002). La agitación y aireación también contribuyen a la producción de biomasa y metabolitos de interés en el cultivo, debido a que contribuyen a la transferencia de masa, sustrato, productos y oxígeno. Una óptima agitación representa un balance entre la transferencia de oxígeno en el medio y el estrés por corte, los cuales se ven afectados cuando se incrementa la agitación (Elisashvili, 2012).

Otro de los factores que puede estar contribuyendo a una mejor producción de triterpenoides en cultivos es la fuente de nitrógeno, debido a que la fuente de nitrógeno (nitrito, nitrato, sales de amonio, peptona, extracto de levadura) juega un importante rol en la sobreproducción de metabolitos fúngicos (Fazenda, *et. al.* 2008). El nitrógeno es un factor crítico en la síntesis de algunas enzimas fúngicas involucradas en el metabolismo primario y secundario (Elisashvili, 2012). En algunos reportes es señalado que fuentes orgánicas de nitrógeno incrementan los rendimientos de biomasa en cultivos sumergidos de *G. lucidum* (Fang and Zhong, 2002) y *Tremella mensenterica* donde se observó que diferentes tipos y

concentraciones de fuentes de nitrógeno influyen el crecimiento celular y la producción de polisacáridos (Elisashvili, 2012). Por lo tanto es importante señalar que la concentración de nitrógeno en el medio puede afectar la producción de biomasa y de diferentes metabolitos, resultado de diversos mecanismos metabólicos.

2.4 Ácidos triterpenoides

Al no haber reportes sobre los triterpenoides de *H. coffeata* y su actividad citotóxica, se decidió realizar este estudio para determinar si la citotoxicidad de los extractos totales ya evaluados pertenecen a estas moléculas, tomando como referencia los ácidos triterpenoides de *G. lucidum*.

Diferentes estudios fitoquímicos han logrado aislar 431 metabolitos del género *Ganoderma* (Baby, *et. al.* 2015). La mayoría de los compuestos aislados son del tipo triterpenoide, entre los que se encuentran los ácidos ganodéricos, ácidos lucidénicos, meroterpenoides y esteroides y sus derivados (Hill and Connolly, 2013; You, *et. al.* 2013). Cada vez se adicionan más moléculas a la lista de estos compuestos con actividad farmacológica producidos por los hongos de este género. Sin embargo, la mayoría de los hongos que no componen este género no son estudiados para saber si hay una producción de moléculas triterpenoides similares, y que además puedan presentar actividades farmacológicas similares (Ríos *et. al.* 2012; You, *et. al.* 2013).

La caracterización de los perfiles de estos compuestos extraídos se ha realizado utilizando HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) acoplado a MS (espectrometría de masas) o a NMR (resonancia magnética nuclear) (Paterson, 2006). La mayoría de los ácidos triterpenoides encontrados son estructuras con 30 carbonos (ácidos ganodéricos) o con 27 carbonos (ácidos lucidénicos). Cada uno de estos grupos presentan un patrón específico de dobles enlaces y sustituciones con grupos funcionales oxigenados a lo largo de los cuatro anillos del esqueleto y la cadena lateral (Fatmawati, *et. al.* 2010).

2.4.1 Ácidos ganodéricos

Los ácidos ganodéricos (Figura 2) son triterpenoides de tipo lanostanos con 30 carbonos y altamente oxigenados en sus sustituyentes (Baby, *et. al.* 2015). Son moléculas bioactivas extraídas principalmente de los hongos pertenecientes al género *Ganoderma* (Baby, *et. al.* 2015). Estas moléculas se comenzaron a caracterizar desde 1982 (Kubota, *et. al.* 1982) y, hasta la fecha, se han reportado más de 170 ácidos ganodéricos con diversas actividades farmacológicas (Baby, *et. al.* 2015). Estas son tan diversas como hepatoprotector, antiviral para HIV, antioxidante, hipocolesterolémico, sedativo, inhibidor de liberación de histamina y anticancerígeno (El-Mekkawy, *et. al.* 1998; Wu, *et. al.* 2001). Como mecanismo de acción de los ácidos ganodéricos con respecto a su actividad antitumoral se ha encontrado que inhiben proteínas oncodependientes causantes de transformación celular (Lee, *et. al.* 1998).

Para la extracción de estos ácidos se utilizan tanto los micelios como el cuerpo fructífero de los hongos. La primer extracción en cultivo sumergido se llevó a cabo a nivel matraz utilizando etanol como acarreador de los ácidos ganodéricos y otros triterpenoides presentes a una agitación moderada y a temperatura ambiente (Zhong and Tang, 2004).

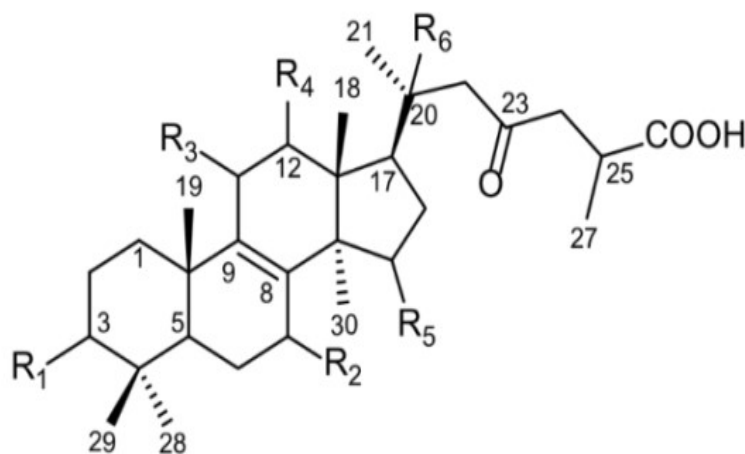


Figura 2. Estructura general de los ácidos ganodéricos. R_x es =O, -OH, -COH, -COOH, $-(CH_3)_n-OH$, $-(CH_3)_n-COOH$, $-(CH_3)_n=O$ (Baby, *et. al.* 2015).

La separación y caracterización de estos ácidos se ha realizado utilizando cromatografía HPLC acoplada a MS, (Gao, *et. al.* 2004), asimismo se utiliza NMR para determinar sus estructuras químicas, grupos funcionales, peso molecular y evaluar si se ha encontrado una nueva estructura de ácido ganodérico (Naumoska and Vovk, 2015; Da, *et. al.* 2015).

Zhang, *et. al.* (2014) evaluaron el efecto de varios realzadores sobre la producción de ácidos ganodéricos de *G. lucidum* y se observó que el uso de metales iónicos Ca^{2+} y Zn^{2+} resultan en un incremento de la producción de los ácidos en un $10.3 \pm 0.5\%$, así como la adición de celulasa ($13.6 \pm 0.7\%$). Esto se debe a que los iones metálicos, tales como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ o K^+ , aumentan la producción de metabolitos secundarios por la regulación de canales iónicos y la transducción de señales, mientras que la celulasa puede activar vías de señalización para la producción de metabolitos secundarios, aumentando la producción de los ácidos ganodéricos (Zhang, *et. al.* 2014).

2.4.2 Ácidos lucidénicos

Los ácidos lucidénicos (Figura 3) son triterpenoides de tipo lanostanos con 27 carbonos y altamente oxigenados en sus sustituyentes (Baby, *et. al.* 2015). Estos ácidos han sido menos estudiados que los ácidos ganodéricos. Sin embargo, se ha observado que son moléculas con actividades de antiinflamatorio, antiviral y antitumoral. Estas moléculas se extraen principalmente de los hongos que componen al género *Ganoderma* (Weng, *et. al.* 2008).

Como mecanismo de acción de los ácidos lucidénicos con respecto a su actividad antitumoral se ha encontrado que inhiben cascadas de transducción de señales en vías mediadas por mitocondrias, disminuyen los niveles de expresión de MMP (metaloproteinasas M) y del factor transcripcional NF-kB (Hsu *et. al.* 2008).

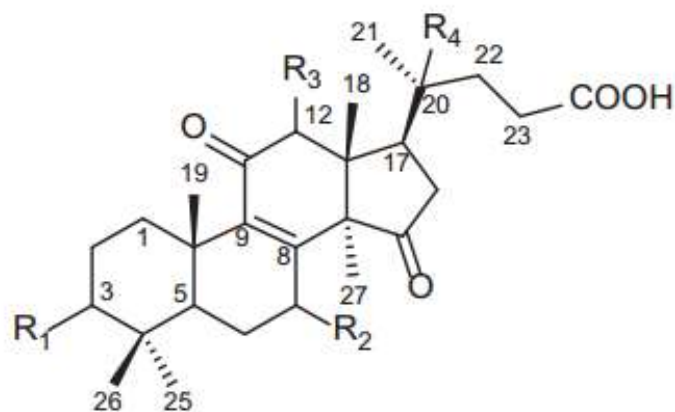


Figura 3. Estructura general de los ácidos lucidénicos. R_x es =O, -OH, -COH, -COOH, $-(CH_3)_n-OH$, $-(CH_3)_n-COOH$, $-(CH_3)_n=O$ (Baby, *et. al.* 2015).

2.4.3 Otros ácidos triterpenoides

Los meroterpenoides y los esteroides son productos biosintetizados por el género *Ganoderma* en una menor cantidad en comparación a los ácidos ganodéricos y lucidénicos. Entre los derivados de los esteroides que se han aislado de *Ganoderma* se encuentran el ergosterol, ganodermanontriol, ácidos ganolucídicos, entre otros (Peng, *et. al.* 2014; Ko, *et. al.* 2008; Ziegenbein, *et. al.* 2006).

2.4.4 Biosíntesis de ácidos triterpenoides

Se sabe que la biosíntesis de los ácidos ganodéricos sigue la ruta mevalonato, donde se modula la transcripción de los genes que codifican para las enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGR), escualeno sintasa (SQS), lanosterol sintasa (LS), donde el metil jasmonato es un modulador positivo de la ruta (MeJA) (Figura 4) (Shi, *et. al.* 2010; Ren, *et. al.* 2010). HMGR cataliza el primer paso de la ruta del mevalonato en la biosíntesis de los triterpenoides, por lo que es una enzima clave para la producción de ácidos ganodéricos (Lichtenthaler, *et. al.* 1997). Un alto nivel de esta enzima actúa como regulador positivo de la vía lo que potencia la producción de ácidos ganodéricos en *G. lucidum* (Xu, *et. al.* 2012; Ren, *et. al.* 2013a).

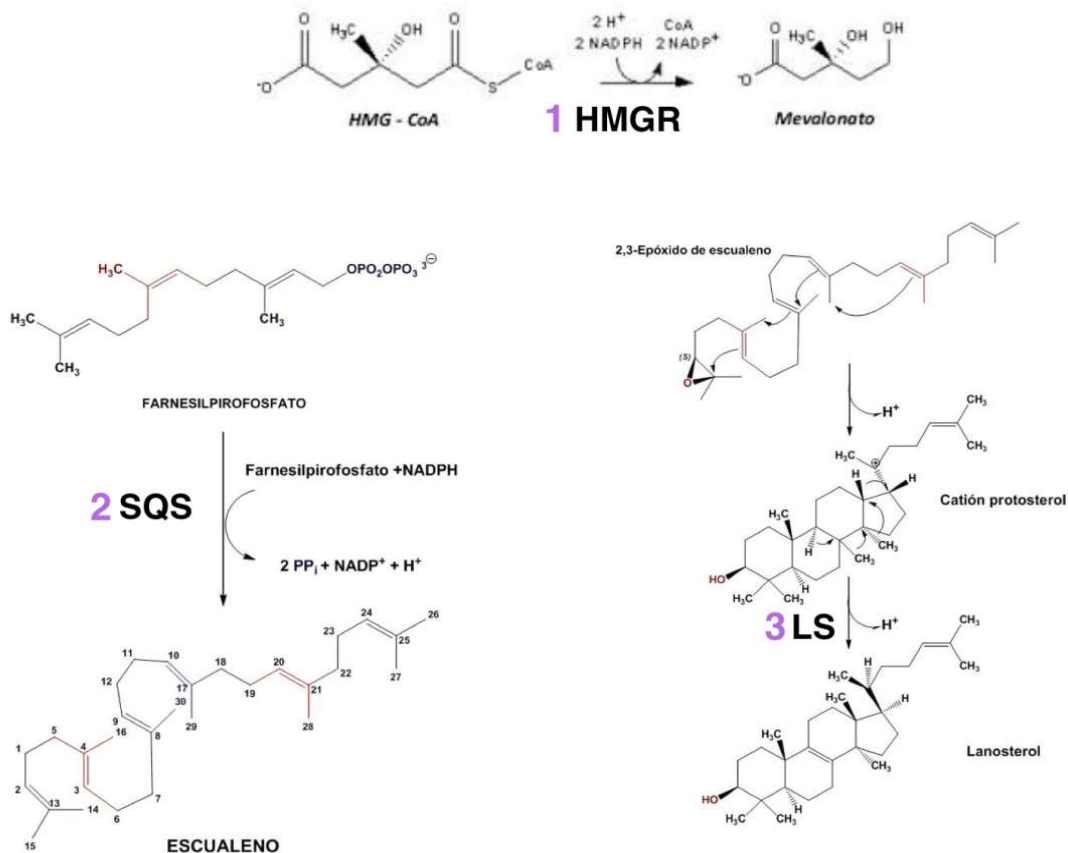


Figura 4. Reacciones catalizadas por las enzimas involucradas en la síntesis de los ácidos triterpenoides (López-Tricas, 2012).

La enzima SQS se ha propuesto como una enzima relacionada con el segundo paso en la vía del mevalonato que sintetiza los esteroides y triterpenoides (Abe, *et. al.* 1993). Se ha observado que la sobreexpresión del factor de transcripción de SQS resulta en un aumento en la producción de ácidos ganodéricos en cultivos sumergidos estáticos de *G. lucidum* (Xu, *et. al.* 2010a). LS cataliza la formación de lanosterol, mientras que MeJA está involucrado en la modulación de los genes HMGR, SQS y LS (Ren, *et. al.* 2013b). La última fase de la biosíntesis de los ácidos ganodéricos para la formación del lanosterol incluye diferentes pasos de oxidorreducción, hidroxilación y acetilación (Xu, *et. al.* 2010b).

Se ha observado que el fenobartibal y la modulación de la cascada de señales de apoptosis potencian la biosíntesis de ácidos ganodéricos por la fosforilación de la enzima Hog-1 cinasa (H1K) (You, *et. al.* 2013), así como una alta concentración de

oxígeno estimula la producción de H₂O₂ en *G. lucidum*. La acumulación de peróxido en el medio estimula la transcripción de los genes HMGR, SQS y LS (Zhang, *et. al.* 2010).

2.4.5 Mecanismo de acción sobre células cancerígenas

2.4.5.1 Citotoxicidad y apoptosis

Para los triterpenoides aislados de las especies *Ganoderma* se ha reportado una inhibición del crecimiento de tumores, apoptosis inducida, arresto del ciclo celular y autofagia (Lin, *et. al.* 2013; Min, *et. al.* 2000; Yang, 2005; Thyagarajan, *et. al.* 2010).

Se ha reportado que los ácidos ganodéricos A y H inhiben el crecimiento de células MDA-MB-231 (cáncer de mama) (Jiang, *et. al.* 2008). También se han observado efectos para los ácidos ganodéricos A, B, C y N en células HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), HepG2 (hepatoblastoma humano), y HCT-166, COLO205 y HT-29 (carcinoma colorrectal humano) por un ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) a formazán (Tabla 1). Estos ácidos tienen un fuerte efecto inhibitorio en estas líneas celulares aunque afectan la proliferación celular de linfocitos de sangre periférica normales (Gao, *et. al.* 2002). En este mismo estudio se observó que la concentración citotóxica de la mitad de la población celular (CC₅₀) para los ácidos B y C con la línea celular HL-60 fue de 9.8 µg/µL y 12.9 µg/µL, es decir, se requiere una concentración muy baja de ellos para observar un efecto.

En células HL-60 se observó mediante un ensayo de MTT, que los ácidos lucidénicos A, B, C, y N, inducen muerte celular cuando se adicionan al medio de crecimiento de un cultivo de estas células. Los valores de CC₅₀ en los que se observa muerte celular fueron 61.0 µM ± 5.5 µM para el ácido lucidénico A, 19.3 µM ± 1.4 µM para el ácido B, 45.0 µM ± 2.1 µM para el ácido C, y 64.5 µM ± 1.7 µM para el ácido N (Tabla 2) (Hsu, *et. al.* 2008). También se ha observado que estos ácidos lucidénicos no tienen un efecto citotóxico sobre linfocitos periféricos sanos (Johnstone, *et. al.* 2002).

Tabla 1. Tipos de ácidos ganodéricos para los que se ha reportado un efecto sobre una línea celular de leucemia, con el tiempo de incubación y la concentración inhibitoria de los mismos.

Ác gan	Incubación (h)	Tipo de leucemia	CC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µg/mL)	Mecanismo	Referencia
A	96	HL-60 Leucemia mieloblástica aguda	26	13.4	Inhibición MMP-2 y 9	Müller, <i>et. al.</i> 2006
		U937 Linfoma histiocítico difuso	63	32.5		
		K562 Leucemia mieloide eritroide crónica	50	25.8		
		Blin-1 Leucemia linfoblástica aguda	38	19.3		
		Nalm-6 Leucemia linfoblástica no-T, no-B	30	15.5		
B	72	HL-60 Leucemia mieloblástica aguda	61	31.5	-	Wu, <i>et. al.</i> 2001
C			19	9.8		
N			28	12.9		
N			62	32.9		
X	24		22	10.4	Arresto ciclo celular subG1	Li, <i>et. al.</i> 2005

El estudio de la morfología de células tratadas por 24 horas con ácido lucidénico B a una concentración 50 µM reveló la presencia de cuerpos apoptóticos al teñirlas con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; marcador nuclear) (Figura 5) (Hsu, *et. al.* 2008). Un estudio posterior con anexina V y yoduro de propidio mostró que otro de los mecanismos de citotoxicidad del ácido lucidénico es la necrosis de las células HL-60, dependiente de la dosis (Vermeulen, *et. al.* 2005).

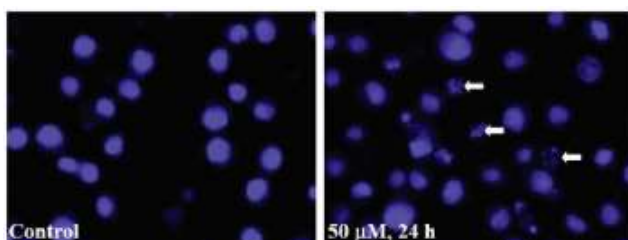


Figura 5. Células HL-60 teñidas con DAPI. A la izquierda se observan las células control, y a la derecha las células tratadas con ácido lucidénico B. Las flechas indican cuerpos apoptóticos (Hsu, *et. al.* 2008).

Tabla 2. Tipos de ácidos lucidénicos para los que se ha reportado un efecto sobre una línea celular de leucemia, con el tiempo de incubación y la concentración inhibitoria de los mismos (Hsu, *et. al.* 2008).

Ác luc	Incubación (h)	Tipo de leucemia	CC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μg/mL)	Mecanismo
A	72	HL-60 Leucemia mieloblástica aguda	61.0 ± 5.5	27.9 ± 2.5	-
B			19.3 ± 1.4	9.2 ± 0.7	Modulador negativo MEK 1/2
C			45.0 ± 2.1	21.4 ± 1.0	-
N			64.5 ± 1.7	29.7 ± 0.8	-

En un estudio de esteroides y derivados con estructuras triterpenoides se evaluaron los compuestos ganodermanontriol, ganolactona, fungisterol, 5,6-dihidroergosterol, ergosterol, peróxido de ergosterol, peróxido de 9(11)-dehidroergosterol, y dimetilincisterol A3. Para los compuestos ganodermanontriol, fungisterol y dimetilincisterol A3 se observó una disminución de la viabilidad celular en células murinas de cáncer de piel con CC₅₀ de 348 μM para ganodermanontriol, 370 μM para fungisterol y 293 M para dimetilincisterol A3 (Akihisa, *et. al.* 2007).

2.4.5.2 Arresto del ciclo celular

La inhibición de proliferación de células cancerígenas por los extractos de *G. lucidum* está mediada tanto por el efecto citotóxico como por el arresto del ciclo celular. Se ha observado mediante citometría de flujo que los extractos etanólicos de las esporas del hongo llevan a las células a un arresto del ciclo celular durante la transición de la fase G1 a la fase S (Zhu, *et. al.* 2000).

En otro estudio se observó que los ácidos ganodéricos extraídos del cuerpo fructífero del hongo inducían un arresto celular en células HeLa durante la fase G1 (Hu, *et. al.* 2002), mientras que el sobrenadante obtenido de un cultivo sumergido de *G. lucidum* con una concentración total de ácidos ganodéricos de 500 μg/mL incubado por 60 h inducía un arresto celular en la misma fase en células BEL7402 (hepatocarcinoma humano) (Yang, 2005). También se ha observado que el ácido ganodérico D tiene una actividad específica sobre células HeLa con un arresto en el ciclo celular durante las fases G2 y M, mientras que el ácido ganodérico DM

genera el arresto celular durante la fase G1 en células MCF-7 (cáncer de mama) mediante la modulación de la expresión de las proteínas CDK2, CDK6, ciclina D1 y P21 (Yue, *et. al.* 2008; Wu, *et. al.* 2012).

El mecanismo que se ha propuesto para explicar el arresto celular mediado por los diferentes ácidos ganodéricos es una potenciación de la expresión de la proteína P21 río arriba, comprobada mediante un análisis de Western Blot y citometría de flujo. Esta proteína es una cinasa que inhibe el ciclo celular por ser un regulador negativo de las proteínas CDK (cinastas dependientes de ciclinas; reguladores del ciclo celular). La ciclina D1 es un regulador de las fases G1 y S que, cuando se activa, permiten que las células dejen de estar en la fase G0 y continúen con su desarrollo, y al ser disminuída por una inhibición río abajo de su factor de transcripción E2F1 detienen el ciclo celular, generando apoptosis celular en cáncer de próstata (Wang, *et. al.* 2015). Al observar el efecto apoptótico del ácido lucidénico B, se observó una acumulación en la fase G1 de las células dependiente de la concentración del ácido. En esta fase, se observa una fragmentación del DNA celular lo que indica de manera indirecta que las células entran en apoptosis (Hsu, *et. al.* 2008).

Jiang, *et. al.* (2011) observaron que el Ganodermanontriol, un alcohol triterpenoide derivado de los ácidos ganodéricos, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células MDA-MB-231 con CC_{50} de 42.0 μ M, 15.7 μ M, y 11.3 μ M a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. En este estudio también se encontró una expresión significativamente disminuida de la proteína CDC20 al tratar las células con ganodermanontriol (Figura 6). Esta proteína controla la segregación cromosómica en la mitosis durante el ciclo celular, que en células tumorales se encuentra sobreexpresado en comparación con tejidos periféricos al tumor y células de tejidos sanos (Kidokoro, *et. al.* 2008; Wäsch and Engelbert, 2005).

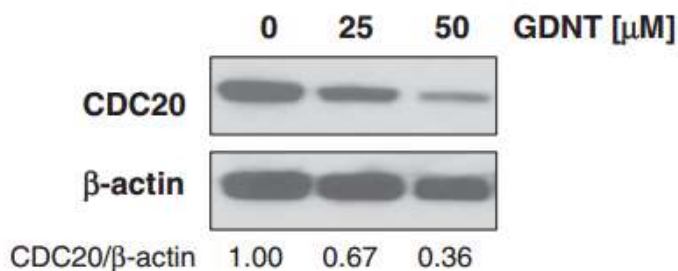


Figura 6. Disminución de la expresión de CDC20 observada por Western Blot al tratar células de cáncer de mama con ganodermanontriol (Jiang, *et. al.* 2008).

2.4.5.3 Efecto anti-invasivo

Para *G. lucidum* se han descrito diversos efectos biológicos entre los que se encuentran prevención y tratamiento de enfermedades como artritis, alergias, bronquitis, hepatitis crónica, hiperglucemia, hepatopatía, inflamación y nefritis que han sido comprobados (Hsu and Yen, 2014). Diversos reportes que indican los posibles mecanismos para los efectos anticancerígenos de los ácidos ganodéricos que involucran una citotoxicidad directa, apoptosis, antiangiogénesis, antiinvasión y antimetástasis (Jiang, *et. al.* 2004; Kim, *et. al.* 2006).

La metástasis está relacionada con la degradación de las barreras físicas, como la matriz extracelular (ECM). La secreción de metaloproteinasas de matriz 2 y 9 son altamente expresadas en tumores malignos en pulmón, colon y mama y tienen un papel importante en la invasión celular ya que pueden degradar la ECM (Scorlias, *et. al.* 2001). Los ácidos ganodéricos A, B, C y D fueron aislados del cuerpo fructífero de *G. lucidum* y de *G. colossum* y en ambos basidiomicetos se encontró que tienen una actividad anti-invasiva y anti-metástasis al inhibir la expresión de la metaloproteinasa de matriz 9 *in vitro* (Weng, *et. al.* 2009). *In vivo* se ha observado que un extracto etanólico de ácidos ganodéricos proveniente de *G. lucidum* inhibe la proliferación celular y metástasis en ratones ICR-nu/nu inoculados con células HepG2 (Weng, *et. al.* 2009). Para *G. colossum* se encontró que un extracto etanólico a partir del cuerpo fructífero inhibe la proliferación celular de HepG2. Para los ácidos lucidénicos en general se ha propuesto una cascada de transducción de señales para explicar el efecto anti-invasivo a través de la metaloproteinasa de matriz 9 (Figura 7) (Weng, *et. al.* 2010).

El aislamiento y evaluación de la bioactividad de los ácidos lucidénicos A, B, C y N a partir de *G. lucidum* demostró que estos componentes tienen una actividad anti-invasiva al reducir la actividad de las metaloproteinasas de matriz 9 y 2 inducida con PMA (forbol) en células HepG2 al tratar las células con concentraciones de 10 a 100 M de cada uno de estos ácidos (Weng, *et. al.* 2007).

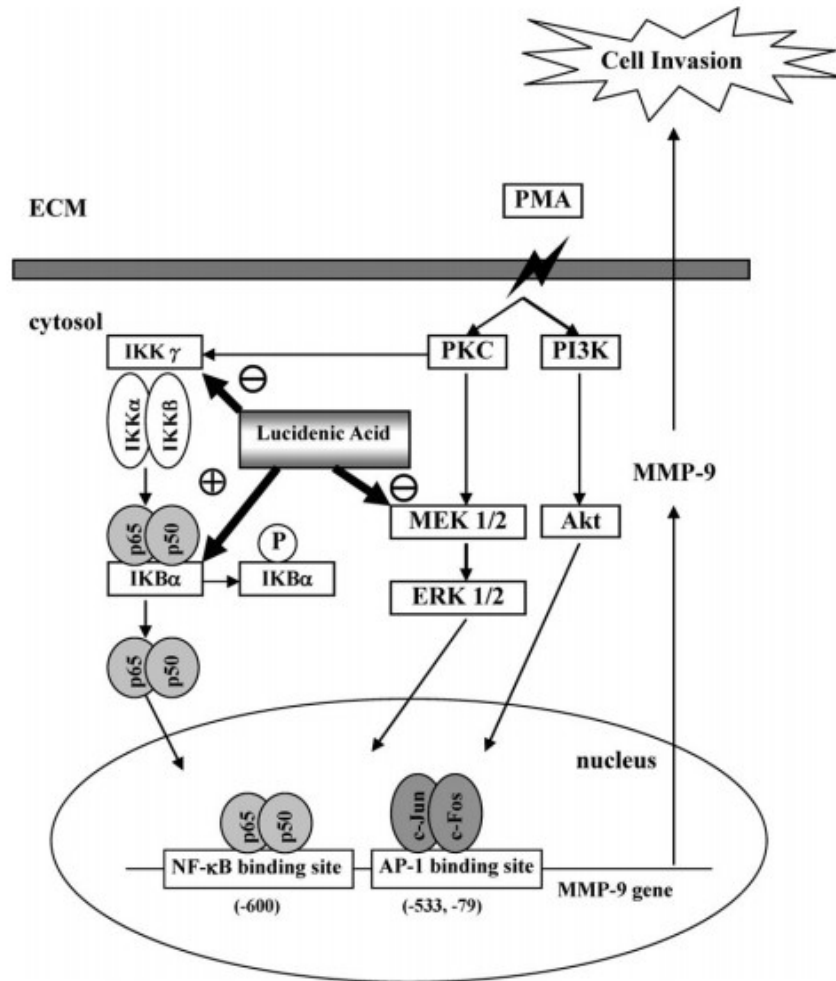


Figura 7. Vía de transducción de señales propuesta para la inhibición del efecto invasivo de células HepG2 al tratar las células con ácido lucidénico B (Weng, *et. al.* 2008). Las flechas delgadas indican la vía de transducción. Las flechas gruesas indican el efecto del ácido lucidénico B. + indica modulación positiva. – indica modulación negativa. ECM: matriz extracelular. PMA: forbol. PKC: proteína C cinasa. PI3K: fosfoinositol 3-cinasa. MEK ½, ERK ½, Akt: cinasas de cascada de fosforilación. MMP-9: metaloproteína de matriz 9. NF-κB: factor de transcripción (-600 indica la posición del nucleótido de unión) AP-1: factor de transcripción (-533 y -79 indican las posición de los nucleótidos de unión). IKKα, IKKβ, IKKγ, IKBα: proteínas reguladoras de transcripción NF-κB. p50: activador de la transcripción. P: fosfato. c-Jun, c-Fos: subunidades activadoras de transcripción de AP-1.

La invasión celular también está relacionada con la secreción del activador plasminógeno de urocinasa (uPA) y la expresión de su receptor (Jiang, *et. al.* 2008). En células MDA-MB-231 se observó que hay una inhibición de la expresión del receptor de uPA y una supresión de la secreción de uPA al tratar las células con ganodermanontriol lo que impide el comportamiento invasivo celular, es decir, la proliferación y migración de células tumorales, y su adhesión a través de ensayos en matrices de gel (Jiang, *et. al.* 2011).

3. Justificación

Ya que se ha demostrado que el sobrenadante del cultivo sumergido de *H. coffeata* presenta actividad antitumoral y antioxidante (Porras-Arboleda, *et. al.* 2009). Este hongo tiene potencial para producir compuestos de origen natural que puedan ser utilizados en diferentes aplicaciones.

Como se hace con los hongos que comprenden el género *Ganoderma*, específicamente *G. lucidum*, se extraen metabolitos del sobrenadante y del cuerpo fructífero de los hongos en cultivo sumergido para evaluarlos. Entre los metabolitos en el sobrenadante de estos hongos se ha encontrado que los ácidos triterpenoides y los EPS son los metabolitos responsables de la actividad antitumoral, siendo los ácidos triterpenoides los responsables de la apoptosis celular y los EPS responsables de una respuesta inmunomoduladora.

Para el caso de *H. coffeata* los EPS ya han sido estudiados y se determinó que tienen actividad antitumoral sobre la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 al utilizar bajas concentraciones de los EPS liofilizados (García-García, 2014). Sin embargo, no se ha estudiado el efecto antitumoral que puedan presentar los ácidos triterpenoides, por lo que también es importante conocer cuáles son las condiciones de cultivo sumergido óptimas para la producción de los ácidos de *H. coffeata*, así como evaluar en cuál de las condiciones determinadas se tiene un efecto citotóxico significativo sobre líneas celulares de leucemia y compararlo con su efecto sobre MSP. Finalmente, es importante determinar cuál o cuáles ácidos son los responsables de la actividad citotóxica y en qué concentraciones.

4. Hipótesis

Los ácidos triterpenoides producidos por *H. coffeata* en cultivo sumergido tienen actividad citotóxica sobre líneas celulares de leucemia.

5. Objetivos

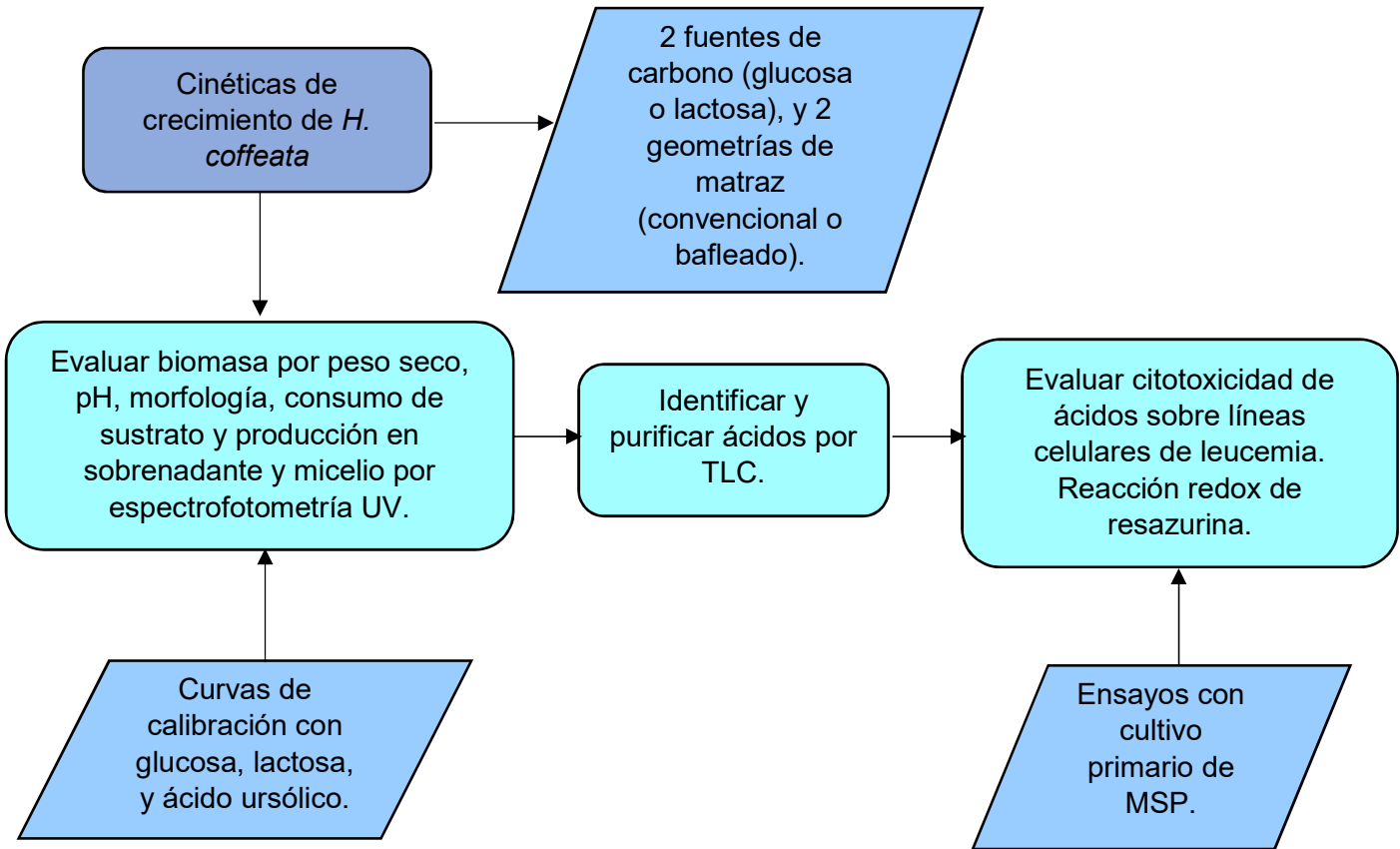
5.1 Objetivo general

- Caracterizar los ácidos triterpenoides producidos en cultivo sumergido de *H. coffeata*, y evaluar su actividad citotóxica sobre las líneas celulares de leucemia K562 y Jurkat E6.

5.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la producción de ácidos triterpenoides, biomasa, el consumo de sustrato y morfología de *H. coffeata* en cultivos sumergidos en matraces convencionales y bafleados con diferentes fuentes de carbono.
- Purificar e identificar por TLC los ácidos triterpenoides producidos por *H. coffeata* en cultivos sumergidos.
- Evaluar actividad citotóxica de los ácidos triterpenoides producidos por *H. coffeata* sobre líneas de leucemia K562 y Jurkat E6 y compararla con el efecto sobre MSP.

6. Estrategia experimental



7. Metodologías

7.1 Cepa *H. coffeata*

En este trabajo se utilizó un aislamiento de *H. coffeata* proveniente de la colección de la Universidad EAFIT (Medellín-Colombia) donado por la M. en C. Catalina Giraldo Estrada, previamente colectado en el poblado de Tierra Alta, Córdoba, Colombia (Porras-Arboleda, *et. al.* 2009).

7.2 Cinéticas de crecimiento de *H. coffeata*

Se inoculó una caja Petri con agar MPO (Tabla 3 más 15 g/L de agar) con un disco de 0.5 cm de diámetro sobre el que creció el hongo a 30°C. Después de una semana se tomó un cuadro de 0.5x0.5 cm y se inoculó en un matraz bafleado con 50 mL de medio MOP líquido y se incubó a 30°C y 150 rpm (Incubadora de agitación C25 New Brunswick Scientific, diámetro de agitación de 2.54 cm) por 3 días. A partir del preinóculo, se colocó 1 mL en matraces de 250 mL con 50 mL de uno de los dos medios evaluados (Tabla 3), se ajustó el pH a 5.0, y se realizó una cinética a lo largo de 20 días a 30°C y 150 rpm utilizando matraces bafleados o convencionales (Figura 8).

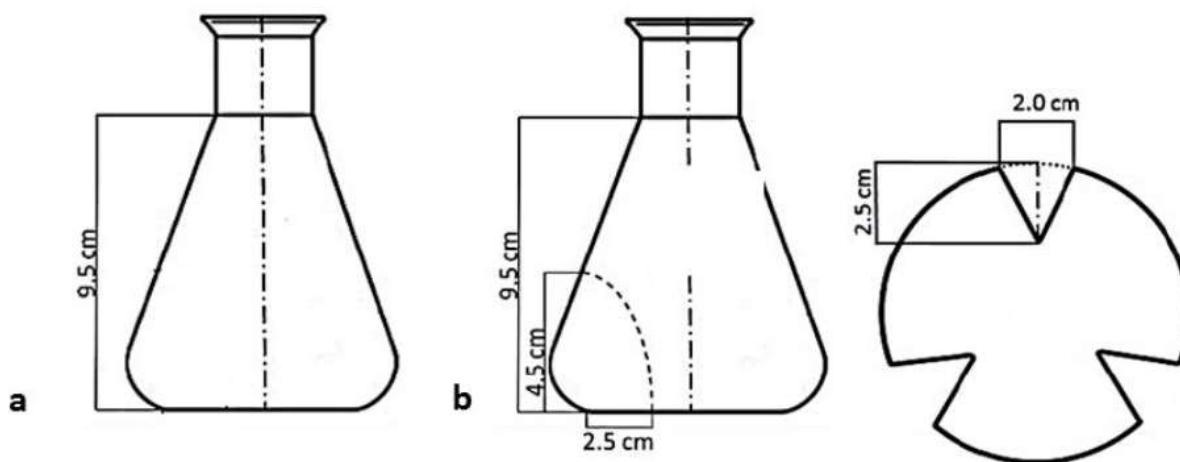


Figura 8. Esquema de los matraces de 250 mL (SCHOTT DURAN®) utilizados en las cinéticas de *H. coffeata*. a) Matraz convencional, b) Matraz bafleado, vistas de frente y por abajo (Gamboa-Suasnavart, *et. al.* 2011).

Se observó la morfología del crecimiento, y se realizaron mediciones de biomasa, pH, consumo de fuente de carbono, producción de triterpenoides totales, y

producción de ácidos triterpenoides, tanto en micelio como en sobrenadante. Las mediciones se realizaron a los 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 días, sacrificando un matraz por medición con repeticiones en los días 4, 8, 12 y 16.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo.

Medio FZM (g/L) (Fang y Zhong Modificado) (Fang and Zhong, 2002)	Medio MPO (g/L) (Medio de Porras Optimizado) (Porras-Arboleda, <i>et. al.</i> 2009)
Glucosa 35.0	Lactosa 50.0
Extracto de levadura 2.5	Extracto de levadura 5.0
Peptona 5.0	
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5	
Vitamina B ₁ 0.05	

Para la medición de biomasa se filtró al vacío el total del cultivo celular del matraz con papel filtro (Whatman® No.4, previamente pesado), recuperando el sobrenadante para posteriores mediciones, y se secó a 70°C por 24 horas para calcular la masa por diferencia de pesos (García-García, 2014). Para medir el pH se utilizó un potenciómetro (Hanna Instruments).

Para la medición del consumo de la fuente de carbono se tomaron 0.5 mL del sobrenadante de cada matraz de la cinética y se realizó el ensayo de azúcares reductores adicionando 2 mL del reactivo de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y colocando los tubos en baño María a 100°C por 5 minutos. El fundamento de esta reacción es que, en condiciones alcalinas, un azúcar con un grupo aldehído reduce al DNS en presencia de calor para formar un grupo carboxilo en el azúcar y ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que es un complejo de color amarillo-naranja, cuya absorbancia se puede medir a 540 nm con una intensidad de color proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes (Miller, 1959).

Se realizó una curva patrón (anexos 12.1 y 12.2) para cada una de las fuentes de carbono a concentraciones conocidas para después determinar la concentración de azúcar en cada uno de los matraces de cada cinética. Las fuentes de carbono

utilizadas fueron lactosa y glucosa, cada una utilizada en dos geometrías de matraces diferentes, bafleados o convencionales.

7.3 Cuantificación de triterpenoides totales

Se tomaron 0.8 mL del sobrenadante de cada una de las mediciones de la cinética y se colocaron en tubos de ensayo, se adicionaron 0.4 mL de una solución al 5% de vainillina-ácido acético glacial más 1 mL de ácido perclórico. Esta mezcla se colocó en baño María en ebullición por 20 minutos y, posteriormente se enfriaron en baño de hielo. Se adicionaron 3 mL de ácido acético glacial, y se agitó en vórtex durante 15-20 segundos. Después se mantuvo a temperatura ambiente por 15 minutos y se midió la absorbancia a 550 nm (Fan and He, 2006; Liu, *et. al.* 2014).

La curva patrón se realizó con ácido ursólico (ácido triterpenoide, Sigma-Aldrich, CAS 77-52-1, anexo 12.3). El fundamento de esta técnica es una reacción de sustitución nucleofílica donde la vainillina forma un complejo colorimétrico de color rojo-café con el ácido carboxílico del compuesto triterpenoide en condiciones ácidas y con calor (Fan and He, 2006; Liu, *et. al.* 2014).

7.4 Extracción y cuantificación de ácidos triterpenoides

Por cada 1 mL de sobrenadante de las cuatro condiciones en las que se cultivó *H. coffeata* (glucosa: matraz convencional y bafleado, y lactosa: matraz convencional y bafleado), se le agregó 1 mL cloroformo (Zhang, *et. al.* 2014) para cada uno de los puntos de las cinéticas realizadas. Se tomó la fase orgánica y se le añadió un volumen de NaHCO₃ 5% w/v para obtener los ácidos carboxílicos presentes sin protonarse. Después se adicionó HCl concentrado hasta obtener un pH de 2.5 para protonar los ácidos carboxílicos, se extrajo la fase acuosa y se le adicionó de nuevo un volumen de cloroformo. Se extrajo la fase orgánica se evaporó a sequedad a 40°C. El precipitado obtenido se recuperó disolviéndolo en 2 mL de EtOH al 70%. Se tomaron 0.8 mL de cada uno de las extracciones realizadas para realizar la cuantificación de los ácidos triterpenoides por el método de vainillina-ácido acético glacial, descrito anteriormente. Posteriormente se calcularon los parámetros

cinéticos para cada una de las condiciones realizadas con las ecuaciones correspondientes (anexo 12.4).

Cada uno de los extractos obtenidos en sobrenadante se concentró varias veces hasta obtener una solución del mismo de 10 000 $\mu\text{g/mL}$ (verificado con el procedimiento de cuantificación de ácidos triterpenoides descrito previamente) para usar en experimentos posteriores.

7.5 Prueba de identidad de ácidos triterpenoides en TLC

Para verificar que en las extracciones se obtuvieron moléculas con un ácido carboxílico en su estructura, cada uno de los extractos obtenidos, tanto de micelio como de sobrenadante, se colocaron sobre una placa recubierta con sílica gel a una distancia de 0.5 cm entre cada una de ellas y a 1 cm de la base de la placa (Merck, 100390). Esta placa se eluyó en una solución de cloroformo y acetona 5:2 (para facilitar la elución de ácidos triterpenoides) utilizando como control positivo al ácido ursólico y como control negativo la extracción de medio de cultivo sin inocular. La elución se dejó correr hasta 0.5 cm antes del tope de la placa. Para revelar se observaron las placas en luz UV y aplicando una solución reveladora de H_2SO_4 al 10% en MetOH seguida por calor, donde las manchas se observan de un color morado-café (Glensk, *et. al.* 2014; Naumoska and Vovka, 2015).

Se realizó el cálculo de radio de frente (R_f , distancia de la muestra desde el origen/distancia del eluyente desde el origen para cada una de las marcas obtenidas con el programa ImageJ (anexo 12.5) y posteriormente se compararon los R_f de cada banda, realizando una prueba de ANOVA-Dunn para observar si había diferencias significativas entre cada uno de ellas (anexo 12.8).

7.6 Purificación de ácidos triterpenoides por TLC

Para cada uno de los extractos se realizaron tres placas preparativas en TLC de 20 x 20 cm, eluyéndose en las mismas condiciones que en las placas realizadas para la identificación de cada uno de los compuestos. Cada una de las placas se observó

bajo la luz UV para garantizar que los compuestos se habían separado en las fracciones correspondientes (tres fracciones para glucosa, cuatro fracciones para lactosa) y se marcó con lápiz las zonas donde se encontraban cada una de ellas para posteriormente raspar la sílica de las placas TLC donde se encontraban los compuestos y recuperarlos. Cada una de las fracciones de cada placa se colocó en 5 mL cloroformo y se eliminó la sílica por filtración (Figura 9). Del filtrado se tomaron 0.8 mL para cuantificar los ácidos triterpenoides con la metodología descrita anteriormente. Finalmente, cada una de las fracciones se concentró hasta obtener una solución de 10 000 µg/mL en hexano para realizar los ensayos de citotoxicidad (verificado realizando el ensayo colorimétrico para cuantificación de triterpenoides descrito previamente).

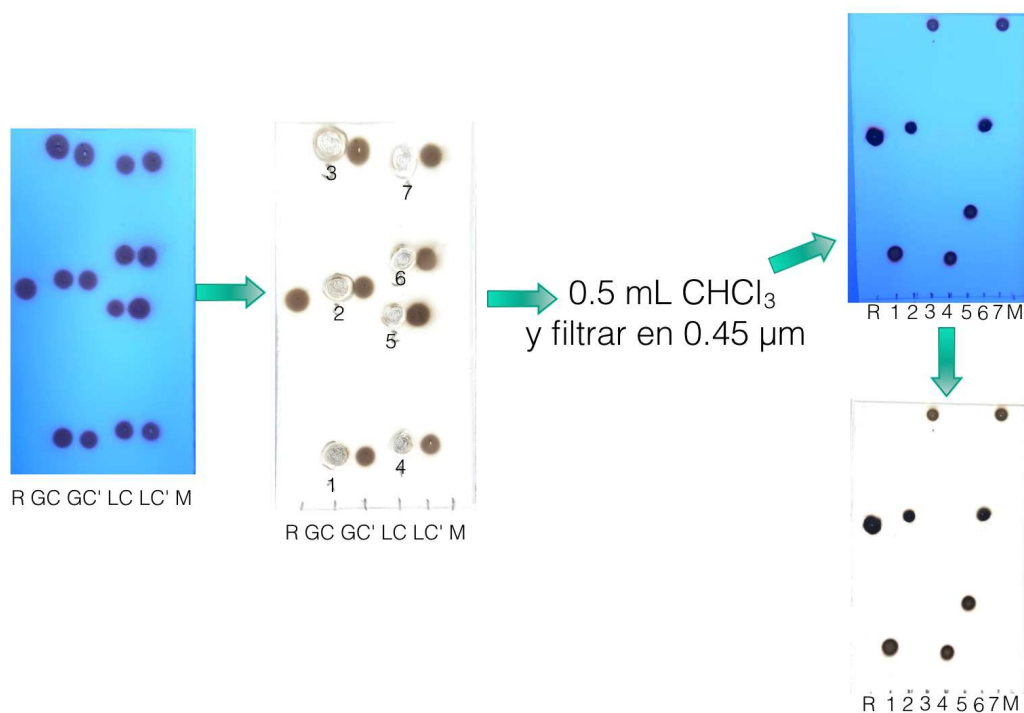


Figura 9. Verificación de la purificación de fracciones en las placas TLC.

7.7 Evaluación de actividad citotóxica

7.7.1 Uso de líneas celulares de leucemia

Se utilizaron dos líneas celulares mieloides crónicas: K562 y Jurkat E6 (donadas por la Dra. Leticia Rocha Zavaleta; Dpto. de Biología Molecular y Biotecnología, IIB UNAM) cultivadas en medio RPMI 1640 Gibco 1X, adicionado al 10% de suero fetal

bovino (SFB), al 1% de penicilina-estreptomicina (p-e), a 37°C y 5%CO₂. Se utilizaron diferentes concentraciones del extracto de ácidos triterpenoides obtenidos en matraces convencionales con glucosa o lactosa, y cada una de las fracciones identificadas por TLC a partir de una solución de 10 000 µg/mL en PBS de cada uno de ellos, para determinar la citotoxicidad de cada uno de los extractos o de sus fracciones (García-García, 2014).

7.7.2 Ensayo de reducción de resazurina

El ensayo de reducción de resazurina determina la cantidad de células viables mediante el estado de oxidación de esta molécula, que en su estado reducido (células viables; pico de absorbancia a longitud de onda de 600 nm) adquiere un color rojo, mientras que en su estado oxidado (células no viables; pico de absorbancia a longitud de onda de 545 nm) mantiene un olor azul (Protocolo: ThermoFisher; referencia 70).

Al aplicar el tratamiento correspondiente, cada placa se incubó por 48 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda diferentes 545 y 600 nm, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad para cada pozo con respecto al control celular (Ecuaciones 1 y 2). Posteriormente, cada placa se incubó 24 horas más y se volvió a cuantificar la absorbancia para comparar el efecto citotóxico a las 48 horas con el efecto citotóxico a las 72 horas.

$$\% \text{ Proliferación} = \frac{(\epsilon_{ox})\lambda_2 * A\lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 * A\lambda_2}{(\epsilon_{ox})\lambda_2 * A^\circ\lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 * A^\circ\lambda_2} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo de porcentaje de proliferación.

Donde $\lambda_1 = 545 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 600 \text{ nm}$, $(\epsilon_{ox})\lambda_2 = 117\,216$, $(\epsilon_{ox})\lambda_1 = 47\,619$.

$A\lambda_1$ = absorbancia obtenida a 545 nm en pozo con tratamiento.

$A\lambda_2$ = absorbancia obtenida a 600 nm en pozo con tratamiento.

$A^\circ\lambda_1$ = absorbancia obtenida a 545 nm en pozo de control celular (0 µg/mL de extracto).

$A^\circ\lambda_2$ = absorbancia obtenida a 600 nm en pozo de control celular (0 µg/mL de extracto).

$$\% \text{ Citotoxicidad} = 100 - \% \text{ Proliferación}$$

Ecuación 2. Cálculo de porcentaje de citotoxicidad.

Para garantizar que el uso de PBS no estaba causando una disminución de la viabilidad celular significativa aún en la cantidad de volumen más alta (150 μL), se realizó un ensayo de viabilidad celular de PBS (anexo 12.6). Al determinar que el PBS no estaba causando ningún efecto significativo sobre las líneas celulares se prosiguió con los ensayos de citotoxicidad.

7.7.2.1 Ensayo de citotoxicidad con extractos totales de ácidos triterpenoides

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos con 100 μL de células (50 000 células por pozo; una placa por cada línea celular) y 150 μL de medio RPMI. Estas placas se dejaron incubando por un día a 37°C y 5% CO_2 . Al día siguiente se retiraron de cada uno de los pozos de la placa 200 μL (dejando 30 000 células/pozo) y se adicionaron a cada carril de cada placa 20 μL de resazurina y diferentes concentraciones de los ácidos triterpenoides hasta obtener 300 μL de volumen total en cada pozo. Cada placa se incubó con ácidos triterpenoides obtenidos del crecimiento del hongo en matraces convencionales con glucosa, y la otra mitad con ácidos triterpenoides con lactosa. El control positivo utilizado fue H_2O_2 al 3%, el control negativo fue PBS, y el control celular donde se adicionó medio fresco a las células (Figura 10). Cada placa se incubó 48 horas a 37°C.

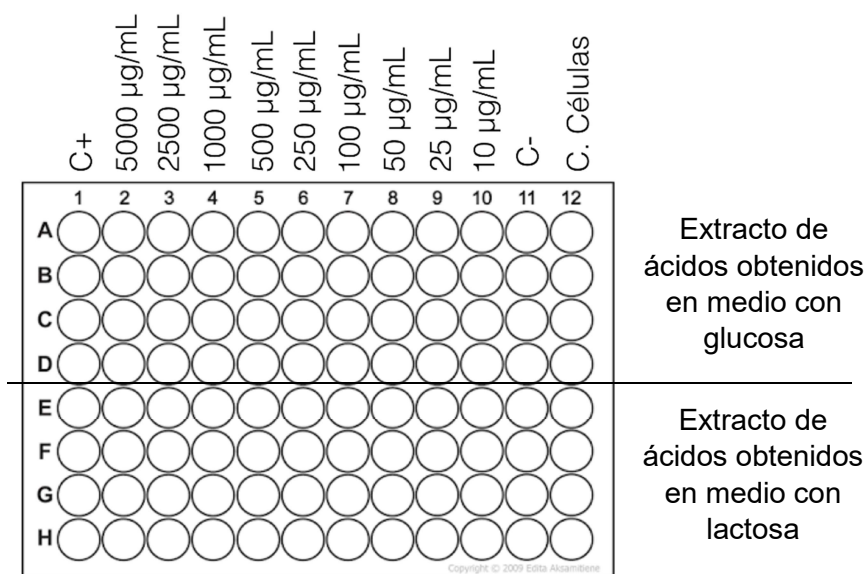


Figura 10. Concentraciones de cada extracto utilizadas en cada placa por línea celular.

Al finalizar el tiempo de incubación de cada placa, se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda diferentes 545 y 600 nm, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad para cada pozo con respecto al control celular (Ecuaciones 1 y 2). Posteriormente, cada placa se incubó 24 horas más y se volvió a cuantificar la absorbancia para comparar el efecto citotóxico a las 48 horas con el efecto citotóxico a las 72 horas.

Con el programa SigmaPlot 12, se realizó una prueba de ANOVA-Dunnett para observar si había diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos con respecto al control celular (0 µg/mL de extracto). También se realizaron los cálculos de CC₅₀ para cada tratamiento (anexo 12.7), y realizando una prueba de ANOVA-Tukey para observar si había diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos (anexo 12.8).

7.7.2.2 Ensayo de citotoxicidad con fracciones de los extractos de ácidos triterpenoides

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos con 100 µL de células (50 000 células por pozo; una placa por cada línea celular) y 150 µL de medio RPMI. Estas placas se dejaron incubando por un día a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente se retiraron de cada uno de los pozos de la placa 200 µL (dejando 30 000 células/pozo) y se adicionaron a cada carril de cada placa 20 µL de resazurina y diferentes concentraciones de cada una de las fracciones obtenidas para cada extracto hasta obtener 300 µL de volumen total en cada pozo. (Figuras 11 y 12). El control positivo utilizado fue H₂O₂ al 3%, el control negativo fue PBS, y el control celular donde se adicionó medio fresco a las células. Cada placa se incubó 48 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación de cada placa se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda diferentes 545 y 600 nm, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad para cada pozo con respecto al control celular (Ecuaciones 1 y 2). Posteriormente, cada placa se incubó 24 horas más y se volvió a cuantificar la absorbancia para comparar el efecto citotóxico a las 48 horas con el efecto citotóxico a las 72 horas.

Con el programa SigmaPlot 12, se realizó una prueba de ANOVA-Dunnett para observar si había diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos con respecto al control celular (0 $\mu\text{g/mL}$ de extracto). También se realizaron los cálculos de CC_{50} para cada tratamiento (anexo 12.7), y realizando una prueba de ANOVA-Tukey para observar si había diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos (anexo 12.8).

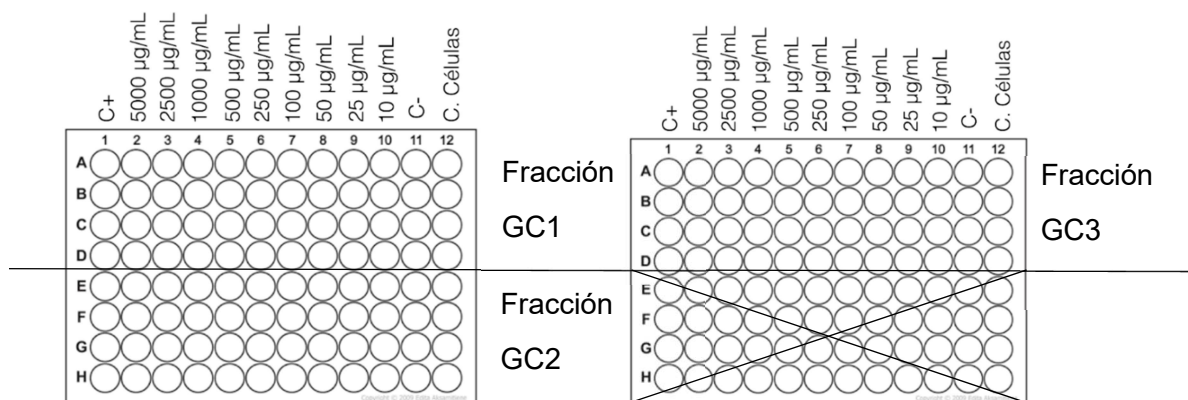


Figura 11. Preparación de placas para fracciones de glucosa por cada línea celular.

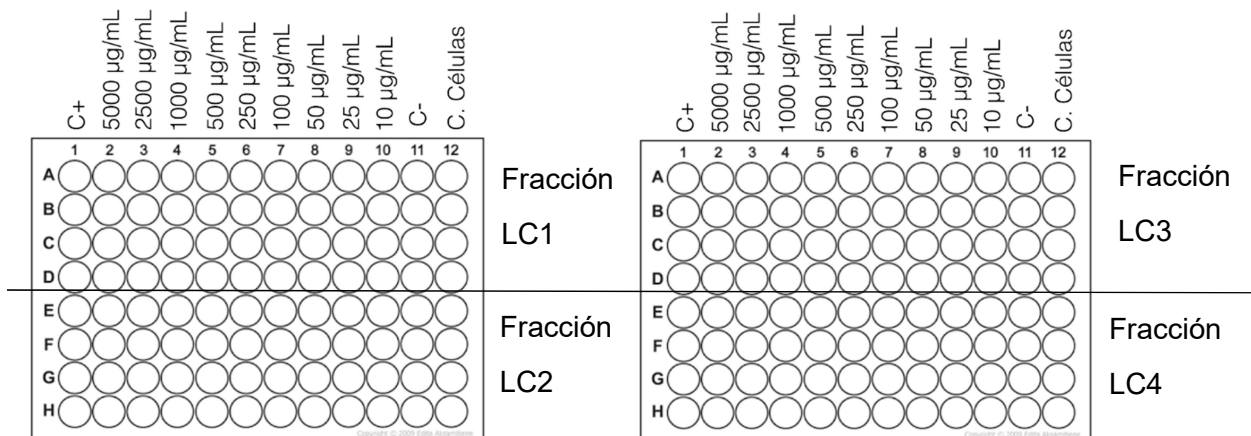


Figura 12. Preparación de placas para fracciones de lactosa por cada línea celular.

7.7.2.3 Extracción de MSP

Se realizó la extracción de 5 mL de sangre de un hombre aparentemente sano de 28 años, y se le adicionaron 5 mL de PBS 1x y 5 mL de solución de Ficoll para generar un gradiente de densidad (GE Healthcare, 17-1440-02). Posteriormente, se

centrifugó a 2 500 rpm por 20 minutos a 20°C y se extrajo el anillo de células blancas con una pipeta Pasteur (Figura 13).

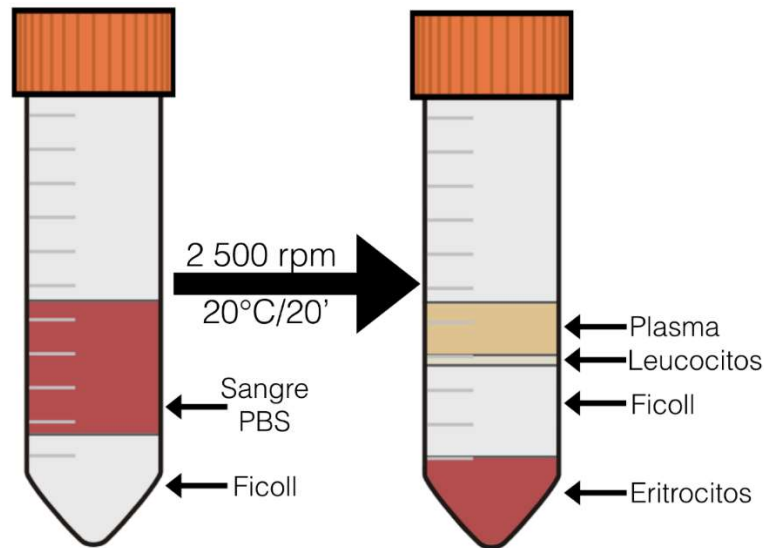


Figura 13. Extracción de monocitos con la solución de Ficoll.

El anillo de leucocitos extraído se lavó llevándolo a un volumen total de 25 mL con PBS 1x frío y centrifugando a 3 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para garantizar que en el pellet de leucocitos no se encontraran eritrocitos, éstos se lisaron agregando al pellet 100 µL de PBS 10x frío, incubando por 30 segundos a temperatura ambiente, y después resuspendiendo en 900 µL de agua estéril. Posteriormente, se realizaron dos lavados más como se describió anteriormente. Finalmente, al pellet obtenido se le adicionaron 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado (10% SFB y 1% p-e) para ajustar la cuenta a 10×10^6 células/mL. Las células se incubaron 1.5 horas a 37°C y 5% CO₂ y se separaron los monocitos (células adherentes; utilizadas en experimento de citotoxicidad) de los linfocitos (células no adherentes; desechadas) antes de realizar los ensayos de citotoxicidad.

7.7.2.4 Ensayo de citotoxicidad con MSP

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos con 100 µL de MSP (50 000 células/pozo) y 150 µL de medio RPMI. Esta placa se dejó incubando por un día a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente se retiraron de cada uno de los pozos de la placa

200 μL (dejando 30 000 células/pozo) y se adicionaron a cada carril de cada placa 20 μL de resazurina y diferentes concentraciones de las dos fracciones obtenidas con mayor actividad citotóxica (GC1 y GC3) hasta obtener 300 μL de volumen total en cada pozo. (Figura 14).

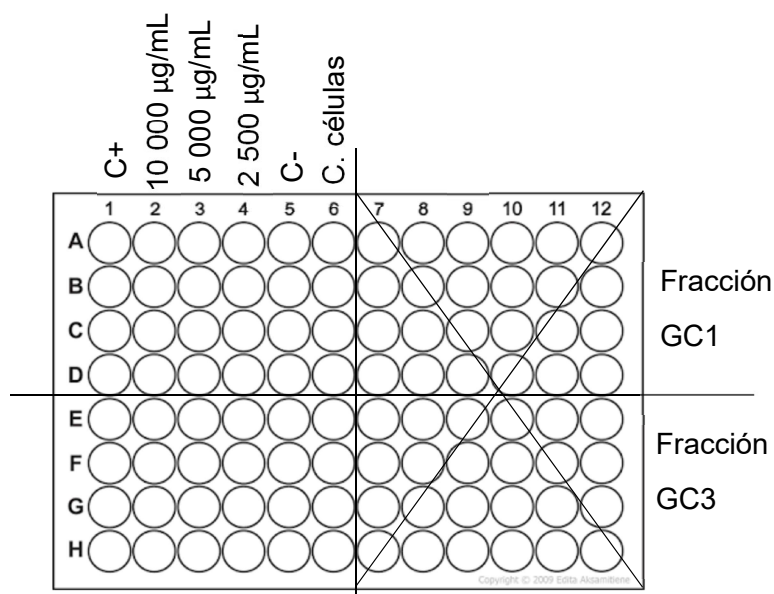


Figura 14. Preparación de placas para fracciones GC1 y GC3 para el ensayo con MSP.

El control positivo utilizado fue H_2O_2 al 3%, el control negativo fue PBS, y el control celular donde se adicionó medio fresco a las células. La placa se incubó 48 horas a 37°C . Al finalizar el tiempo de incubación de la placa, se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda diferentes 545 y 600 nm, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad para cada pozo con respecto al control celular (Ecuaciones 1 y 2). Posteriormente, la placa se incubó 24 horas más y se volvió a cuantificar la absorbancia para comparar el efecto citotóxico a las 48 horas con el efecto citotóxico a las 72 horas.

Con el programa SigmaPlot 12, se realizó una prueba de ANOVA-Dunnnett para observar si había diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos con respecto al control celular (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto) (anexo 12.8).

8. Resultados y Discusión

8.2 Morfología de *H. coffeata*

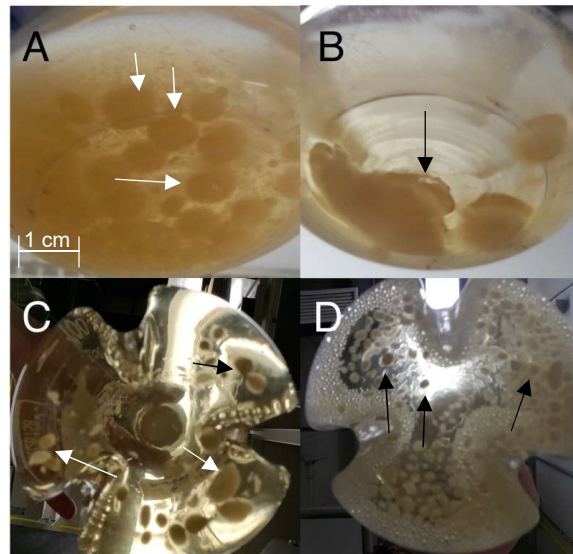


Figura 15. Morfología del crecimiento de *H. coffeata* a los 20 días de cultivo Las flechas indican algunos de los pellets encontrados.

- A) Cinética de glucosa en matraces convencionales.
- B) Cinética de lactosa en matraces convencionales.
- C) Cinética de glucosa en matraces bafleados.
- D) Cinética de lactosa en matraces bafleados.

Se realizaron los cultivos variando la fuente de carbono (glucosa o lactosa) y la geometría de matraz (convencional o bafleado) a lo largo de 20 días. En los primeros 4 días de cada cinética, la morfología de los pellets era similar: pellets pequeños de alrededor de 1-2 mm de diámetro. Después de 20 días de cultivo se observaron diferentes tamaños de pellets en cada una de los cultivos, mientras que la consistencia de los pellets se mantiene similar (pellets muy poco compactos, con una alta difusión del medio de cultivo).

En la cinética realizada con glucosa en matraces convencionales se observan pellets de entre 5 y 7 mm de diámetro (Figura 15A). En los matraces convencionales donde se utilizó lactosa, la morfología fue del hongo creciendo sobre sí mismo sin tener una forma esférica definida (Figura 15B). En la cinética realizada con glucosa

en matraces bafleados se observan pellets de diámetro variable (entre 0.2 y 1 cm) (Figura 15C). En los matraces bafleados utilizando lactosa como fuente de carbono, los pellets observados eran muy pequeños (entre 1 y 3 mm de diámetro) (Figura 15D). En todas las cinéticas se observó crecimiento del hongo en las paredes de los matraces, siendo un crecimiento menor en los matraces bafleados que en comparación a los matraces convencionales, independientemente de la fuente de carbono utilizada.

En el caso de Chisty, 2001, y Athie-García, *et. al.* 2018 se realizaron cultivos con *Aspergillus niger* y se introdujo paladio como partícula para causar estrés en el cultivo, lo cual derivó en daños a la pared celular del hongo, causando diferencias en la morfología al aumentar la concentración de paladio.

En el caso de *H. coffeata*, las diferentes morfologías observadas indican la influencia de la fuente de carbono y geometría de matraz elegida. En los matraces bafleados se observan pellets de menor tamaño, que son ocasionados por el estrés en el que se encuentra el hongo. La concentración de oxígeno junto con el constante golpeteo contra los baffles (Chisty, 2001; Athie-García, *et. al.* 2018).

8.2 Cinéticas de crecimiento de *H. coffeata*

8.2.1 Parámetros cinéticos

Se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos (Tabla 4) velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_d), rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), y velocidad específica de consumo (Q_s). Para los parámetros asociados al producto, se calculó el rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$), la productividad específica (Q_p), y la productividad volumétrica (P_v) para las mediciones realizadas en triterpenoides totales, ácidos triterpenoides en micelio y ácidos triterpenoides en sobrenadante. Los cálculos se realizaron para cada una de las cinéticas realizadas con respecto las ecuaciones en el anexo 12.4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos evaluados para todas las cinéticas de *H. coffeata* en matraces a 30°C y 150 rpm.

Parámetro	Tipo de matraz	μ (días ⁻¹)	t_d (días)	$Y_{x/s}$ (mg _x /g _s)	Q_s (mg _s /g _x h)
Glucosa	Convencional	0.63 ± 0.01	1.10 ± 0.03	252.8	169.6
	Bafleado	0.75 ± 0.02	0.92 ± 0.02	423.7	101.3
Lactosa	Convencional	0.53 ± 0.02	1.32 ± 0.05	236.0	127.9
	Bafleado	0.47 ± 0.01	1.46 ± 0.04	425.0	68.8
Parámetro	Para triterpenoides totales		$Y_{p/x}$ (mg _p /g _x)	Q_p (μg _p /g _x h)	P_v (mg _p /Lh)
Glucosa	Convencional		79.7	829.7	7.2
	Bafleado		52.5	546.9	7.9
Lactosa	Convencional		66.6	693.5	7.9
	Bafleado		46.4	483.5	10.3
Parámetro	Para ácidos triterpenoides de micelio		$Y_{p/x}$ (μg _p /g _x)	Q_p (μg _p /g _x h)	P_v (μg _p /Lh)
Glucosa	Convencional		1 335.2	13.9	120.8
	Bafleado		513.9	5.4	78.1
Lactosa	Convencional		842.1	8.8	101.0
	Bafleado		485.8	5.1	108.3
Parámetro	Para ácidos triterpenoides de sobrenadante		$Y_{p/x}$ (μg _p /g _x)	Q_p (μg _p /g _x h)	P_v (μg _p /Lh)
Glucosa	Convencional		19 093.0	198.9	1 740.6
	Bafleado		10 006.9	204.2	1 531.3
Lactosa	Convencional		18 456.1	192.3	2 221.9
	Bafleado		10 330.2	107.6	2 311.5

Se observa que en los matraces convencionales la μ es mayor que en los matraces bafleados y, por lo tanto, el t_d se comporta de manera inversa. También se encontró que la μ es mayor cuando hay lactosa en el medio en lugar de glucosa. Esto es consistente con los trabajos previos donde se había observado un mejor crecimiento de *H. coffeata* en presencia de lactosa (Porras-Arboleda, *et. al.* 2009; García-García, 2014).

En los matraces bafleados matraces se tiene una mayor transferencia de oxígeno debido a que los bafles ejercen una fuerza de corte en el micelio (García-García, 2014;. Esta transferencia de oxígeno junto con la velocidad de agitación, mantienen

un gradiente de concentración entre el interior y exterior de la célula, que por medio del aumento de la velocidad de difusión ayudara a establecer un suministro adecuado de nutrientes a la célula (Oh, *et. al.* 2007). Esto puede estar relacionado con las diferentes morfologías adquiridas por la biomasa en cada uno de los matraces (Figura 15). Al ser pellets con muy baja compactabilidad, los pellets de mayor tamaño (matraces convencionales) permitirían que el medio de cultivo se internalice. Al haber mayor disponibilidad de nutrientes para cada célula del hongo se facilita su crecimiento (Oh, *et. al.* 2007). Los pellets de menor tamaño (matraces bafleados) son sometidos constantemente al estrés hidrodinámico de los baffles. Esto podría causar un exceso de oxígeno que cause daño a la estructura celular del hongo, causando que para cada célula sea más difícil acceder a los nutrientes y que el crecimiento sea más lento. Esto es consistente con los estudios de Chisty, 2001 y Athie-García, *et. al.* 2018, donde se observó la diferente morfología adquirida por los hongos capaces de formar micelio en matraces sumergidos.

8.2.2 Evaluación de biomasa y pH de *H. coffeata*

Se llevaron a cabo cultivos comparando la fuente de carbono (glucosa en 35 g/Ly lactosa en 50 g/L) y el diseño del matraz (convencional y bafleado) y se siguió el crecimiento de la biomasa por peso seco. Estas mediciones se realizaron utilizando un matraz en su totalidad para cada toma de muestra. Se obtuvo la mayor concentración de biomasa (21.2 g/L, día 20) en aquellos cultivos donde se usó lactosa y matraces bafleados (Figura 16). Para el resto de las cinéticas los valores de biomasa finales son de 15.0 g/L en la cinética de lactosa en matraces convencionales, 16.8 g/L en la cinética de glucosa en matraces bafleados, y 10.4 g/L ven la cinética de glucosa en matraces convencionales. Cuando se comparan los rendimientos $Y_{x/s}$ obtenidos en los cultivos realizados con matraces convencionales no se observan diferencias (252.8 mg_x/g_s con glucosa y 236.0 mg_x/g_s con lactosa), de la misma manera que al comparar los cultivos realizados con matraces bafleados no se observan diferencias (423.7 mg_x/g_s con glucosa y 425.0 mg_x/g_s con lactosa).

Yang and Liao, 1998 cultivaron a *G. lucidum* en diferentes velocidades de agitación y observaron que en a velocidades de 150-200 rpm se obtienen mayores cantidades de biomasa y mejores producciones de metabolitos secundarios, comparándolas con 50-100 rpm. Sus resultados sugieren que altas velocidades de agitación favorecen la producción de metabolitos secundarios debido a que decrece la absorción en las paredes celulares ocasionado por el estrés de corte, activando rutas para la producción de polisacáridos y aumentando la biomasa. Este estrés de corte puede ser similar al fenómeno que ocurre en los matraces bafleados cuando se utiliza *H. coffeata*, aun cuando se agitó a la misma velocidad (150 rpm) en ambos tipos de matraz. En los matraces bafleados hay un estrés constante al que los micelios están sometidos que no se encuentra en los matraces convencionales, que resultaría en el aumento de la biomasa observado en las cinéticas con matraces convencionales.

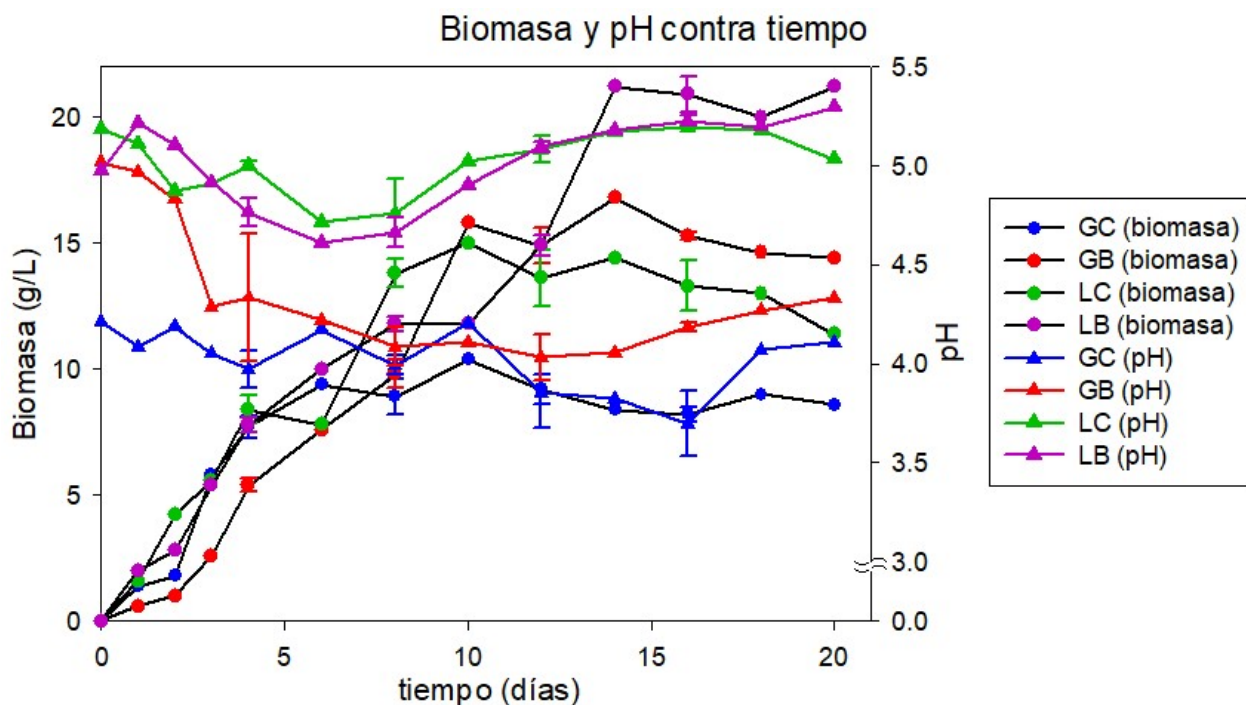


Figura 16. Cinética de crecimiento de *H. coffeata* en cultivos llevados a 30°C y 150 rpm. Biomasa en el eje derecho y pH en el eje izquierdo. (GC: glucosa en matraces convencionales; GB: glucosa en matraces bafleados; LC: lactosa en matraces convencionales; LB: lactosa en matraces bafleados).

El pH es uno de los factores químicos que influye directamente sobre el crecimiento del hongo y su producción de metabolitos secundarios, ya que afecta la función de la membrana celular, la morfología, la estructura, consumo de nutrientes, actividad enzimática (Elisashvili, 2012; Fraga, *et. al.* 2014).

Al evaluar la variación de pH en cada una de las cinéticas (Figura 16) se observa que en las cinéticas realizadas con lactosa la variación de pH es similar entre ambos tipos de matraz. A partir del pH inicial hay una disminución, llegando a un valor mínimo de 4.428 ± 0.274 en el día 6 y después con un aumento. La cinética realizadas con glucosa en matraces bafleados tiene el mismo patrón que las otras cinéticas, disminuyendo hasta llegar al día 12 donde el valor de pH vuelve a aumentar, aunque en esta cinética los valores de pH están una unidad debajo de los valores con las cinéticas con lactosa. En la cinética con glucosa en matraces convencionales donde el pH se acidificó y se observó el menor crecimiento del hongo. Esta acidificación de pH puede ser atribuida al error experimental ya que en esa cinética no se ajustó el pH inicial. En reportes anteriores del crecimiento de este hongo se observa este comportamiento (Porrás-Arboleda, *et. al.* 2009; García-García, 2014). En general se observa que *H. coffeata* detiene su crecimiento y, en consecuencia, el pH del medio comienza a elevarse.

Los perfiles de pH encontrados son consistentes (aunque no iguales) con los perfiles reportados por Fang and Zhong, 2002. En este reporte se estudiaron cultivos de *G. lucidum* a diferentes pH iniciales que abarcaron de 3.5 a 7.0 y en todos observaron que al día 4 del cultivo el pH decrece hasta 3.2 y después permanece constante hasta alrededor del día 12, cuando la mayoría de la fuente de carbono está agotada y el pH empieza a aumentar. Los autores sugieren con estos resultados que durante los primeros 5 días se presenta un alto consumo de la fuente de carbono que resulta en la producción de ácidos orgánicos, los cuales hacen que el pH en el medio disminuya. Fazenda, *et. al.* 2008 sugieren que el aumento del pH hacia el final del cultivo se debe al incremento de secreción de proteasas que degradan fuentes de nitrógeno.

Finalmente se debe tomar en cuenta que el pH óptimo dependerá de varios factores entre ellos el tipo o especie de organismo con el que se trabaja. Por ejemplo, en *G. lucidum* el pH inicial con el que se obtienen mejor cantidad de biomasa oscila entre 5.5-6.5, mientras que para polisacáridos se encuentra entre 3.5-4.5 (Fang and Zhong, 2002). En hongos como *Sparassis cripa* y *A. cinnamomea* el pH óptimo para el cultivo fue 5.0. En cultivos de *Cordyceps militaris* realizados en biorreactor con el controlado a pH 6.0 (Fazenda, et. al. 2008).

8.2.3 Evaluación de consumo de sustrato y crecimiento exponencial de biomasa de *H. coffeata*

Al evaluar las fases de crecimiento de *H. coffeata* (Figura 17) se observa que la fase exponencial de crecimiento acaba alrededor de los 8 días. Después *H. coffeata* empieza la fase estacionaria. A los 20 días del cultivo no se alcanza a ver un decaimiento que indique el inicio de la fase de muerte.

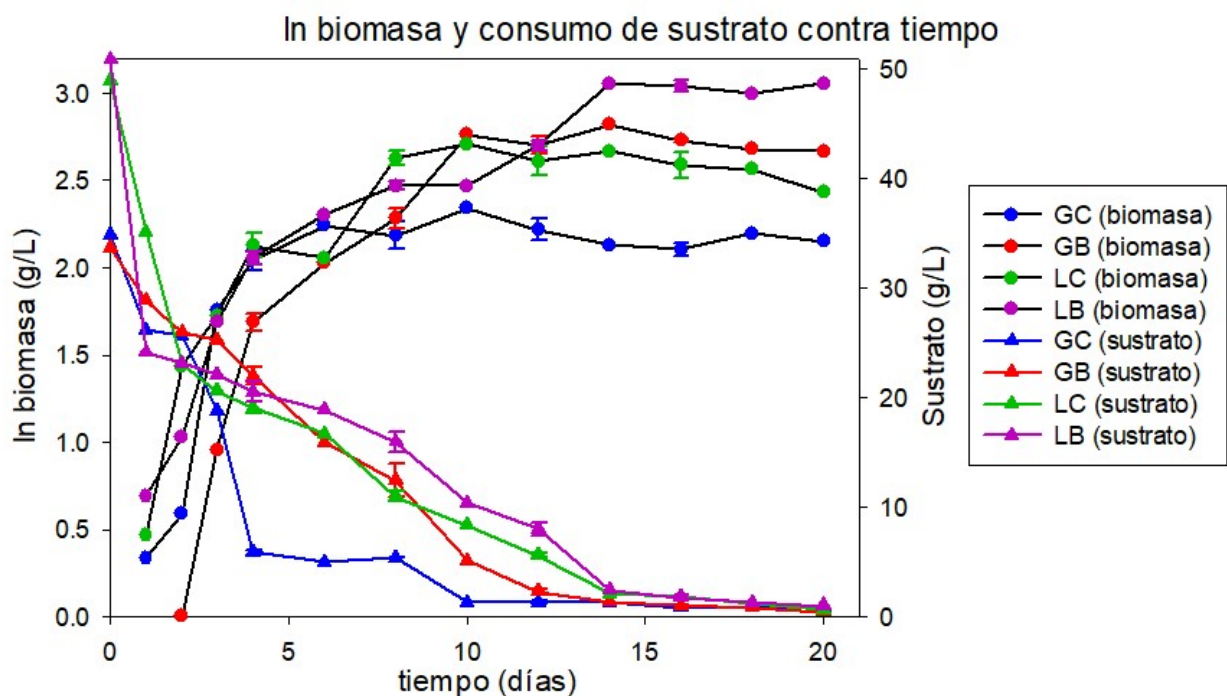


Figura 17. Cinética de crecimiento en escala logarítmica de *H. coffeata* en cultivos llevados a 30°C y 150 rpm. Logaritmo natural de biomasa en el eje derecho y consumo de sustrato en el eje izquierdo. (GC: glucosa en matraces convencionales; GB: glucosa en matraces bafleados; LC: lactosa en matraces convencionales; LB: lactosa en matraces bafleados).

El tipo de fuente de carbono utilizado es una variable importante, ya que es el componente nutritivo principal del medio, a partir del cual se obtiene la energía para producir biomasa, metabolitos, y estructuras (carbohidratos) para formar micelio de los hongos basidiomicetos (Blackwell, 2011). La glucosa fue escogida como fuente de carbono en el medio FZM (Fang and Zhong, 2002) porque es en donde se realizan los cultivos de *G. lucidum* para, posteriormente, realizar la extracción de ácidos triterpenoides. Mientras que la lactosa se eligió porque ya se ha demostrado que *H. coffeata* tiene una mayor cantidad de biomasa utilizando el medio MPO (Porras-Arboleda, 2007; Porras-Arboleda, *et. al.* 2009). A pesar de la diferencia entre cantidades iniciales de sustrato colocada (35 g/L de glucosa y 50g/L de lactosa), en todas las cinéticas se puede observar un uso exponencial del consumo de sustrato con comportamientos similares (Figura 17).

En las cinéticas realizadas en matraces convencionales hay una Q_s mayor (169.6 $\text{mg}_s/\text{g}_x\text{h}$ en glucosa y 127.9 $\text{mg}_s/\text{g}_x\text{h}$ en lactosa) en comparación con la velocidad específica de consumo de los matraces en cinéticas con matraces bafleados (101.3 $\text{mg}_s/\text{g}_x\text{h}$ en glucosa y 68.8 $\text{mg}_s/\text{g}_x\text{h}$ en lactosa) (Tabla 4). La Q_s parece no verse afectada por la fuente de carbono, sino por la geometría de los matraces utilizados. Esto es debido a las diferencias en la transferencia de oxígeno en los diferentes matraces. Los matraces bafleados permiten una mayor producción de biomasa, mientras que los matraces convencionales hay un consumo mayor del sustrato (García-García, 2014). Estos resultados tienen perfiles similares a los reportados en hongos como *G. lucidum*, *M. esculenta*, *L. edodes*, *Pleurotus sp.* Donde se han probado diferentes fuentes de carbono y, aunque en todas las fuentes de carbono usadas muestran crecimiento, los mejores resultados se obtuvieron usando glucosa como fuente de carbono (Fazenda, *et. al.* 2008; Elisashvili, 2012).

En los reportes previos (Porras-Arboleda, *et. al.* 2009; García-García, 2014) se encontró que la lactosa es la mejor fuente de crecimiento para *H. coffeata*, lo cual es consistente con lo encontrado en la cantidad de biomasa. Sin embargo, en este reporte se encontró que la glucosa tiene un mejor rendimiento $Y_{x/s}$. Esta diferencia

puede ser debida a la diferencia de cantidad inicial de g/L de los sustratos (mencionada anteriormente). En algunos cultivos de hongos como *A. niger* la lactosa se metaboliza lentamente y en algunos casos no se consume por completo, es considerada como una fuente de carbono pobre para el crecimiento de hongos ya que puede actuar como un represor catabólico (Fekete, *et. al.* 2008).

8.2.4 Evaluación de producción de triterpenoides de *H. coffeata*

8.2.4.1 Evaluación de producción de triterpenoides totales en sobrenadante

En el ensayo colorimétrico se observó que hubo formación de un compuesto rojocafé y que su absorbancia y concentración fue aumentando a lo largo de los 20 días de cada una de las cinéticas, aunque con este método no es posible determinar cuáles son los triterpenoides producidos (Figura 18).

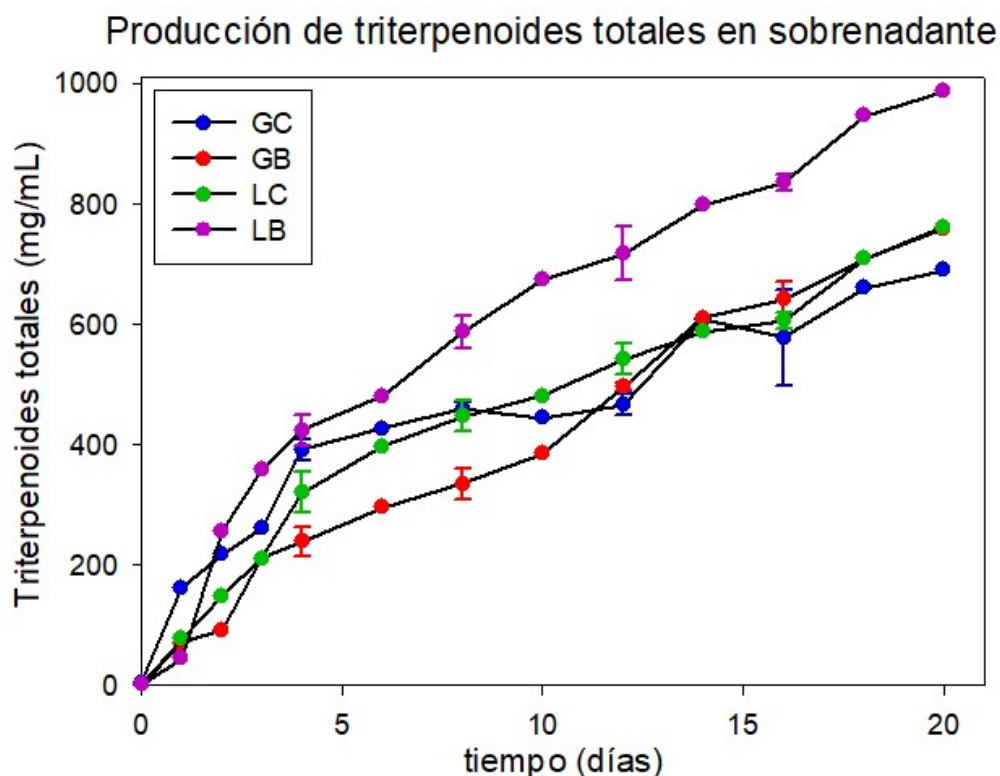


Figura 18. Cinética de producción de triterpenoides totales en sobrenadante de *H. coffeata* en cultivos llevados a 30°C y 150 rpm. (GC: glucosa en matraces convencionales; GB: glucosa en matraces bafleados; LC: lactosa en matraces convencionales; LB: lactosa en matraces bafleados).

En las cinéticas con lactosa se observa una mayor concentración final de triterpenoides totales producidos (761 mg_p/L en matraces convencionales, y 986 mg_p/L en matraces bafleados) con respecto a las cinéticas con glucosa (690 mg_p/L en matraces convencionales, y 758 mg_p/L en matraces bafleados) (Figura 18). Sin embargo, los valores más altos de $Y_{p/s}$ y de Q_p se obtienen en la cinética con glucosa en matraces convencionales (79.7 mg_p/g_x, 829.7 mg_p/g_xh, respectivamente), mientras que en la cinética con lactosa en matraces bafleados se obtuvo el menor $Y_{p/s}$ (46.4 mg_p/g_x) y la menor Q_p (483.5 mg_p/g_xh). Al evaluar la P_v se observa que la mayor productividad de triterpenoides totales se encuentra en los matraces bafleados con lactosa (10.3 mg_p/Lh), mientras que el valor más bajo de productividad volumétrica de triterpenoides totales se obtuvo en la cinética de glucosa con matraces convencionales (7.2 mg_p/Lh) (Tabla 4).

Comparando las concentraciones finales de triterpenoides se observa que en los matraces bafleados hay una mayor producción, específicamente cuando hay lactosa en el medio, lo que sugiere que la producción de estas moléculas se da cuando el micelio está siendo sometido a un estrés hidrodinámico constante. De igual manera, se observa que la geometría de matraz tiene un impacto en el $Y_{p/s}$ para triterpenoides obtenidos del cultivo de *H. coffeata*. Sin embargo, cuando se comparan el rendimiento $Y_{p/s}$ entre los medios de cultivo, se también se perciben diferencias, dejando ver que la selección de fuente de carbono es un factor importante para la obtención de mayores rendimientos, siendo glucosa la fuente de carbono que presentó mayores rendimientos de terpenoides. Esto es contrario a lo reportado para los EPS, en donde el $Y_{p/s}$ mayor se encuentran al utilizar lactosa como fuente de carbono en comparación de cuando se utiliza lactosa (García-García, 2014). Esto es debido a que en los cultivos con glucosa se alcanza una concentración de triterpenoides final similar en orden de magnitud a los cultivos con lactosa, pero con la mitad de la biomasa final, por lo que esta última condición no se considera la óptima. Finalmente, estos resultados indican que las condiciones óptimas de producción de triterpenoides son con glucosa en el medio utilizando

matraces convencionales, donde se encuentra el mayor rendimiento $Y_{p/x}$ y la mayor Q_p .

8.2.4.2 Extracción y cuantificación de ácidos triterpenoides

No todos los triterpenoides presentes cuantificados previamente pueden ser de naturaleza ácida, sino que también se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas, o terpenoides sin grupos funcionales oxigenados. Para hacer la diferenciación entre estos grupos funcionales fue necesario realizar extracciones específicas para moléculas de carácter ácido. Para realizar la cuantificación de triterpenoides de tipo ácido se realizó la extracción de los mismos a partir del micelio con un protocolo específico para la obtención de ácidos triterpenoides (Tang and Zhong, 2002). Este protocolo se realizó para cada muestra de micelio y sobrenadante obtenidas para cada cinética, para evaluar cuál de las cinéticas tiene una mejor producción específica de ácidos triterpenoides y de qué parte provienen: micelio o sobrenadante.

Se encontró que la concentración de ácidos triterpenoides va en aumento a lo largo de cada una de las cinéticas (Figura 19). Los valores más altos de rendimiento producto/biomasa y productividad específica de nuevo se encontraron en la cinética realizada con glucosa en matraces convencionales ($1335.23 \mu\text{g}_p/\text{g}_x$, y $13.9 \mu\text{g}_p/\text{g}_x\text{h}$, respectivamente en muestras de micelio, y $19\ 093.0 \mu\text{g}_p/\text{g}_x$, y $198.9 \mu\text{g}_p/\text{g}_x\text{h}$, respectivamente en muestras de sobrenadante) (Tabla 4). Los valores más bajos de rendimiento producto/biomasa y productividad específica se obtuvieron en la cinética de lactosa en matraces bafleados ($485.85 \mu\text{g}_p/\text{g}_x$, y $5.1 \mu\text{g}_p/\text{g}_x\text{h}$, respectivamente en muestras de micelio, y $10\ 330.2 \mu\text{g}_p/\text{g}_x$, y $107.6 \mu\text{g}_p/\text{g}_x\text{h}$, respectivamente en muestras de sobrenadante) a pesar de que en esta cinética se obtuvo la mayor cantidad de biomasa. Es importante considerar la productividad específica y no la concentración total de ácidos triterpenoides a lo largo del cultivo por el tiempo de crecimiento del hongo y para conocer las condiciones óptimas en caso de querer llevar el cultivo a una escala mayor.

Se observó que los ácidos triterpenoides son más abundantes en el sobrenadante que en el micelio (Figura 19), donde se obtienen resultados similares de entre las cinéticas realizadas con glucosa en matraces bafleados y lactosa en matraces convencionales, y valores similares entre las otras dos cinéticas. Finalmente, el valor de concentración más alto de ácidos triterpenoides en sobrenadante se alcanzó a los 20 días con la cinética de lactosa en matraces bafleados (221.9 mg/L). Estos resultados confirman que la mejor fuente de carbono para crecer *H. coffeata* para la obtención de ácidos triterpenoides es la glucosa en matraces convencionales, a pesar de que se sabe que *H. coffeata* tiene un mayor crecimiento en un medio con lactosa (Porras-Arboleda, 2007; Porras-Arboleda, *et. al.* 2009) y de las diferencias en morfología y cantidad de biomasa obtenidas con respecto a las cinéticas de lactosa o en matraces bafleados (García-García, 2014).

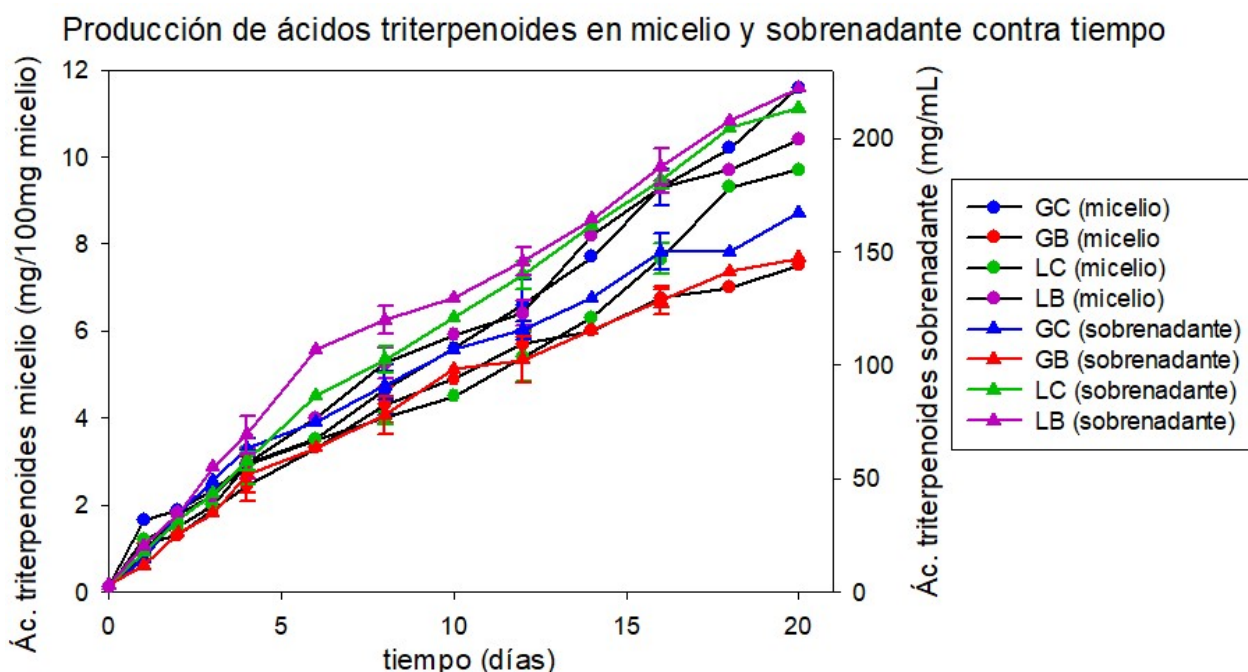
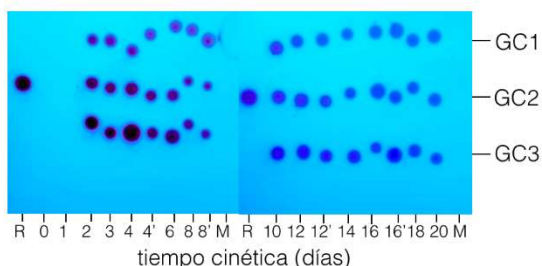


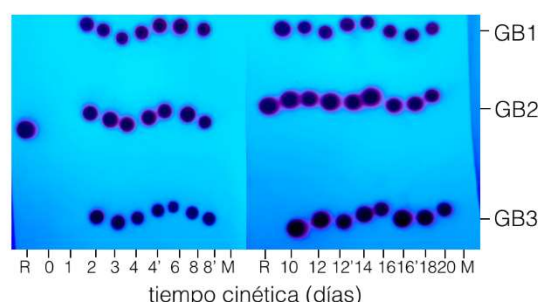
Figura 19. Cinética de producción de ácidos triterpenoides de *H. coffeata* en cultivos llevados a cabo a 30°C y 150 rpm. Muestras de micelio en el eje izquierdo y muestras de sobrenadante en el eje derecho. (GC: glucosa en matraces convencionales; GB: glucosa en matraces bafleados; LC: lactosa en matraces convencionales; LB: lactosa en matraces bafleados).

8.3 Prueba de identidad de ácidos triterpenoides en TLC

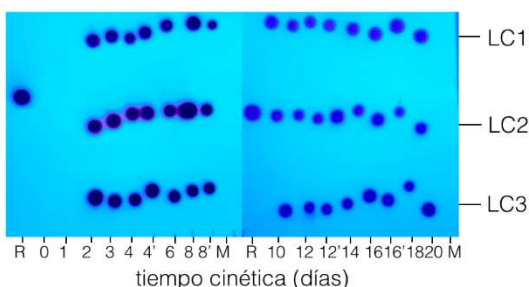
En las placas donde se eluyeron las muestras de ácidos triterpenoides extraídas a partir de micelios (observadas con luz UV y posteriormente con H₂SO₄) se encontró la presencia de compuestos triterpenoides, en el que cada una de las muestras tiene tres marcas que eluyen en cada uno de los días de la cinética, excepto el día 0 y el día 1 (Figura 20 y 21).



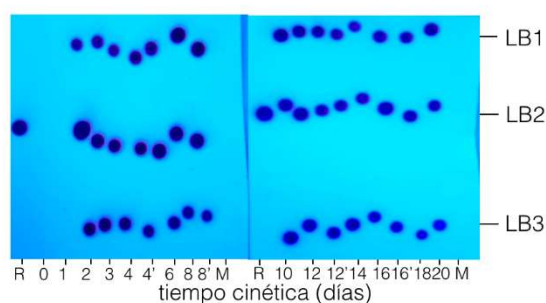
Glucosa Convencional



Glucosa Bafleado



Lactosa Convencional



Lactosa Bafleado

Figura 20. Muestras de micelio de cada cinética reveladas bajo luz UV, donde los números son cada día de la cinética incluidas las repeticiones en los días 4, 8, 12 y 16. R es la referencia de ácido ursólico y M es el medio sin inocular.

En las muestras eluidas a partir de los sobrenadantes se encontró que todas las cinéticas tienen tres marcas que eluyen en cada uno de los días de la cinética, excepto el día 0 y el día 1. En las muestras del medio con lactosa en matraces convencionales se encontró que había una banda más que no se encontró en el resto de las muestras (Figuras 22 y 23).

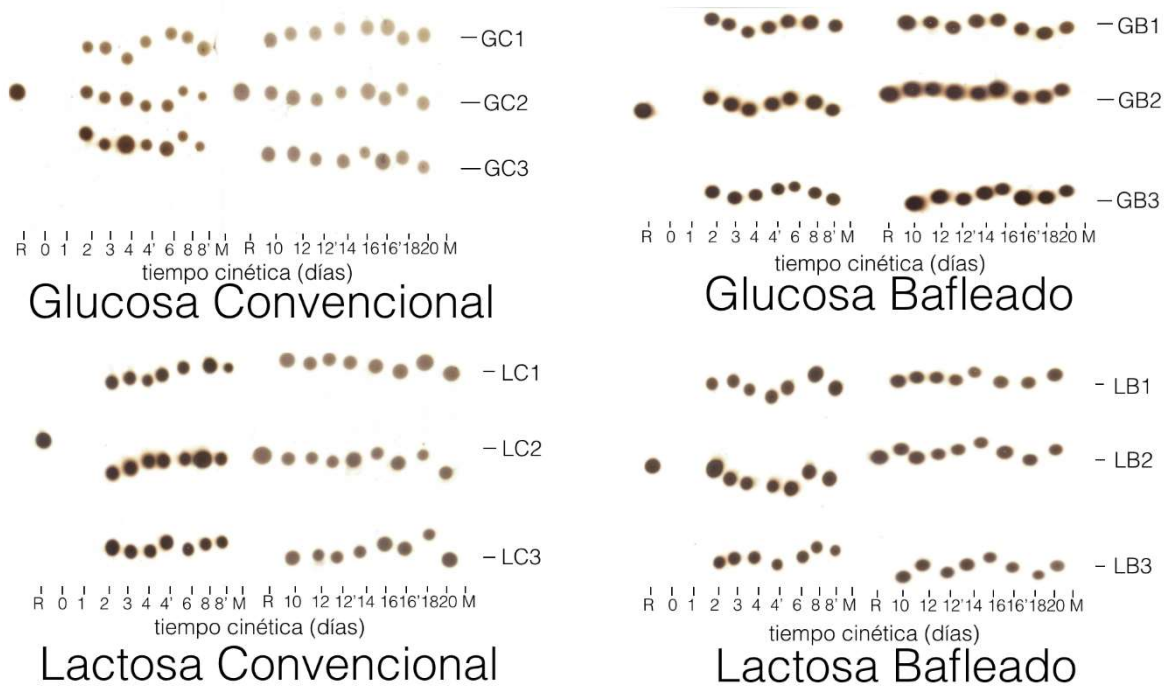


Figura 21. Muestras de micelio de cada cinética reveladas con H_2SO_4 al 10% en MetOH y calor, donde los números son cada día de la cinética incluídas las repeticiones en los días 4, 8, 12 y 16. R es la referencia de ácido ursólico y M es el medio sin inocular.

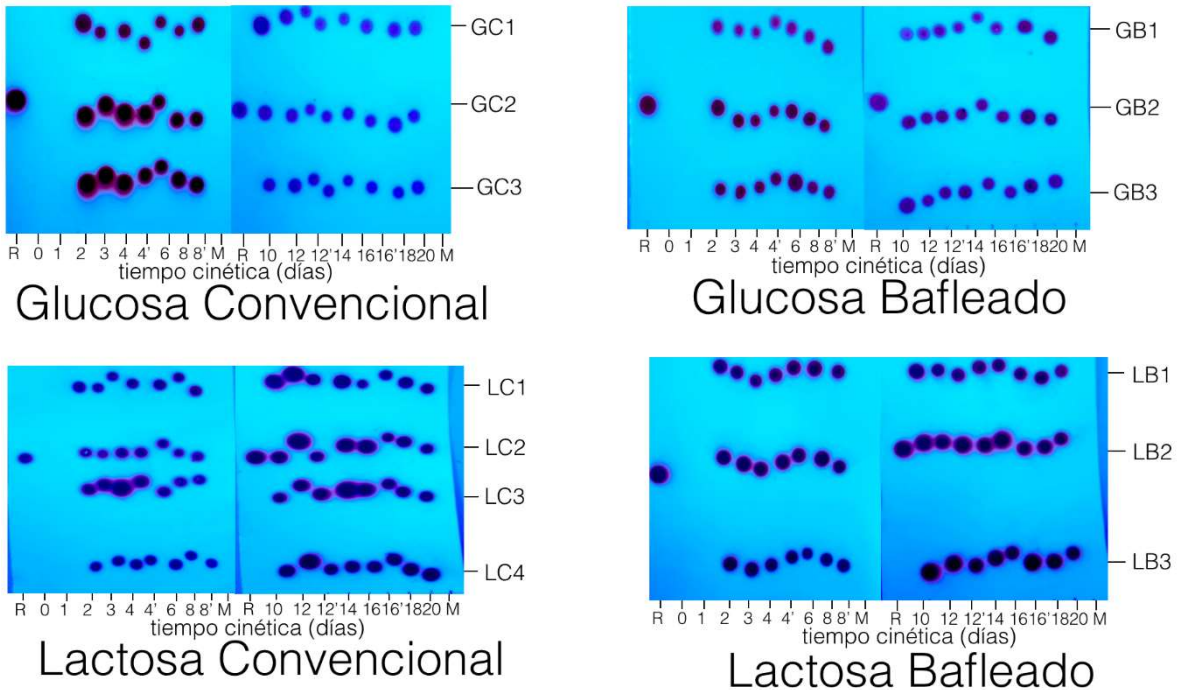


Figura 22. Muestras de sobrenadante de cada cinética reveladas bajo luz UV, donde los números son cada día de la cinética incluídas las repeticiones en los días 4, 8, 12 y 16. R es la referencia de ácido ursólico y M es el medio sin inocular.

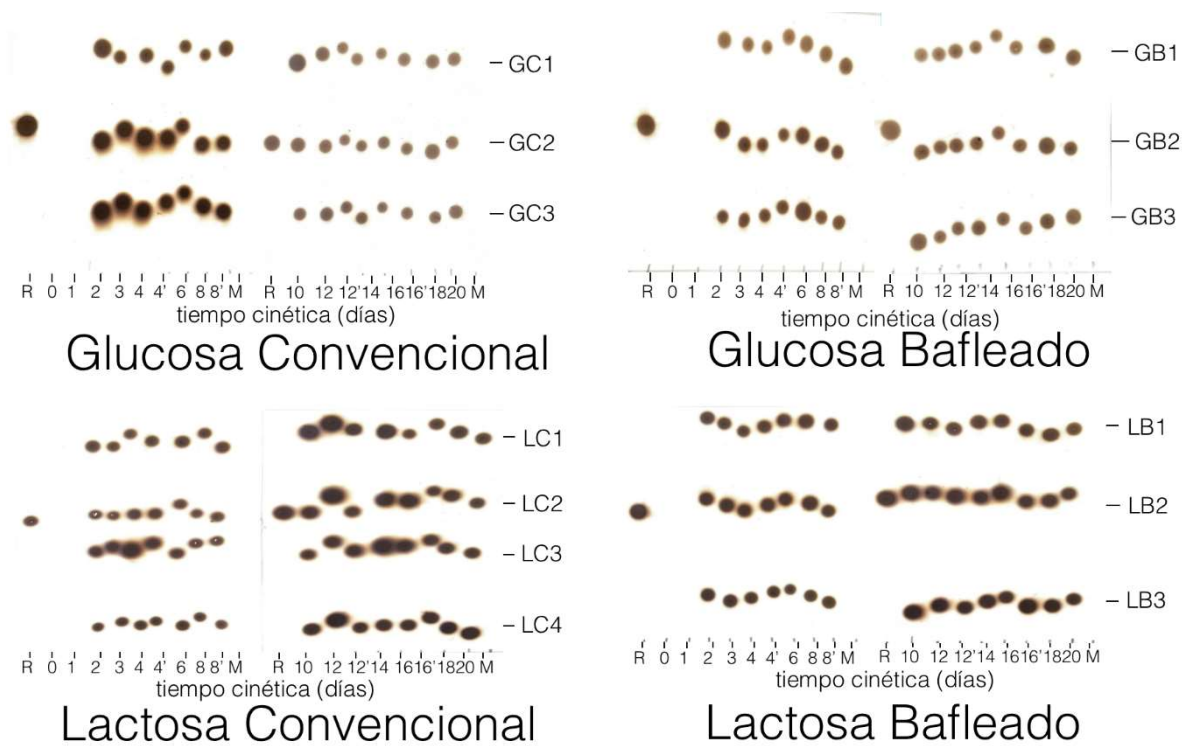


Figura 23. Muestras de sobrenadante de cada cinética reveladas con H_2SO_4 al 10% en MetOH y calor, donde los números son cada día de la cinética incluídas las repeticiones en los días 4, 8, 12 y 16. R es la referencia de ácido ursólico y M es el medio sin inocular.

En las figuras 20-23 se observan cualitativamente diferencias entre cada uno de los días dentro de la misma cinética. Esto puede ser causado por el error experimental al tratar de colocar las muestras sobre la misma zona de la placa TLC. Sin embargo, en la figuras 20 y 21 en la cinética con glucosa en matraces convencionales se perciben diferencias entre las fracciones 1, 2 y 3. Esto podría ser causado por los diferentes compuestos que componen cada una de las fracciones puede variar su concentración a lo largo de la cinética, modificando la migración de cada muestra. Esto se ha observado en placas donde cada una de las muestras no es completamente pura y en los compuestos hay variaciones de uno o dos átomos en sus estructuras (Pendela, *et. al.* 2010, Gondova and Petrikova, 2010). Otra de las razones por las que existen diferencias entre los ácidos obtenidos a lo largo de cada una de las cinéticas realizadas puede ser por diferentes factores en las condiciones de cultivo como la aireación y la fuente de carbono. Esto se ha visto en *H. coffeata* en la producción y constitución de los EPS, debido a que se ha demostrado que diferentes fuentes de carbono pueden afectar la proporción de monosacáridos y

grupos funcionales amino, sulfuro y fosfato que constituyen a los EPS (García-García, 2014; Wu, *et. al.* 2014), por lo que se podría suponer que lo mismo está sucediendo en los diferentes ácidos triterpenoides.

Finalmente, otra causa de las diferencias entre cada uno de los ácidos por la que esto puede ser ocasionado es que cada una de las muestras proviene de matraces diferentes. Para analizar estas opciones, se se calculó el Rf del ácido ursólico en todas las placas de TLC y se obtuvo el valor 0.54 ± 0.04 (Tabla 5). Esta desviación estándar se utilizó como referencia para determinar que una desviación estándar mayor a 0.04 puede ser ocasionada por diferentes compuestos, mientras que una desviación estándar menor a 0.04 puede ser ocasionada por el uso de diferentes matraces cada día. En la literatura donde se reportan validaciones de métodos para TLC se encontró que no hay diferencias entre compuestos cuando en el Rf cuando se obtiene una desviación estándar para el mismo compuesto menor a 0.05 (Dolowy, *et. al.* 2014, Szepesi and Nyiredy, 1992). En las placas TLC realizadas, se calculo el Rf de cada una de las marcas observadas. Para cada una de las fracciones se calculó el promedio del Rf y su desviación estándar (Tabla 5). Todas las desviaciones estándar de cada una de las bandas son igual o menores a 0.04, por lo que se corrobora que las diferencias observadas cualitativamente por el uso de diferentes matraces cada día.

Tabla 5. Rf promedio de la referencia utilizada (ácido ursólico) y de cada una de las bandas de las placas TLC, tanto de micelio como de sobrenadate, junto con sus desviaciones estándar (GC: fracciones de matraces convencionales con glucosa, GB: fracciones de matraces bafleados con glucosa, LC: fracciones de matraces convencionales con lactosa, LB: fracciones de matraces bafleados con lactosa).

Banda	Ác. Ursólico	GC1	GC2	GC3	GB1	GB2	GB3
Promedio	0.59	0.87	0.58 ^a	0.23 ^{a, b}	0.89 ^{b, c}	0.54 ^{a, c}	0.19 ^{a, b}
Desv. Est.	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03
Banda	LC1	LC2	LC3	LC4	LB1	LB2	LB3
Promedio	0.91 ^{b, c}	0.62 ^{a, c}	0.51 ^{a, c}	0.19 ^{a, b}	0.91 ^{b, c}	0.56 ^{a, c}	0.19 ^{a, b}
Desv. Est.	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04	0.02

a: diferencia estadísticamente significativa con respecto a GC1; $p < 0.05$.

b: diferencia estadísticamente significativa con respecto a GC2; $p < 0.05$.

c: diferencia estadísticamente significativa con respecto a GC3; $p < 0.05$.

Al realizar la comparación estadística entre cada uno de los Rfs de cada una de las fracciones, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones GC1, GB1, LC1 y LB1, entre las fracciones GC2, GB2, LC2, LC3 y LB2, y entre las fracciones GC3, GB3, LC4 y LB3 (Tabla 5). Por esta razón se asumió que las marcas observadas en las condiciones con glucosa en matraces convencionales y matraces bafleados, y con lactosa en matraces bafleados son lo suficientemente similares entre sí. Se decidió utilizar únicamente las tres fracciones provenientes de la cinética con glucosa en matraces convencionales para los experimentos posteriores. Por otra parte, las marcas de la cinética con lactosa en matraces convencionales, son diferentes y aunque su fracción 1 y 4 son estadísticamente similares a las fracciones 1 y 3 de glucosa se decidió que para los siguientes ensayos se utilizaran las cuatro fracciones que componen las fracciones de lactosa.

8.4 Evaluación de actividad citotóxica

8.4.1 Evaluación de citotoxicidad de extractos totales

En las placas donde los extractos se dejaron en contacto con las líneas celulares durante 48 horas se observó que en general la línea Jurkat E6 es más sensible que la línea K562. En el extracto con glucosa sobre la línea celular Jurkat E6 se observa que empieza a haber una citotoxicidad estadísticamente significativa ($\geq 10\%$ citotoxicidad) a partir de la concentración de $10 \mu\text{g/mL}$, mientras que en el extracto con lactosa sobre las células Jurkat E6 se observa que la citotoxicidad estadísticamente significativa se da a partir de la concentración de $25 \mu\text{g/mL}$. Este mismo comportamiento se observa sobre la línea celular K562 (Figura 24). Al dejar los extractos en contacto con las líneas celulares por 72 horas se observó el mismo comportamiento con cada uno de los extractos para cada línea celular (Figura 25).

Para poder comparar los extractos con los ácidos ganodéricos y lucidénicos reportados en la literatura se tienen que tener las moléculas puras que componen el extracto y realizar los ensayos únicamente con ellas. Sin embargo, se pueden calcular las concentraciones inhibitorias de la media de la población (CC_{50}) para

cada uno de los extractos (glucosa y lactosa) con cada una de las líneas celulares para poder compararlos entre sí (Tabla 6) (anexo 12.7) (análisis estadísticos anexo 12.8). Se observó que el extracto de glucosa elimina a la mitad de la población celular con una concentración menor que el extracto de lactosa, independientemente de la línea celular. El efecto citotóxico es dependiente del tiempo de exposición al extracto, y que la línea celular Jurkat E6 es más sensible a los extractos que la línea celular K562.

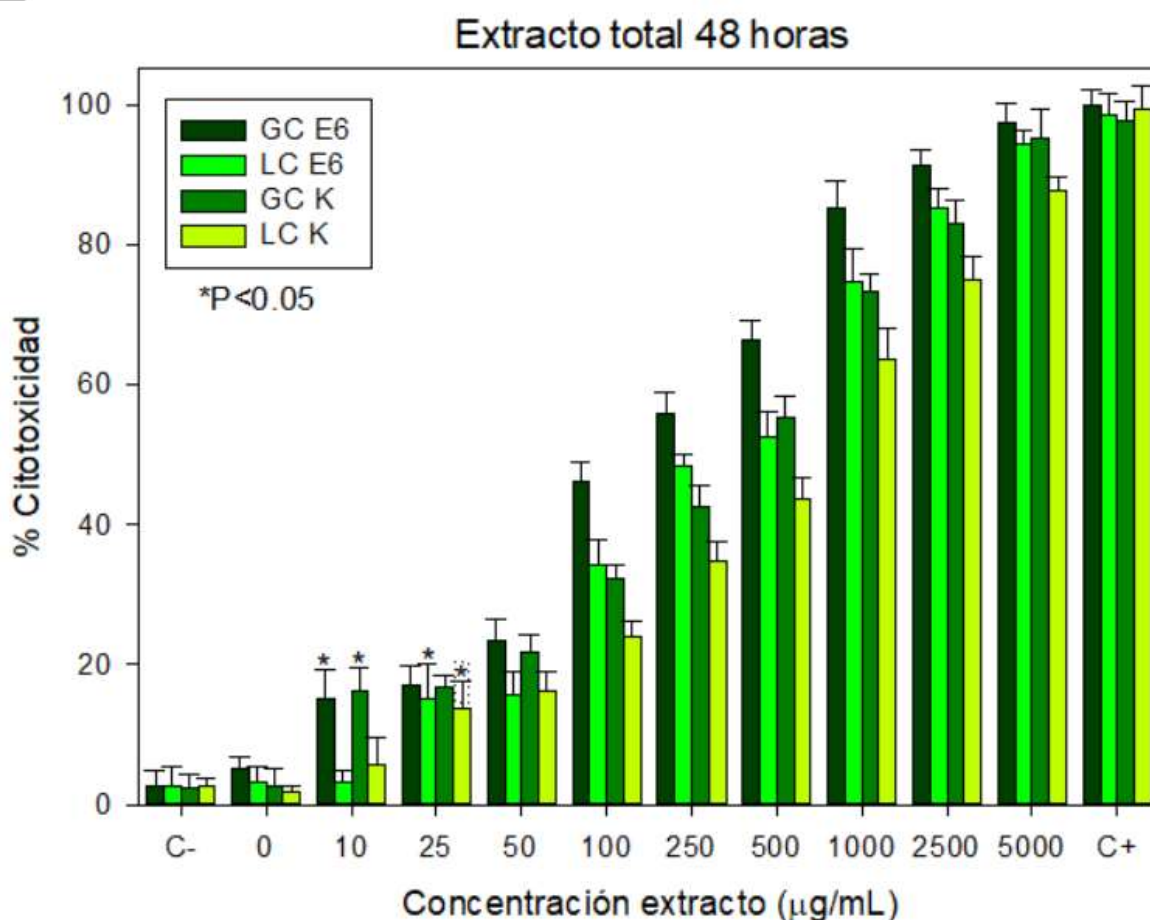


Figura 24. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 48 horas para líneas celulares Jurkat E6 (E6) y K562 (K) tratadas con extractos obtenidos de muestras en glucosa (GC) o en lactosa (LC) en matraces convencionales. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

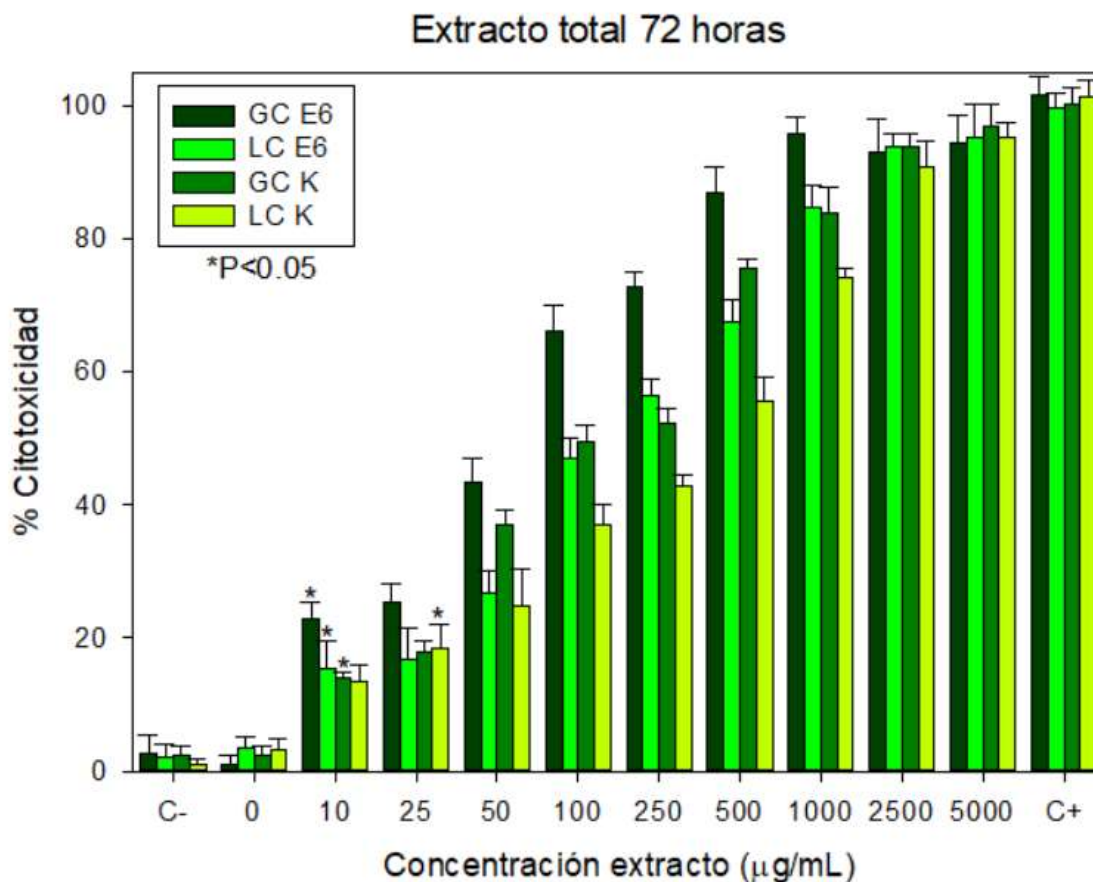


Figura 25. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 72 horas para líneas celulares Jurkat E6 (E6) y K562 (K) tratadas con extractos obtenidos de muestras en glucosa (GC) o en lactosa (LC) en matraces convencionales. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en $\mu\text{g/mL}$, y C+ se refiere a las células tratadas con H_2O_2 al 3%.

Tabla 6. CC_{50} de los extractos de glucosa (GC) y lactosa (LC) evaluados para las líneas celulares Jurkat E6 y K562.

	t (h)	GC ($\mu\text{g/mL}$)	LC ($\mu\text{g/mL}$)
Jurkat E6	48	159.9 \pm 8.1	275.2 \pm 23.0 ^a
	72	136.7 \pm 9.9	188.1 \pm 12.7 ^{a, b}
K562	48	270.9 \pm 20.1 ^c	487.8 \pm 9.2 ^{a, c}
	72	203.2 \pm 7.8 ^{b, c}	395.9 \pm 10.9 ^{a, b, c}

a: diferencia estadísticamente significativa con respecto al extracto; $p < 0.05$.

b: diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo; $p < 0.05$.

c: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la línea celular; $p < 0.05$.

Se observa que las CC₅₀ están dentro del orden de magnitud de los compuestos encontrados en las Tablas 1 y 2 (p. 19 y 20; ácidos ganodéricos y lucidénicos con actividad antitumoral sobre leucemia reportados en la literatura), aunque el hecho de que continúen siendo extractos totales podría estar causando tanto un sinergismo como un antagonismo en la actividad antitumoral (Zhu, *et. al.* 2000; Weng, *et. al.* 2010).

Se ha reportado que se ha expuesto a las células K562 a diferentes concentraciones de compuestos de hongos como *Cladonia furcata* y *Cordyceps gunnii* usando diferentes tiempos de exposición (Lin, *et. al.* 2001; Zhu, *et. al.* 2012), donde se observa que las concentraciones utilizadas variaron de 25 a 800 µg/mL. Para el caso de *C. furcata*, la concentración con mayor citotoxicidad fue de 800 µg/mL eliminando al 52.7% de las células K562 (Lin, *et. al.* 2001). Para el caso de *C. gunnii*, la concentración de 400 µg/mL, eliminó hasta un 56.67% el crecimiento celular (Zhu, *et. al.* 2012). Estos resultados son muy contrastantes respecto a los obtenidos a partir del extracto con glucosa de *H. coffeata*, donde las CC₅₀ más alta encontrada que eliminan el crecimiento al 50% es de 270.9 ± 20.1 sobre la línea celular K562 a las 48 horas. Para el extracto con lactosa, la CC₅₀ es similar a la reportada en estos otros hongos (Lin, *et. al.* 2001; Zhu, *et. al.* 2012).

8.4.2 Evaluación de citotoxicidad con fracciones del extracto de glucosa

En las placas donde se colocaron diferentes concentraciones de las fracciones del extracto de glucosa y se dejaron en contacto con las líneas celulares durante 48 horas se observó que en general la línea Jurkat E6 es más sensible que la línea K562, mientras que las fracciones 1 y 3 tienen un efecto citotóxico mayor que la fracción 2, donde la fracción 1 causa la mayor citotoxicidad (Figuras 26 y 27).

En la fracciones 1, 2 y 3 evaluadas sobre la línea celular Jurkat E6 se observa que empieza a haber una citotoxicidad estadísticamente significativa ($\geq 10\%$ citotoxicidad) a partir de la concentración de 10 µg/mL. Mientras que en la línea celular K562 la fracción 1 y 3, comienzan a presentar una citotoxicidad significativa

a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la fracción 2 empieza a haber una citotoxicidad significativa a partir de la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 26 y 27). Además de llevaron a cabo evaluaciones a las 72 horas de cultivo, donde se observó un efecto similar al encontrado a las 48 horas (Figuras 28 y 29).

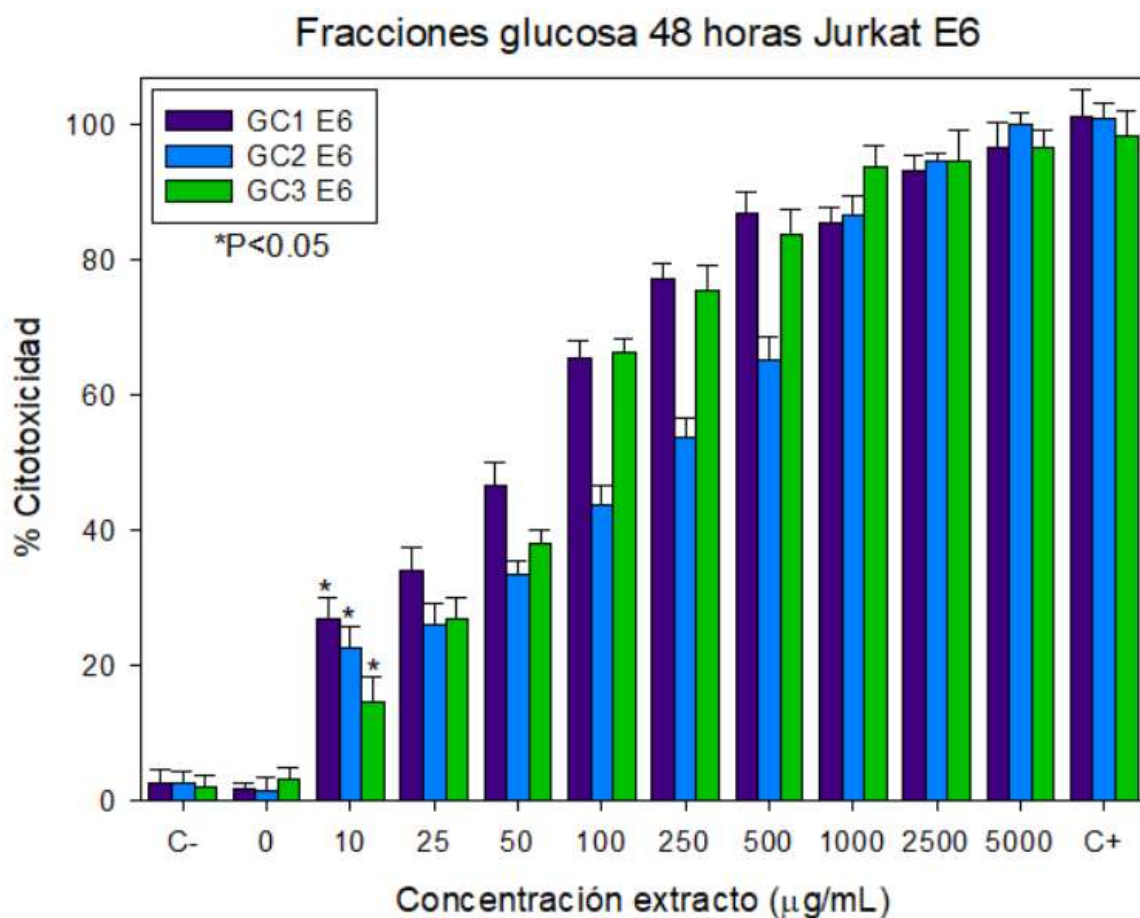


Figura 26. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 48 horas para la línea celular Jurkat E6 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de glucosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en $\mu\text{g/mL}$, y C+ se refiere a las células tratadas con H_2O_2 al 3%.

Fracciones glucosa 48 horas K562

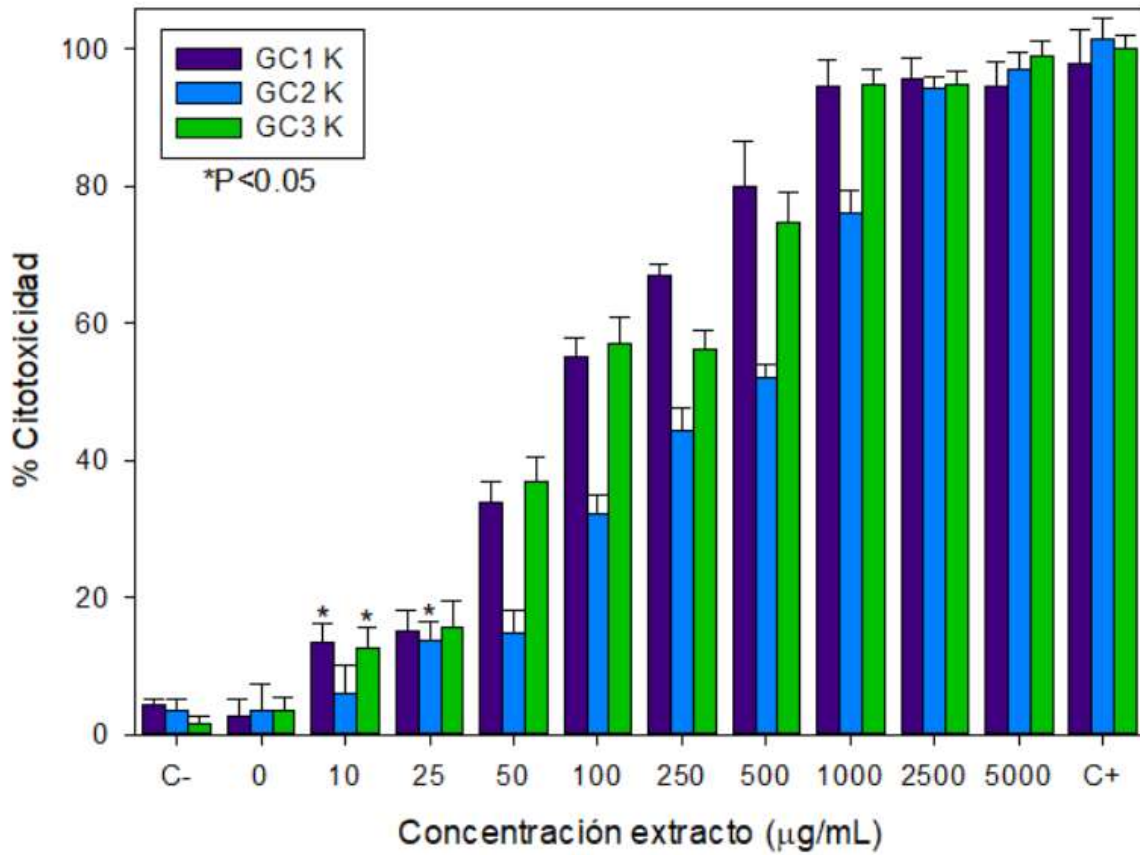


Figura 27. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 48 horas para la línea celular K562 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de glucosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

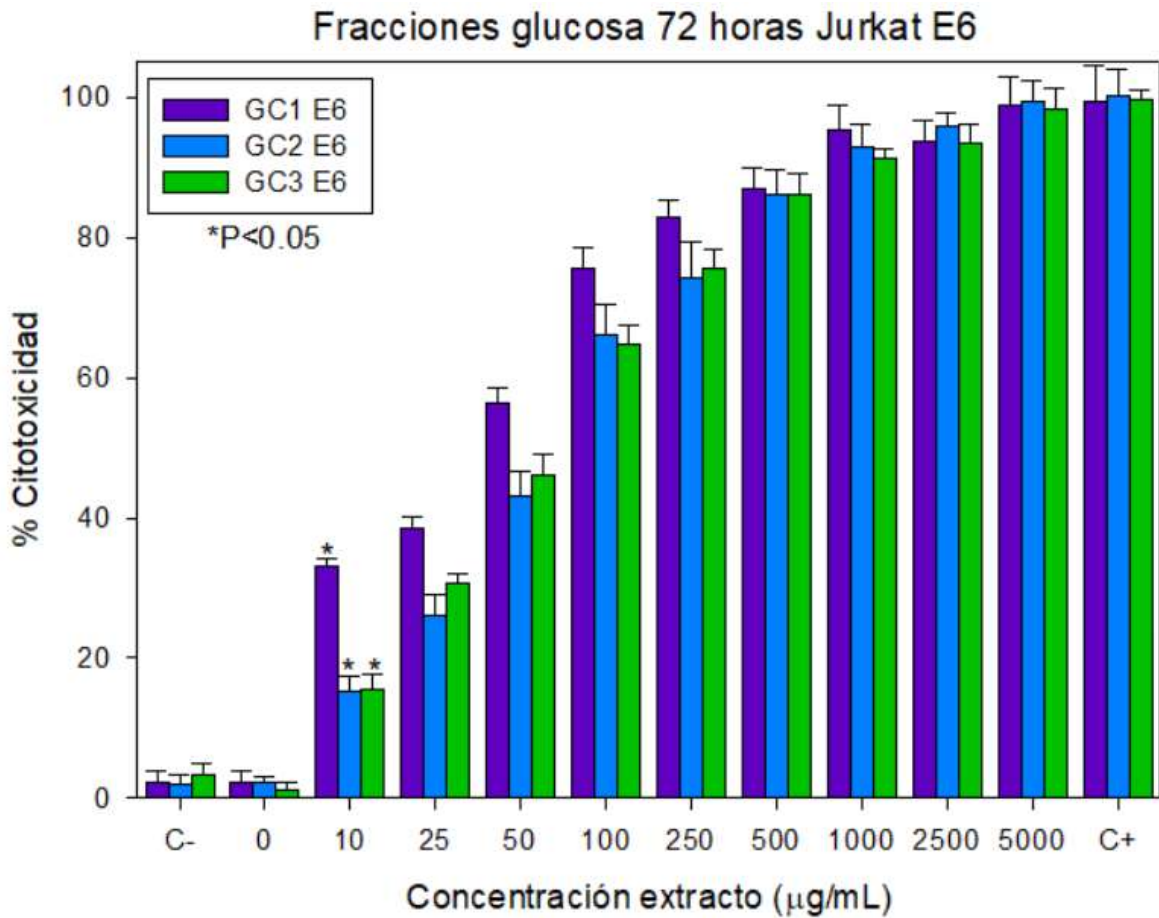


Figura 28. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 72 horas para la línea celular Jurkat E6 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de glucosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

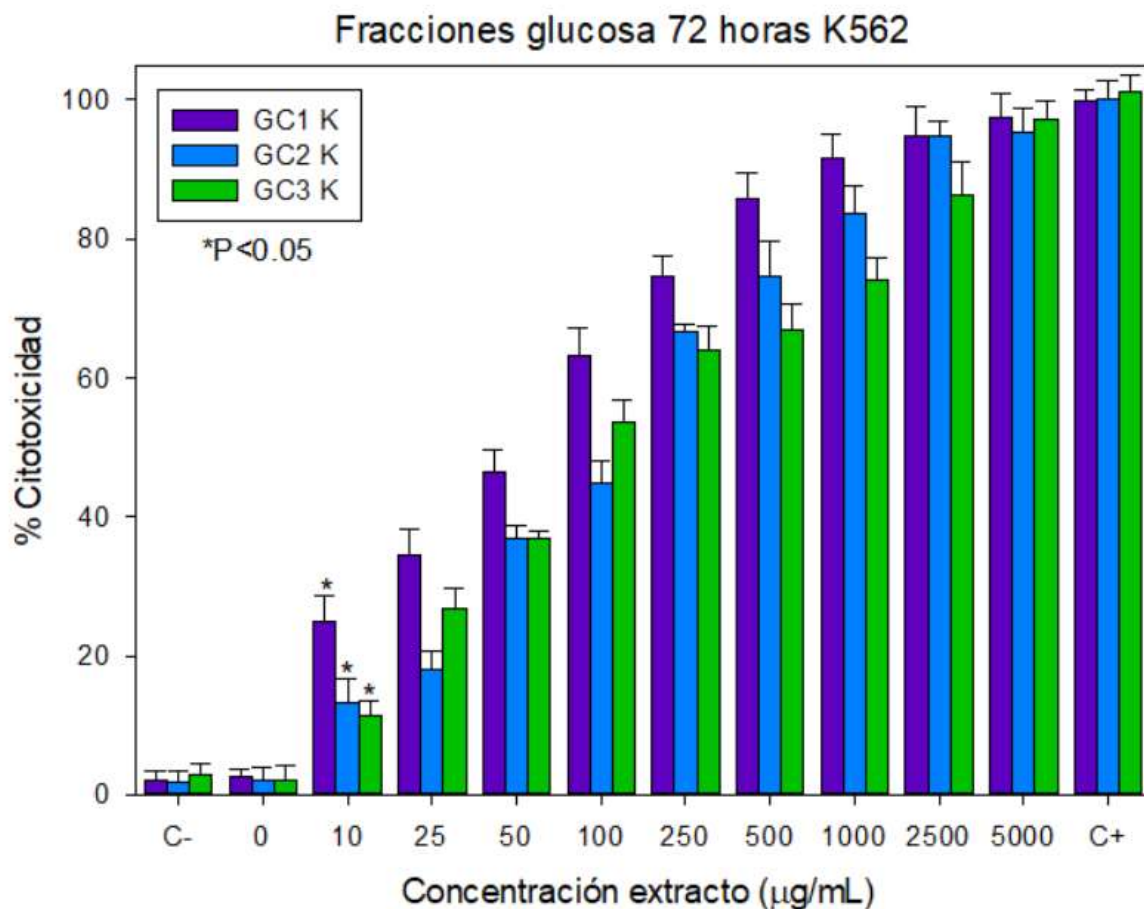


Figura 29. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 72 horas para la línea celular K562 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de glucosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

Tabla 7. CC₅₀ de las fracciones del extracto de glucosa evaluadas (fracción 1 GC1, fracción 2 GC2, fracción 3 GC3) para las líneas celulares Jurkat E6 y K562.

	t (h)	GC1 (µg/mL)	GC2 (µg/mL)	GC3 (µg/mL)
Jurkat E6	48	55.9 ± 6.5	260.3 ± 15.9 ^a	74.0 ± 9.7 ^{a, b}
	72	27.9 ± 4.4 ^c	103.5 ± 2.5 ^{a, c}	40.8 ± 3.8 ^{b, c}
K562	48	153.4 ± 7.8 ^d	365.3 ± 8.3 ^{a, d}	98.7 ± 4.8 ^{a, b, d}
	72	94.1 ± 6.0 ^{c, d}	124.5 ± 5.0 ^{a, c, d}	60.1 ± 5.9 ^{a, b, c, d}

a: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la fracción 1; p<0.05.

b: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la fracción 2; p<0.05.

c: diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo; p<0.05.

d: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la línea celular; p<0.05.

Se calcularon las CC_{50} de cada una de las fracciones para cada una de las líneas celulares (Tabla 7) (anexo 12.7) (análisis estadísticos anexo 12.8). Al comparar cada una de las fracciones entre sí, se observa que la fracción 1 tiene la concentración inhibitoria más baja, seguida de la fracción 3 y de la fracción 2, independientemente de la línea celular. También se observa que el efecto citotóxico es dependiente del tiempo de exposición de cada una de las fracciones sobre las líneas celulares, ya que la concentración inhibitoria disminuye al aumentar el tiempo. Nuevamente se observa que la línea celular K562 es más resistente a estos compuestos que la línea celular Jurkat E6 (Tabla 7) (Gao, *et. al.* 2004; Lin, *et. al.* 2013; Weng, *et. al.* 2010).

8.4.3 Evaluación de citotoxicidad con fracciones del extracto de lactosa

En las placas de 96 pozos donde se colocaron diferentes concentraciones de las fracciones del extracto de lactosa y se dejaron en contacto con las líneas celulares Jurkat E6 y K562 durante 48 horas se observó que en general la línea Jurkat E6 es más sensible que la línea K562 (Figuras 30 y 31).

En las fracciones 1 y 2 sobre la línea celular E6 se observa que empieza a haber una citotoxicidad significativa a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en las fracciones 3 y 4 se observa que empieza a haber una citotoxicidad significativa a partir de la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30). Sin embargo en la línea celular K562 se observó que empieza a haber una citotoxicidad significativa de las 4 fracciones a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 31). Además en las placas de 96 pozos se cuantificó la citotoxicidad de las fracciones del extracto de lactosa durante 72 horas, y se observó un efecto citotóxico similar sobre cada una de las líneas celulares a las 48 horas (Figuras 32 y 33). Se calculó la CC_{50} de cada una de las fracciones para cada una de las líneas celulares (Tabla 8) (anexo 12.7) (análisis estadísticos anexo 12.8).

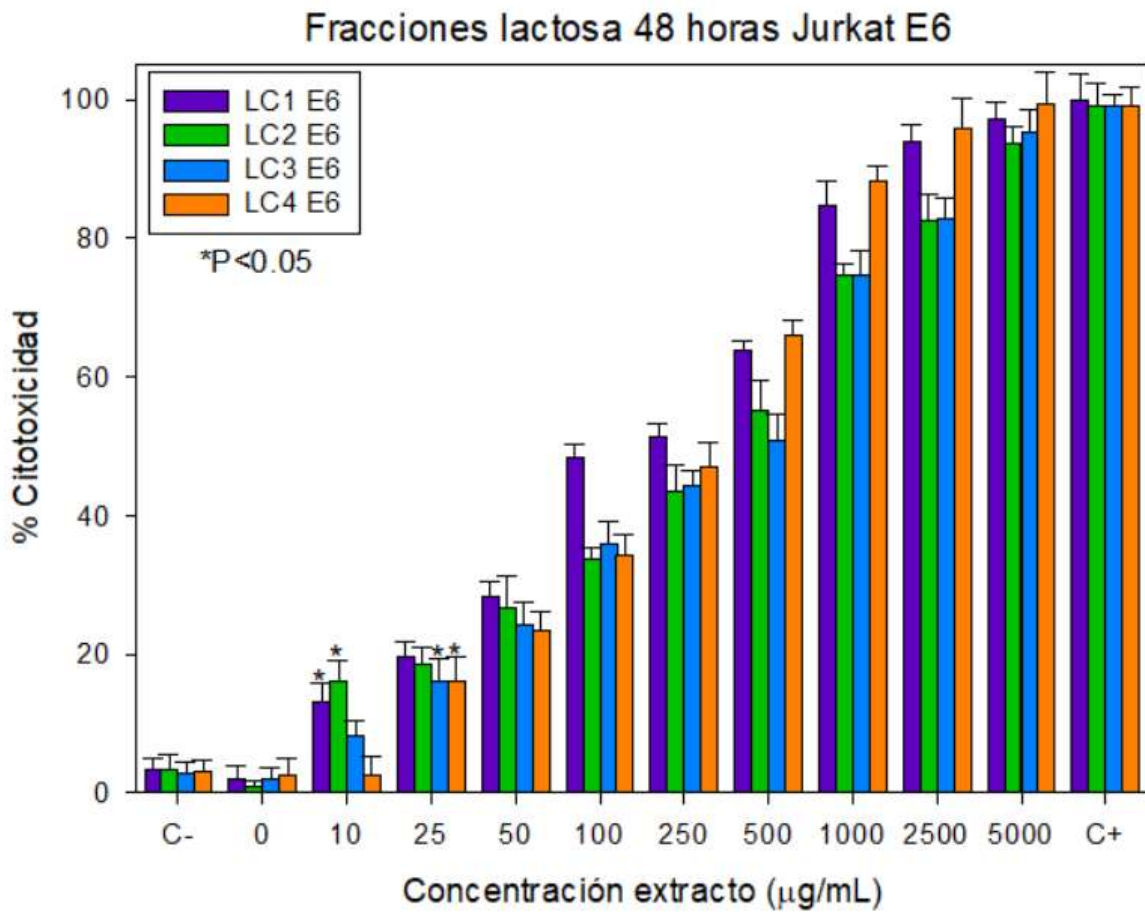


Figura 30. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 48 horas para la línea celular Jurkat E6 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de lactosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

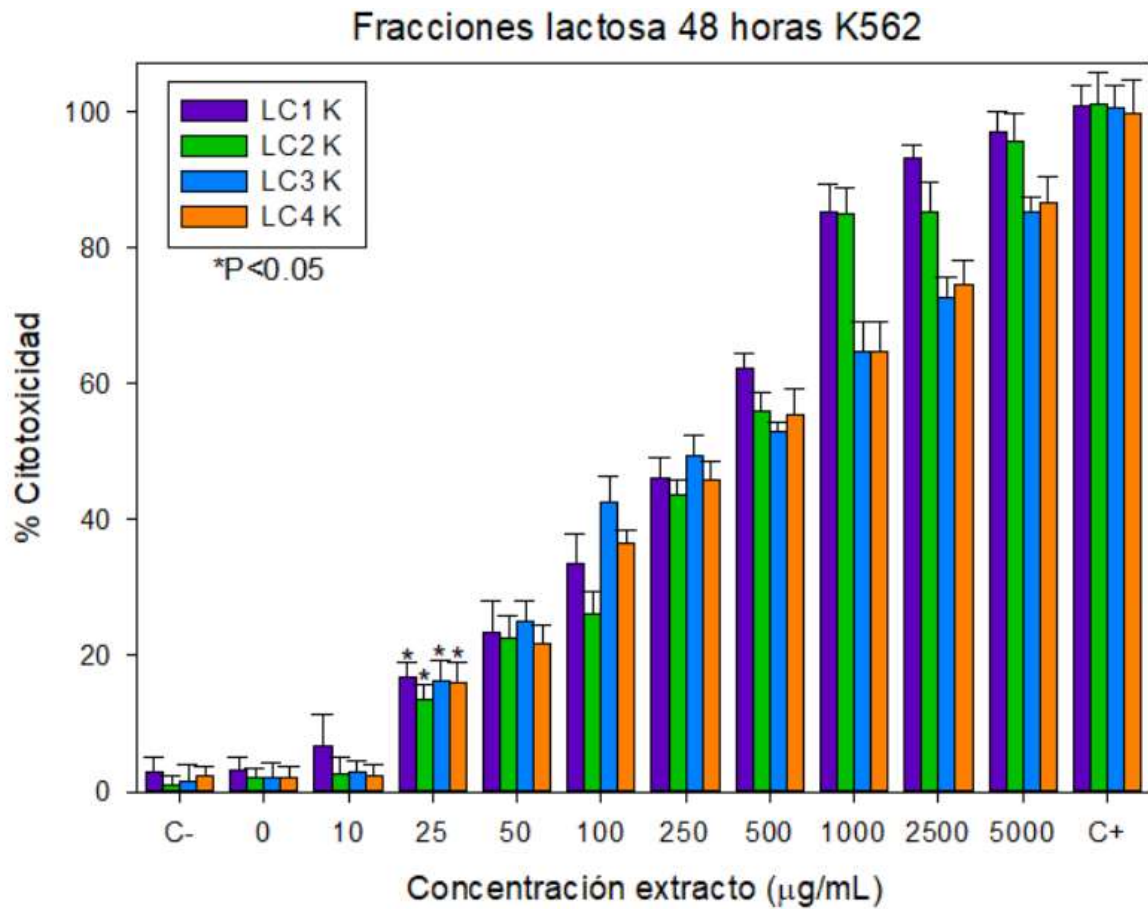


Figura 31. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 48 horas para la línea celular K562 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de lactosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

Fracciones lactosa 72 horas Jurkat E6

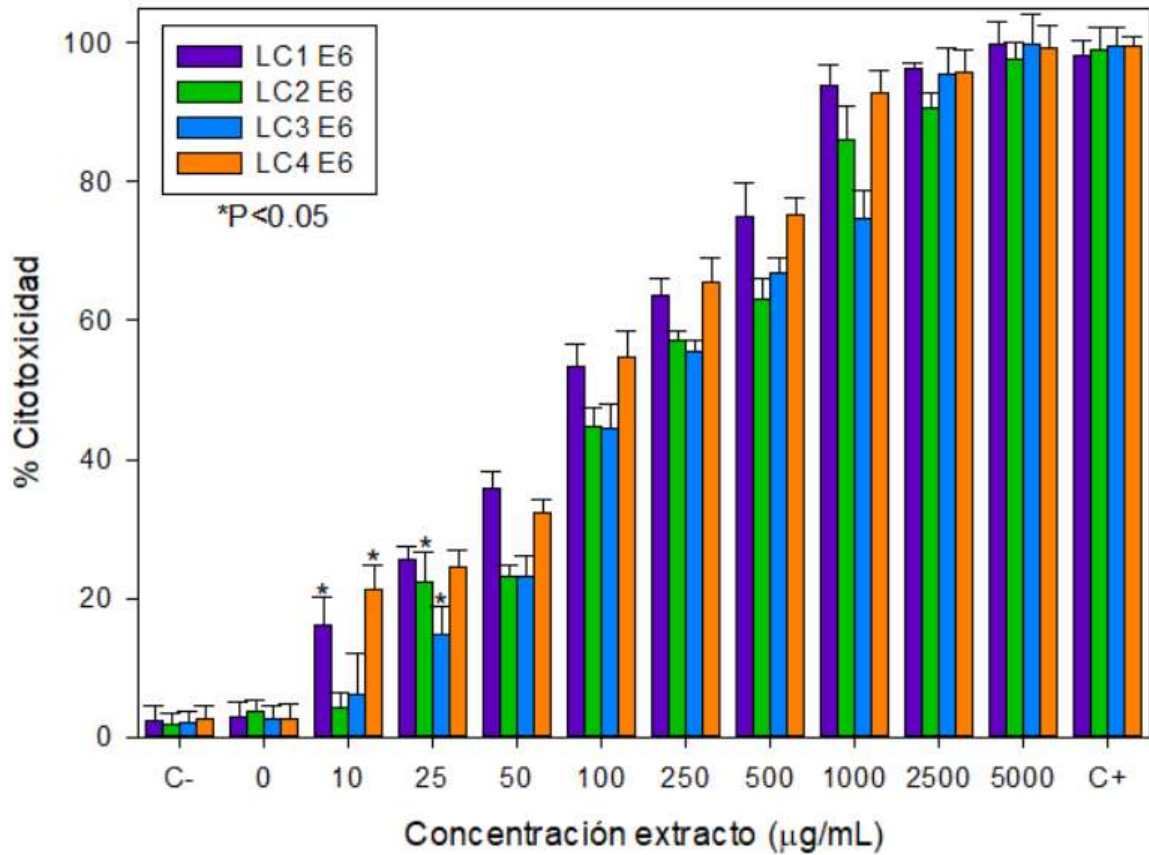


Figura 32. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 72 horas para la línea celular Jurkat E6 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de lactosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en µg/mL, y C+ se refiere a las células tratadas con H₂O₂ al 3%.

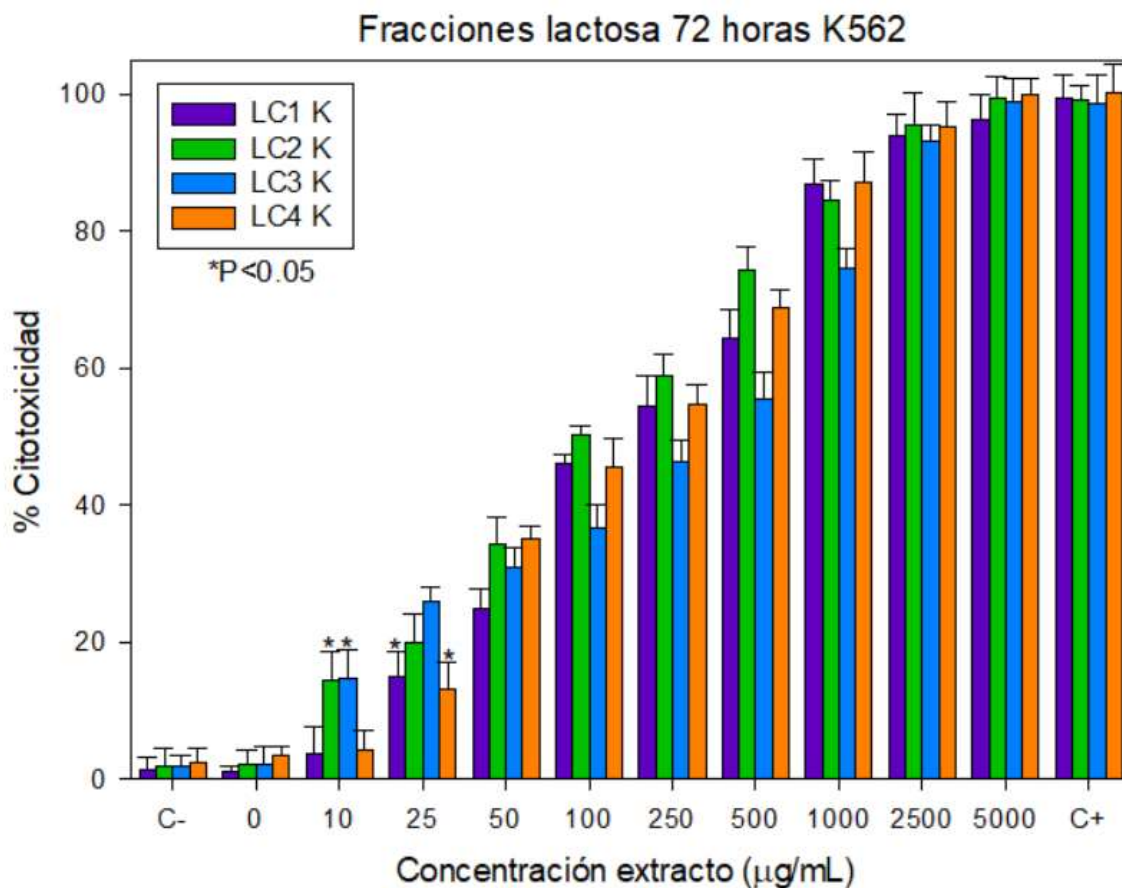


Figura 33. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 72 horas para la línea celular K562 tratada con las fracciones obtenidas del extracto de lactosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en $\mu\text{g/mL}$, y C+ se refiere a las células tratadas con H_2O_2 al 3%.

Tabla 8. CC_{50} de las fracciones del extracto de glucosa evaluadas (fracción 1 LC1, fracción 2 LC2, fracción 3 LC3, fracción 4 LC4) para las líneas celulares Jurkat E6 y K562.

	t (h)	LC1 ($\mu\text{g/mL}$)	LC2 ($\mu\text{g/mL}$)	LC3 ($\mu\text{g/mL}$)	LC4 ($\mu\text{g/mL}$)
Jurkat E6	48	158.3 \pm 8.3	242.3 \pm 11.8 ^a	265.5 \pm 5.3 ^{a, b}	193.6 \pm 7.6 ^{a, b, c}
	72	102.1 \pm 6.6 ^d	176.1 \pm 5.3 ^{a, d}	188.6 \pm 12.4 ^{a, d}	98.3 \pm 6.4 ^{b, c, d}
K562	48	210.4 \pm 10.7 ^e	266.1 \pm 10.2 ^a	324.0 \pm 12.9 ^{a, b, e}	311.6 \pm 7.3 ^{a, b, e}
	72	181.6 \pm 11.9 ^{d, e}	130.5 \pm 7.4 ^{a, d, e}	187.4 \pm 11.7 ^{b, d}	158.0 \pm 8.6 ^{b, c, d, e}

a: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la fracción 1; $p < 0.05$.

b: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la fracción 2; $p < 0.05$.

c: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la fracción 3; $p < 0.05$.

d: diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo; $p < 0.05$.

e: diferencia estadísticamente significativa con respecto a la línea celular; $p < 0.05$.

Al comparar cada una de las fracciones entre sí, se observa que, en la línea celular E6, la fracción 1 tiene la concentración inhibitoria más baja a las 48 horas, seguida de la fracción 4, la fracción 2 y la fracción 3. Mientras que en la línea celular K562 la fracción más citotóxica es la fracción 1, seguida de la fracción 2, la fracción 3 y la fracción 4. Entre las concentraciones inhibitorias de cada una de las fracciones se observa que todas ellas son similares entre sí, excepto la fracción 4 en las células E6 a las 72 horas. Sin embargo, esto puede ser debido a que, como se vio en los ensayos anteriores, la línea E6 es más sensible que la línea K562 y el tiempo de exposición también disminuye la concentración inhibitoria.

En general se observa que el efecto citotóxico es dependiente del tiempo de exposición de cada una de las fracciones sobre las líneas celulares, Nuevamente se observa que la línea celular K562 es más resistente a estos compuestos que la línea Jurkat E6 (Tabla 8) (Gao, *et. al.* 2004; Lin, *et. al.* 2013; Weng, *et. al.* 2010).

Al comparar las concentraciones inhibitorias de las fracciones de glucosa con las fracciones de lactosa se observa que las fracciones de lactosa necesitan una concentración mayor para causar el efecto citotóxico de las fracciones de glucosa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos a partir de los extractos totales. Las concentraciones inhibitorias de las fracciones de glucosa 1 y 3 son las más bajas de todas las fracciones, y se encuentran un orden de magnitud debajo del resto de las fracciones, donde la fracción 1 de glucosa llega a tener una concentración inhibitoria de $27.9 \pm 4.4 \mu\text{g/mL}$ en las células Jurkat E6 y de $40.8 \pm 3.8 \mu\text{g/mL}$ a las 72 horas en las células K562, por lo tanto, estas fracciones se evaluaron en las concentraciones más altas utilizadas en los ensayos anteriores, más la concentración de $10\ 000 \mu\text{g/mL}$, para evaluar su citotoxicidad y sus concentraciones inhibitorias en MSP de un individuo sin leucemia, y determinar si las fracciones tienen moléculas que puedan estar dañando a células sanas o si las células cancerígenas son más susceptibles a estas moléculas (Weng, *et. al.* 2010; Rios, *et. al.* 2012).

8.4.4 Evaluación de citotoxicidad con fracciones 1 y 3 del extracto de glucosa con MSP

Al realizar los ensayos con MSP con las fracciones 1 y 3 del extracto de glucosa a 48 horas se observó que en la máxima concentración utilizada para los ensayos con líneas celulares de leucemia (5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la citotoxicidad de las células sanas (Figura 34).

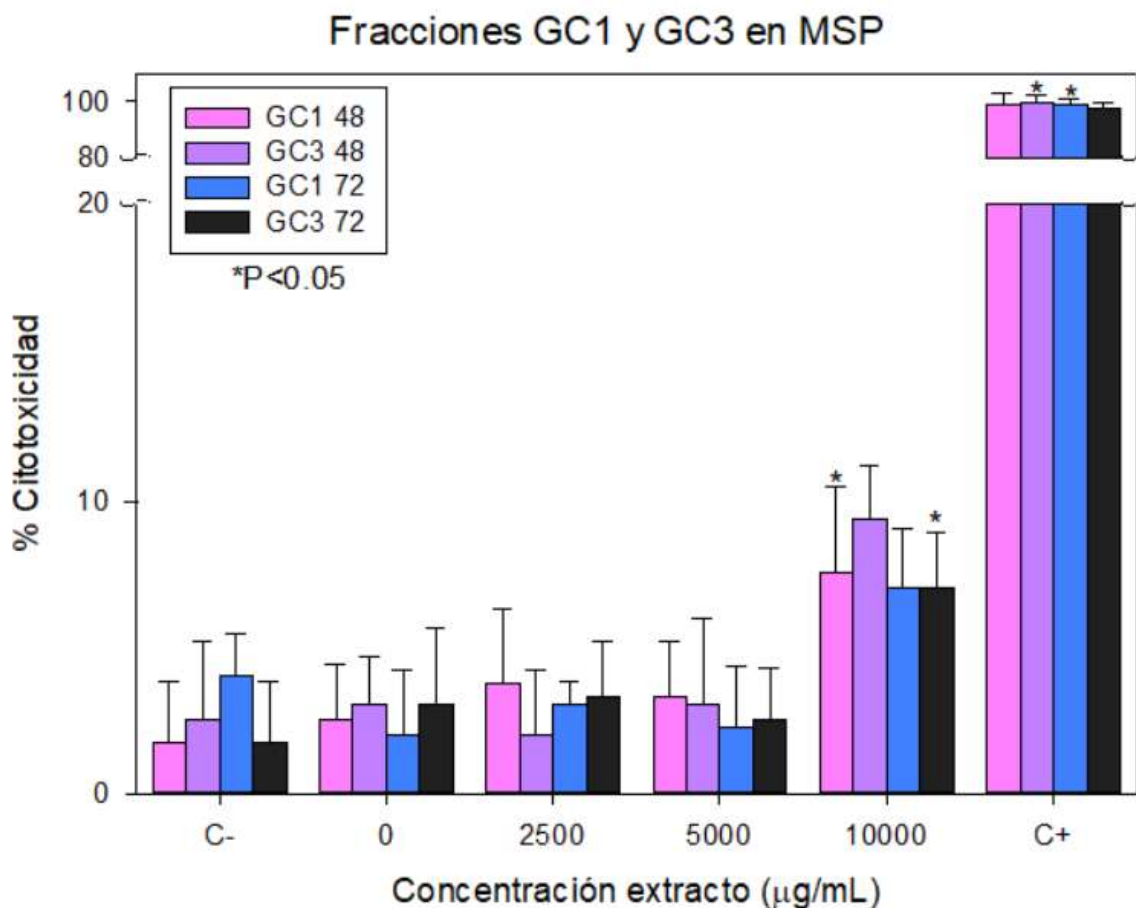


Figura 34. Porcentajes de citotoxicidad obtenidos a las 48 y 72 horas para los msp tratados con las fracciones 1 y 3 obtenidas del extracto de glucosa. C- se refiere a las células tratadas únicamente con PBS, los números indican las concentraciones del extracto en $\mu\text{g}/\text{mL}$, y C+ se refiere a las células tratadas con H_2O_2 al 3%.

Sin embargo, al añadir el doble de la concentración (10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se observa que en la fracción 1 a las 48 horas ya hay una diferencia estadísticamente significativa (8% de citotoxicidad \pm 3%), mientras que en la fracción 3 no se observa (Figura 34).

Para ambas fracciones no es posible realizar el cálculo de CC_{50} ya que se no se alcanzan porcentajes de citotoxicidad arriba del 10% en las concentraciones utilizadas.

Al comparar las concentraciones utilizadas de las fracciones 1 y 3 con las líneas de leucemia contra las concentraciones utilizadas con los msp, se observa que para las células cancerígenas se utiliza una concentración de 1000 mg/mL para llegar a un porcentaje de citotoxicidad del 80%. Mientras que para las células sanas, se requiere una concentración 10 veces mayor para apenas llegar al 10% de citotoxicidad. Es importante remarcar este resultado, ya que indica que estas fracciones se pueden utilizar para eliminar células cancerígenas sin hacer daño a células sanas.

Si se comparan estos resultados con el límite de concentración de uso de medicamentos citotóxicos/citostáticos *in vivo* aprobado por la Organización Mundial de la Salud (10 mg/mL al día; OMS, 2017) se observa que las concentraciones inhibitorias medias para las fracciones 1 y 3 en los ensayos realizados con células cancerígenas *in vitro* se encuentran por debajo de esta concentración. Así mismo, no se observa una citotoxicidad significativa en células sanas sino hasta agregar 100x más concentrado, tomando como referencia la mayor concentración inhibitoria de la fracción 1 y 3: $112.8 \pm 9.6 \mu\text{g/mL}$, y $119.0 \pm 8.8 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (células K562 a 48 horas). Hay que tomar en cuenta que el efecto presentado es de un extracto y no sólo de una molécula, como sucede en los medicamentos, por lo que las concentraciones inhibitorias medias deben ser evaluadas con compuestos aislados para evaluar las posibilidades de interacción o de sinergismo entre moléculas y así determinar cómo los compuestos de carácter ácido presentes en *H. coffeata* pueden ser considerados como alternativas para el tratamiento de leucemia.

9. Conclusiones

Se determinó que la mejor condición para la producción de ácidos triterpenoides de *H. coffeata* es al utilizar glucosa en el medio de cultivo, y matraces convencionales. Sin embargo, en la prueba de identificación por placas TLC se observa que hay al menos una molécula diferente en el crecimiento con lactosa en matraces convencionales, por lo que estos dos extractos se continuaron evaluando.

Se lograron identificar y purificar al menos tres familias de ácidos triterpenoides en las placas de TLC realizadas para el extracto con glucosa y al menos cuatro familias para las placas de TLC realizadas para el extracto con lactosa.

Se concentraron los extractos para poder evaluar la citotoxicidad en dos líneas celulares de leucemia y se observó que, tanto a 48 como 72 horas, en general, la línea Jurkat E6 es más sensible que la línea K562, mientras que el extracto con glucosa tiene una mayor actividad citotóxica que el extracto con lactosa.

Se encontró que las fracciones 1 y 3 del extracto con glucosa son las que tienen una mayor actividad citotóxica en ambas líneas celulares de leucemia, por lo que habría que realizar los estudios *in vivo* para que puedan considerarse como una alternativa a un medicamento oncológico para leucemia.

Al realizar los ensayos citotóxicos con MSP se encontró que no hay una citotoxicidad significativa en ninguna de las fracciones 1 y 3 del extracto con glucosa, sino hasta usar las fracciones concentradas 100 veces más que la concentraciones inhibitorias medias observadas en las líneas de leucemia.

10. Perspectivas

Se debe realizar la purificación de cada una de las fracciones encontradas por HPLC utilizando diferentes mezclas de disolventes para formar la fase móvil, y tratar de separar cada una de las moléculas para poder identificarlas posteriormente por resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopía infrarrojo (IR), y espectroscopía de masas (MS).

Especialmente se tienen que identificar las moléculas que componen las fracciones 1 y 3 del extracto con glucosa, ya que éstas fueron las que presentan una mayor CC_{50} y que podrían considerarse como una alternativa para fármacos de uso para el tratamiento de leucemia, habiendo realizado los ensayos *in vivo* necesarios.

Una vez encontradas las moléculas responsables de la citotoxicidad en líneas de leucemia de *H. coffeata* se deben repetir los ensayos de citotoxicidad con MSP para observar si hay una interacción sinérgica o antagónica que modifique la CC_{50} calculada.

11. Referencias

1. Abe, I, Rohmer, M, Prestwich, GD, Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes, *Chemical Reviews*, 1993 (93, 6) p. 2189-2206.
2. Akihisa, T, Nakamura, Y, Tagata, M, Tokuda, H, Yasukawa, K, Uchiyama, E, Suzuki, T, Kimura, Y, Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*, *Chemistry and Biodiversity*, 2007 (4) p. 224-231.
3. Amanullah, A, Jüsten, P, Davies, A, Paul, GC, Nienow, AW, Thomas, CR, Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*, *Biochemical Engineering*, 2000 (5) p.109-114.
4. Athie-García, MS, Piñón-Castillo, HA, Muñoz-Castellanos, LN, Ulloa-Ogaz, AL, Martínez-Varela, PI, Quintero-Ramos, A, Duran, R, Murillo-Ramirez, JG, Orrantia-Borunda, E, Cell wall damage and oxidative stress in *Candida albicans* ATCC10231 and *Aspergillus niger* caused by palladium nanoparticles, *Toxicology in Vitro*, (2018). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.006>.
5. Baby, S, Johnson, AJ, Govindan, B, Secondary metabolites from *Ganoderma*, *Phytochemistry*, 2015 (114) p. 66–101.
6. Bautista-Tovar, DC, Efecto de la energía de disipación media en el crecimiento del hongo filamentoso *Humphreya coffeata* y la producción de exopolisacáridos, *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2013.
7. Bishop, KS, Kao, CHJ, Xy, Y, Glucina, MP, Paterson, RR, Ferguson, LR, From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals, *Phytochemistry*, 2015 (114) p. 56-65.
8. Blackwell, M, The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 2011 (98, 3) p. 426-438.
9. Bounous, DI, Campagnoli, RP, Brown, J, Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidineuptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes, *Avian Diseases*, 1992 (36, 4) p. 1022-1027.

10. Chang, ST, Buswell, JA, Mushroom nutraceuticals, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996 (12, 5) p. 473-476.
11. Cheng, CR, Yang, M, Yu, K, Guan, S, Tao, S, Miliar, A, Pang, X, Guo, D, Identification of metabolites of ganoderic acid D by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Drug Metabolism and Disposition*, 2012 (40, 12) p. 2307-2314.
12. Cheng, CR, Yang, M, Yu, K, Guan, S, Wu, XH, Wu, WY, Sun, Y, Li, C, Ding, J, Guo, D, Metabolite identification of crude extract from Ganoderma lucidum in rats using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2013a (941) p. 90-99.
13. Cheng, CR, Yang, M, Guan, S, Wu, XH, Pang, X, Wang, Y, Yang, Y, Ding, J, Guo, D, Pharmacokinetics of ganoderic acid D and its main metabolite by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2013b, (930) p. 1-6.
14. Chisti, Y, Hydrodynamic damage to animal cells, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2001 (21, 2) p. 67-110.
15. Cho, YJ, Hwang, HJ, Kim, SW, Song, CH and Yun, JW, Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor, *Journal of Biotechnology*, 2002 (95) p. 13-23.
16. Da, J, Cheng CR, Yao, S, Long, HL, Wang, YH, Khan, IA, Li, YF, Wang, QR, Cai, LY, Jiang, BH, Liu, X, Wu, WY, A reproducible analytical system based on the multi-component analysis of triterpene acids in *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 2015 (114) p. 146-154.
17. Dołowy, M, Kulpińska-Kucia, K, Pyka, A. Validation of a Thin-Layer Chromatography for the Determination of Hydrocortisone Acetate and Lidocaine in a Pharmaceutical Preparation, *The Scientific World Journal*, 2014 (107879) doi:10.1155/2014/107879.
18. Domingues, FC, Queiroz, JA, Cabral, JMS, Fonseca, LP, The influence of culture condition on mycelial structure and cellulase production by

- Trichoderma reesei Rut C-30, *Enzyme and Microbial Technology*, 2000 (26) p. 394–401.
20. El-Mekkawy, S, Meselhy, MR, Nakamura, N, Tezuka, Y, Hattori, M, Kakiuchi, N, Shimotohno, K, Kawahata, T, Otake, T, Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 1998 (49, 6) p. 1651-1657.
21. Elisashvili, V, Kachlishvili, ET, Wasser, SP, Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 2009 (45) p. 592-596.
22. Elisashvili, V, Sumerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review), *International Journal Medicinal Mushrooms*, 2012 (14) p. 211-239.
23. Fan, JP, He, CH, Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, (41) p. 950-956.
24. Fang, QH, Zhong, JJ, Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites: Ganoderic acid and polysaccharide, *Biochemical Engineering Journal*, 2002 (10) p. 61-65.
25. Fatmawati, S, Shimizu, K, Kondo, R, Ganoderic acid Df, a new triterpenoid with aldose reductase activity from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Fitoterapia*, 2010, (81) p. 1033–1036.
26. Fazenda, ML, Seviour, R, McNeil, B, Harvey, LM, Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi, *Advances in Applied Microbiology*, 2008 (63) p. 33-103.
27. Fekete, E, Padra, J, Szentirmai, A, Karaffa, L, Lactose and D-galactose catabolism in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2008 (55) p. 119-24.
28. Fraga, I, Coutinho, J, Bezerra, RM, Dias, AA, Marques, G, Nunes, FM, Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum*

- exopolysaccharides structural features, *Carbohydrate Polymers*, 2014 (111) p. 936-946.
29. Gamboa-Suasnavart, R, Valdez-Cruz, NA, Córdova-Dávalos, L, Martínez-Otelo, J, Servín-Gonzalez L, Espitia C, Trujillo-Roldán MA. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks, *Microbial Cell Factories*, 2011 (10) p.110.
30. García-García, M, Aislamiento y bioactividad de los exopolisacáridos producidos en cultivo sumergido de *Humphreya coffeata*, *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2014.
31. Gao, JJ, Min, BS, Ahn, EM, Nakamura, N, Lee, HK, Hattori, M, New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2002 (50, 6) p. 837-840.
32. Gao JJ, Nakamura, N, Min, BS, Hirakawa, A, Zuo, F, Hattori, M, Quantitative Determination of Bitter Principles in Specimens of *Ganoderma lucidum* Using High-Performance Liquid Chromatography and Its Application to the Evaluation of Ganoderma Products, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2004 (52, 6) p. 688-695.
33. Glensk, M, Glinski, JA, Włodarczyk, M, Stefanowicz, P, Determination of Ursolic and Oleanolic Acid in *Sambuci fructus*, *Chemistry and Biodiversity*, 2014 (11) p. 1939-1944.
34. Gondová, T, Petříková, I, Determination of new antidepressants in pharmaceuticals by thin-layer chromatography with densitometry, *Journal of AOAC International*, 2010 (93, 3) p.778-782.
35. Gordan. JD, Chay, WY, Kelley, RK, Ko, AH, Choo, SP, Venook, AP, And What Other Medications Are You Taking? *Journal of Clinical Oncology*, 2011 (29, 11).
36. Guo, XY, Liu, D, Ye, M, Han, J, Deng, S, Ma, XC, Zhao, Y, Zhang, B, Shen, X, Che, QM, Structural characterization of minor metabolites and pharmacokinetics of ganoderic acid C2 in rat plasma by HPLC coupled with

- electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013a (75) p. 64-73.
37. Guo, XY, Shen, X, Long, J, Han, J, Che, QM, Structural identification of the metabolites of ganoderic acid B from *Ganoderma lucidum* in rats based on liquid chromatography coupled with electrospray ionization hybrid ion trap and time-of-flight mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 2013b (27, 9) p. 1177-1187.
38. Herrera T, Ulloa M, El Reino de los Hongos: Micología básica y aplicada, 2^a edición, *Fondo de Cultura Económica*, México 2005, p. 328-329.
39. Hill, RA, and Connolly, JD, Triterpenoids, *Natural Product Reports*, 2013, (30, 7) p. 1028-1065.
40. Hsu, CL, Yen, GC, Capítulo Tres - Ganoderic Acid and Lucidenic Acid (Triterpenoid): The Enzymes, *Academic Press*, 2014 (36) p. 33-56.
41. Hu, H, Ahn, NS, Yang, X, Lee, YS, Kang, KS, *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell, *International Journal of Cancer*, 2002 (102, 3) p. 250-253.
42. Huang, SZ, Ma, QY, Kong FD, Guo ZK, Cai, CH, Hu, LL, Zhou, LM, Wang, Q, Dai, HF, Mei, WL, Zhao, YZ, Lanostane-type triterpenoids from the fruiting body of *Ganoderma calidophilum*, *Phytochemistry*, 2017 (143) p. 104-110.
43. Huie, CW, Di, X, Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 2004 (812) p. 241-257.
44. Hsu, CL, Yu, YS, Yen, GC, Lucidenic acid B induces apoptosis in human leukemia cells via a mitochondria-mediated pathway, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008 (56) p. 3973-3980.
45. Jiang, J, Grieb, B, Thyagarajan, A, Sliva, D, Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling, *International Journal of Molecular Medicine*, 2008 (21) p.577-584.

46. Jiang, J, Slivova, V, Valachovicova, T, Harvey, K, Sliva, D, *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3, *International Journal of Oncology*, 2004 (24) p.1093-1099.
47. Jiang, J, Jedinak, A, Sliva, D, Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, (415, 2) p.325-329.
48. Johansen, CL, Coolen, L, Hunik, JH, Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations, *Biotechnology Progress*, 1998, (14) p. 233–240.
49. Johnstone, RW, Ruefli, AA, Lowe, SW, Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy, *Cell*, 2002 (108) p. 153-164.
50. Kidokoro, T, Tanikawa, C, Furukawa, Y, Katagiri, T, Nakamura, Y, Matsuda, K, CDC20, a potential cancer therapeutic target, is negatively regulated by p53, *Oncogene*, 2008, (27) p. 1562-1571.
51. Kim, KC, Kim, JS, Son, JK, Kim, IG, Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells by the *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts, *Cancer Letters*, 2006 (246) p. 210-217.
52. Ko, HH, Hung, CF, Wang, JP, Lin, CN, Anti-inflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*, *Phytochemistry*, 2008 (69) p. 234–239.
53. Kubota, T, Asaka, Y, Miura, I, Mori, H, Structures of Ganoderic Acid A and B, Two New Lanostane Type Bitter Triterpenes from *Ganoderma lucidum*, *Helvetica Chimica Acta*, 1982 (65, 2) p. 611-619.
54. Lee, S, Park, S, Oh, JW, Yang, C, Natural inhibitors for protein prenyltransferase, *Planta Medica*, 1998 (64, 4) p. 303-308.
55. Lichtenthaler, HK, Rohmer, M, Schwender, J, Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants, *Physiologia Plantarum*, 1997 (101) p. 643-652.

56. Li, CH, Chen, PY, Chang, UM, Kan, LS, F, WH, Tsai, KS, Lin, SB, Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells, *Life Sciences*, 2005 (77, 3) p. 252-265.
57. Lin, SB, Li, CH, Lee, SS, Kan, LS, Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest, *Life Sciences*, 2013 (72, 21) p.2381-2390.
58. Liu, X, Zhu, L, Tan, J, Zhou, X, Xiao, L, Yang, X, Wang, B, Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014 (14, 12) p. 1-10.
59. Liu, Y, Liu, Y, Qiu, F, Di, X, Sensitive and selective liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of five ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* and its related species, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011 (54, 4) p. 717-721.
60. López-Tricas, JM, Biosíntesis del colesterol, *Info Farmacia Online*, 2012.
61. Miller, GL, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry*, 1959 (31, 3) p. 426-428.
62. Min, BS, Gao, JJ, Nakamura, N, Hattori, M, Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2000 (48, 7), p. 1026-1033.
63. Müller, CI, Kumagai, T, O'Kelly, J, Seeram, NP, Heber, D, Koeffler, HP, *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia lymphoma and multiple myeloma cells, *Leukemia Research*, 2006 (30) p. 841-848.
64. Naumoska, K, Vovk, I, Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2015 (1381) p. 229-238.
65. OMS: Organización Mundial de la Salud, 2017 <http://www.who.int/es/>
66. Oh, JY, Cho, EJ, Nam, SH, Choi, JW, Yun, JW, Production of polysaccharide–peptide complexes by submerged mycelial culture of an

- entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*, *Process Biochemistry*, 2007 (42) p.352–362.
67. Papagianni, M, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 2004 (22, 3) p. 189-259.
68. Park, JP, Kim, YM, Kim, SW, Hwang, JH, Cho, YT, Lee, YS, Song, CH, Yun, JW, Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*, *Process Biochemistry*, 2002 (37) p. 1257-1262.
69. Paterson, RR, *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory, *Phytochemistry*, 2006 (67) p. 1958-2001.
70. Pendela, M, Kahsay, G, Baekelandt, I, Van Schepdael, A, Adams, E, Simultaneous determination of lidocaine hydrochloride, hydrocortisone and nystatin in a pharmaceutical preparation by RP-LC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011 (56, 3) p. 641-644. doi: 10.1016/j.jpba.2011.06.028
71. Peng, XR, Liu, JQ, Wang, CF, Li, XY, Shu, Y, Zhou, L, Qiu, MH, Hepatoprotective effects of triterpenoids from *Ganoderma cochlear*, *Journal of Natural Products*, 2014 (77) p.737–743.
72. Porras-Arboleda, SM, Evaluación de una cepa nativa de *Amauroderma sp.* en cultivo sumergido, *Universidad Nacional De Colombia*, 2007.
73. Porras-Arboleda, SM, Valdez-Cruz, NA, Rojano, B, Aguilar, C, Rocha-Zavaleta, L, Trujillo-Roldán, MA, Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (*Aphyllophoromycetideae*) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2009 (11, 4) p. 335-350.
74. Ren A, Qin, L, Shi, L, Dong, X, Mu-da, S, Li, YX, Zhao, MW, Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetes fungus *Ganoderma lucidum*, *Bioresource Technology*, 2010 (101, 17) p. 6785-6790.
75. Ren, A, Ouyang, X, Shi, L, Jiang, AL, Mu, DS, Li, MJ, Han, Q, Zhao, MW, Molecular characterization and expression analysis of GIHMGS, a gene

- encoding hydroxymethylglutaryl-CoA synthase from *Ganoderma lucidum*(Ling-zhi) in ganoderic acid biosynthesis pathway, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013a (29, 3) p. 523-531.
76. Ren, A, Li, MJ, Shi, L, Mu, DS, Jiang, AL, Han, Q, Zhao, MW, Profiling and quantifying differential gene transcription provide insights into ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum* in response to methyl jasmonate, *PLoS One* 8, 2013b (6) e65027.
77. Ríos, JL, Andújar, I, Recio, MC, Giner, RM, Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds, *Journal of Natural Products*, 2012 (75) p. 2016–2044.
78. Scorlias, A, Karameris, A, Arnogiannaki, N, Ardavanis, A, Bassilopoulos, P, Trangas, T, Talieri, M, Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients, *British Journal of Cancer*, 2001 (84, 11) p. 1488-1496.
79. Shi, L, Ren, A, Mu, D, Zhao, M, Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, (88, 6) p. 1243-1251.
80. Silva, D, *Ganoderma lucidum* in cancer research, *Leukemia Research*, 2006 (30, 7) p. 767-768.
81. Smith, H, Doyle, S, Murhpy, R, Filamentous fungi as a source of natural antioxidants, *Food Chemistry*, 2015 (185) p. 389-397.
82. Szepesi, G, Nyiredy, S, Planar chromatography: current status and future perspectives in pharmaceutical analysis - I. Applicability, quantitation and validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1992 (10-12) p. 1007-1015.
83. Srisurichana, S, Piapukiewb, J, Puthongc, S, Pornpakakula, S, Lanostane triterpenoids, spiro-astraodoric acid, and astraodoric acids E and F, from the edible mushroom *Astraeus odoratus*, *Phytochemistry Letters*, 2017 (21) p. 78-83.

84. Tang, YJ, Zhong, JJ, Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid, *Enzyme and Microbial Technology*, 2002 (31) p. 20-28.
85. Teekachunhatean, S, Sadja, S, Ampasavate, C, Chiranthanut, N, Rojanasthien, N, Sangdee, C, Pharmacokinetics of Ganoderic Acids A and F after Oral Administration of Ling Zhi Preparation in Healthy Male Volunteers, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 (17) p. 1-7.
86. ThermoFisher *Protocolo de uso de AlamarBlue*
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_TI%20alamarBlue%20Rev%201.1.pdf
87. Thyagarajan, A, Jedinak, A, Nguyen, H, Terry, C, Baldrige, LA, Jiang, J, Sliva, D, Triterpenes from *Ganoderma lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK), *Nutrition and Cancer*, 2010 (62, 5) p. 630-640.
88. Tohtahon, Z, Xue, J, Han, J, Yushuang, L, Hua, H, Yuan, T, Cytotoxic lanostane triterpenoids from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus*, *Phytochemistry*, 2017 (143) 98-103.
89. Vermeulen, K, Van Bockstaele, DR, Berneman, ZN, Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer, *Annals of Hematology*, 2005 (84) p. 627-639.
90. Wagner, R, Mitchell, DA, Sasaki, GL, De Almeida-Amazonas, MA, Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 2004 (114) p. 153-164.
91. Wang, 1, Xie, ZP, Huang, ZS, Li, H, Wei, AY, Di, JM, Xiao, HJ, Zhang, ZG, Cai, LH, Tao, X, Qi, T, Chen, DL, Chen, J, Total triterpenoids from *Ganoderma lucidum* suppresses prostate cancer cell growth by inducing growth arrest and apoptosis, *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 2015 (35, 5) p. 736-741.
92. Wang, XM, Yang, M, Guan, SH, Liu, RX, Xia, JM, Bi, KS, Guo, DA, Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum*

- and related species by high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006 (41, 3) p. 838-844.
93. Wang, XC, Xi, RJ, Li, Y, Wang, DM, Yao, YJ, The Species Identity of the Widely Cultivated *Ganoderma* “*G. lucidum*” (Ling-zhi), *PLoS ONE*, 2012 (7, 7).
94. Wäsch, R, Engelbert, D, Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells, *Oncogene*, 2005 (24) p. 1-10.
95. Wasser, SP, Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002 (60) p. 258–274.
96. Weng, CJ, Chau, CF, Hsieh, YS, Yang, SF, Yen, GC, Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF- κ B and AP-1, *Carcinogenesis*, 2008 (29, 1) p. 147-156.
97. Weng CJ, Fang, PS, Chen, DH, Chen, KD, Yen, GC, Anti-invasive effect of a rare mushroom, *Ganoderma colossum*, on human hepatoma cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010 (58, 13) p. 7657-7663.
98. Weng, CJ, Chau, CF, Chen, KD, Chen, DH, Yen, GC, The anti-invasive effect of lucidenic acids isolated from a new *Ganoderma lucidum* strain, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007 (51) p. 1472-1477.
99. Weng, CJ, Chau, CF, Yen, GC, Liao, JW, Chen, DH, Chen, KD, Inhibitory effects of *Ganoderma lucidum* on tumorigenesis and metastasis of human hepatoma cells in cells and animal models, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009 (57, 11) p. 5049-5057.
100. Wu, TS, Shi, LS, Kuo, SC, Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes, *Journal of Natural Products*, 2001 (64, 8) p. 1121-1122.
101. Wu, GS, Lu, JJ, Guo, JJ, Li, YB, Tan, W, Dang, YY, Zhong, ZF, Xu, ZT, Chen, XP, Wang, YT, Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells, *Fitoterapia*, 2012 (83, 2) p. 408-414.

102. Xu, JW, Zhao, W, Zhong, JJ, Biotechnological production and application of ganoderic acids, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010b (87-2) p. 457-466.
103. Xu, JW, Xu, YN, Zhong, JJ, Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2012 (78, 22) p. 7968-7976.
104. Xu, JW, Xu, YN, Zhong, JJ, Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010a (85, 4) p. 941-948.
105. Yang, FC, Liau, CB. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures, *Process Biochemistry*, 1998 (33) p. 547-553.
106. Yang, HL, Ganoderic acid produced from submerged culture of *Ganoderma lucidum* induces cell cycle arrest and cytotoxicity in human hepatoma cell line BEL7402, *Biotechnology Letters*, 2005 (27, 12) pp. 835-838.
107. Yue, QX, Cao, ZW, Guan, SH, Liu, XH, Tao, L, Wu, WY, Li, YX, Yang, PY, Liu, X, Guo, DA, Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target network, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2008 (7) p. 949-961.
108. You, BJ, Lee, MH, Tien, N, Lee, MS, Hsieh, HC, Tseng, LH, Chung, YL, Lee, HZ, A novel approach to enhancing ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum* using apoptosis induction, *PLoS One*, 2013 (1) e53616.
109. Zhang, WX, Tang, YJ, Zhong JJ, Impact of oxygen level in gaseous phase on gene transcription and ganoderic acid biosynthesis in liquid static cultures of *Ganoderma lucidum*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012 (33, 6) p. 683-690.
110. Zhang, J, Zhong, JJ, Geng, A, Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor, *Process Biochemistry*, 2014 (49, 10) p. 1580-1586.

111. Zhong, JJ, Tang, YJ, Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms for Production of Valuable Bioactive Metabolites, *Biomanufacturing: Advances in Biochemical Engineering*, 2004 (87) p. 25-59.
112. Zhou, XW, Su, KQ, Zhang, YM, Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012 (93) p. 941-963.
113. Zhu, XL, Liu, JH, Li, WD, Lin, ZB, Promotion of myelopoiesis in myelosuppressed mice by *Ganoderma lucidum* polysaccharides, *Frontiers in Pharmacology*, 2012, (3, 20) p. 1-7.
114. Zhu, HS, Yang, XL, Wang, LB, Zhao, DX, Chen, L, Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells, *Cell Biology and Toxicology*, 2000 (16, 3) p. 201-206.
115. Ziegenbein, FC, Hanssen, HP, Konig, WA, Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*, *Phytochemistry*, 2006 (67) p. 202–211.

12. Anexos

12.1 Curva patrón de glucosa

Para realizar la curva patrón de glucosa se preparó una solución stock de 1g/L de glucosa y a partir de ella se realizaron soluciones de concentraciones conocidas (volumen total 2.5 mL) para realizar el procedimiento de cuantificación de glucosa por reducción de DNS, midiendo la absorbancia a 540 nm (Tabla A1).

A partir de las absorbancias obtenidas se realizó la gráfica de Absorbancia contra Concentración (Figura A1) y se obtuvo una recta, cuya ecuación se utilizó para conocer la concentración de glucosa en cada punto de las cinéticas realizadas.

Tabla A1. Concentraciones y absorbancias de soluciones de glucosa para curva patrón.

Glucosa 1 g/L (mL)	H ₂ O (mL)	Glucosa (g/L)	Absorbancia 540 nm
0.00	0.50	0.00	0.000
0.10	0.40	0.04	0.094
0.20	0.30	0.08	0.182
0.30	0.20	0.12	0.492
0.40	0.10	0.16	0.607
0.50	0.00	0.20	0.843

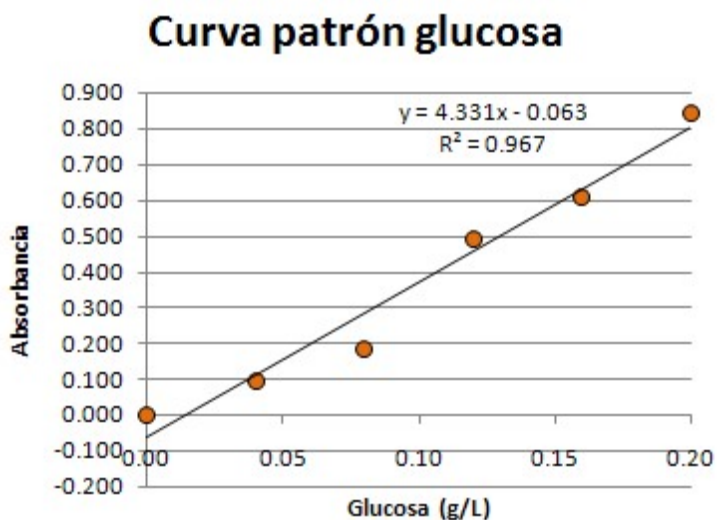


Figura A1. Curva patrón de glucosa con ecuación de regresión lineal y R^2 .

12.2 Curva patrón de lactosa

Para realizar la curva patrón de lactosa se preparó una solución stock de 1g/L de lactosa y a partir de ella se realizaron soluciones de concentraciones conocidas (volumen total 2.5 mL) para realizar el procedimiento de cuantificación de lactosa por reducción de DNS, midiendo la absorbancia a 540 nm (Tabla A2).

A partir de las absorbancias obtenidas se realizó la gráfica de Absorbancia contra Concentración (Figura A2) y se obtuvo una recta, cuya ecuación se utilizó para conocer la concentración de lactosa en cada punto de las cinéticas realizadas.

Tabla A2. Concentraciones y absorbancias de soluciones de lactosa para curva patrón.

Lactosa 1 g/L (mL)	H ₂ O (mL)	Lactosa (g/L)	Absorbancia 540 nm
0.00	0.50	0.00	0.000
0.10	0.40	0.04	0.162
0.20	0.30	0.08	0.373
0.30	0.20	0.12	0.584
0.40	0.10	0.16	0.662
0.50	0.00	0.20	0.814

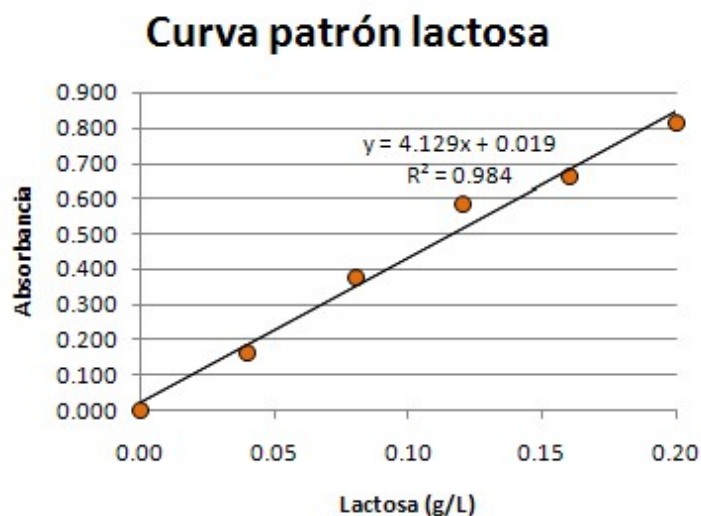


Figura A2. Curva patrón de lactosa con ecuación de regresión lineal y R^2 .

12.3 Curva patrón de ácido ursólico

Para realizar la curva patrón de ácido ursólico (Figura A3) se preparó una solución stock de 1g/L del mismo en MetOH y a partir de ella se realizaron soluciones de concentraciones conocidas (volumen total 1.0 mL) para realizar el procedimiento de cuantificación de triterpenoides totales, midiendo la absorbancia a 550 nm (Tabla A3).

A partir de las absorbancias obtenidas se realizó la gráfica de Absorbancia contra Concentración (Figura A4) y se obtuvo una recta, cuya ecuación se utilizó para conocer la concentración de triterpenoides totales en cada punto de las cinéticas realizadas.

Tabla A3. Concentraciones y absorbancias de soluciones de ácido ursólico para curva patrón.

Ác Urs 1 g/L (mL)	MetOH (mL)	Ác Urs (g/L)	Absorbancia 550 nm
0.00	1.00	0.00	0.000
0.25	0.75	0.03	0.012
0.50	0.50	0.06	0.022
0.75	0.25	0.09	0.038
1.00	0.00	0.12	0.051

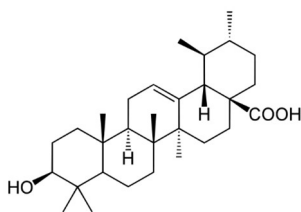


Figura A3. Estructura de ácido ursólico.

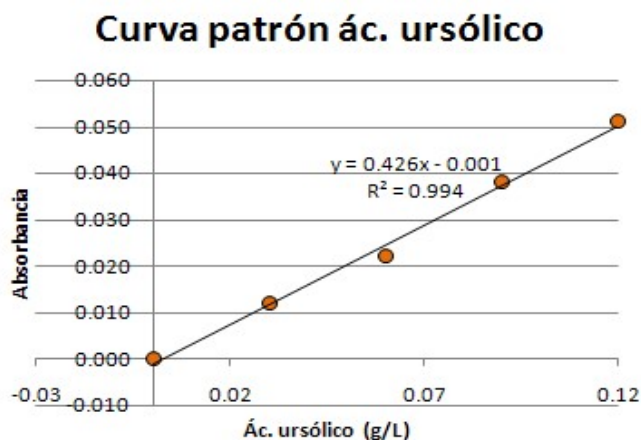


Figura A4. Curva patrón de ácido ursólico con ecuación de regresión lineal y R^2 .

12.4 Cálculo de parámetros cinéticos

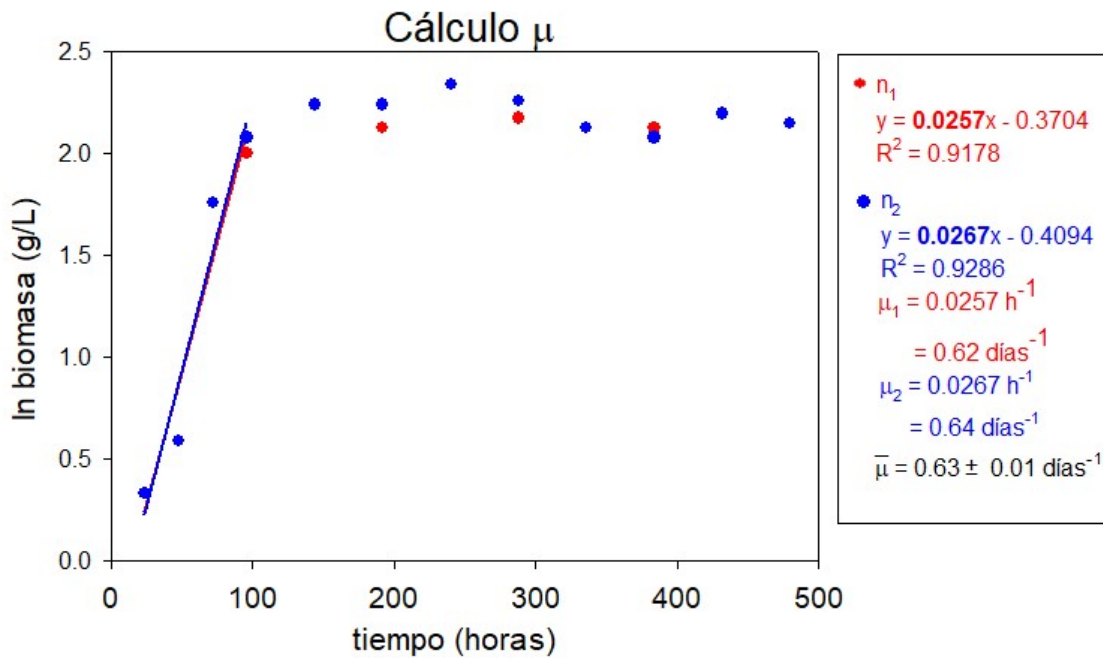


Figura A5. Ejemplo de cálculo de velocidad específica de crecimiento (μ) para la cinética con glucosa en matraces convencionales. Regresiones lineales de las fases exponenciales de crecimiento.

Ecuación 3. Tiempo de duplicación (td).

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación 4. Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$).

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{-\Delta s}$$

Ecuación 5. Velocidad de consumo específica (Q_s).

$$Q_s = \frac{g \text{ azúcar inicial}}{t \text{ final} * g \text{ biomasa final}}$$

Ecuación 6. Rendimiento producto/biomasa ($Y_{p/x}$).

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta p}{\Delta x}$$

Ecuación 7. Productividad específica (Qp).

$$Qp = \frac{Y_{p/x}}{t \text{ final fase exponencial}}$$

Ecuación 8. Productividad volumétrica (Pv).

$$Pv = \frac{Pf}{t \text{ final fase exponencial}}$$

12.5 Cálculo de Rf

Se realizó el cálculo de Rf con el programa ImageJ, realizando las mediciones en pixeles.

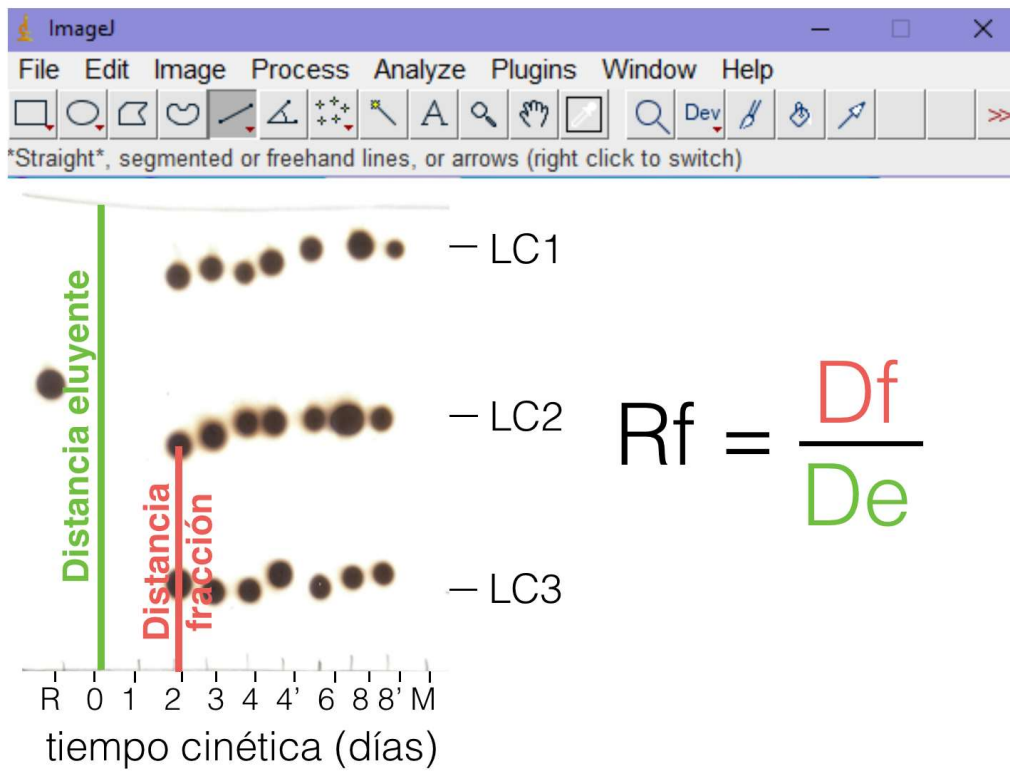


Figura A6. Ejemplo de cálculo de Rf para fracciones de la cinética con lactosa en matraces convencionales.

12.6 Ensayo de viabilidad celular

El ensayo se realizó en una placa de 96 pozos con 100 μL de células (50 000 células por pozo) y 150 μL de medio RPMI. Esta placas se dejó incubando por un día a 37°C y 5% CO_2 . Al día siguiente se retiraron de cada uno de los pozos de la placa 200 μL (dejando 30 000 células/pozo) y se adicionaron a cada carril de cada placa 20 μL de resazurina y el volumen de PBS correspondiente al que se utilizaría en cada una de las diferentes concentraciones de los ácidos triterpenoides (sin utilizar los ácidos triterpenoides) hasta obtener 300 μL de volumen total en cada pozo (Figura A7).

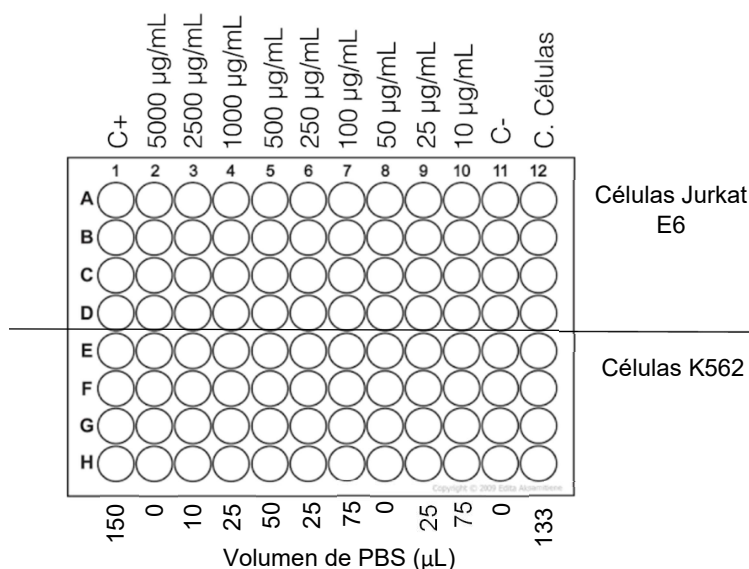


Figura A7. Volúmenes de PBS utilizados con respecto a las concentraciones de cada tratamiento.

La placa se incubó 48 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda diferentes 545 y 600 nm, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad para cada pozo con respecto al control celular (Ecuación 1). Posteriormente, la placa se incubó 24 horas más y se volvió a cuantificar la absorbancia para comparar el efecto a las 48 horas con el efecto a las 72 horas. Con el programa SigmaPlot 12, se realizó una prueba de ANOVA-Dunnnett para observar si había diferencias significativas entre cada uno de los diferentes volúmenes de PBS con respecto al control celular (0 $\mu\text{g/mL}$ de extracto).

Finalmente, se observó que no hay una diferencia significativa en la viabilidad celular en cada una de las líneas celulares utilizadas (Figura A8), por lo que el efecto citotóxico observado en los ensayos posteriores no se debe al PBS, que es un efecto mínimo, sino a los extractos o las fracciones de los mismos (Análisis estadísticos anexo 12.8).

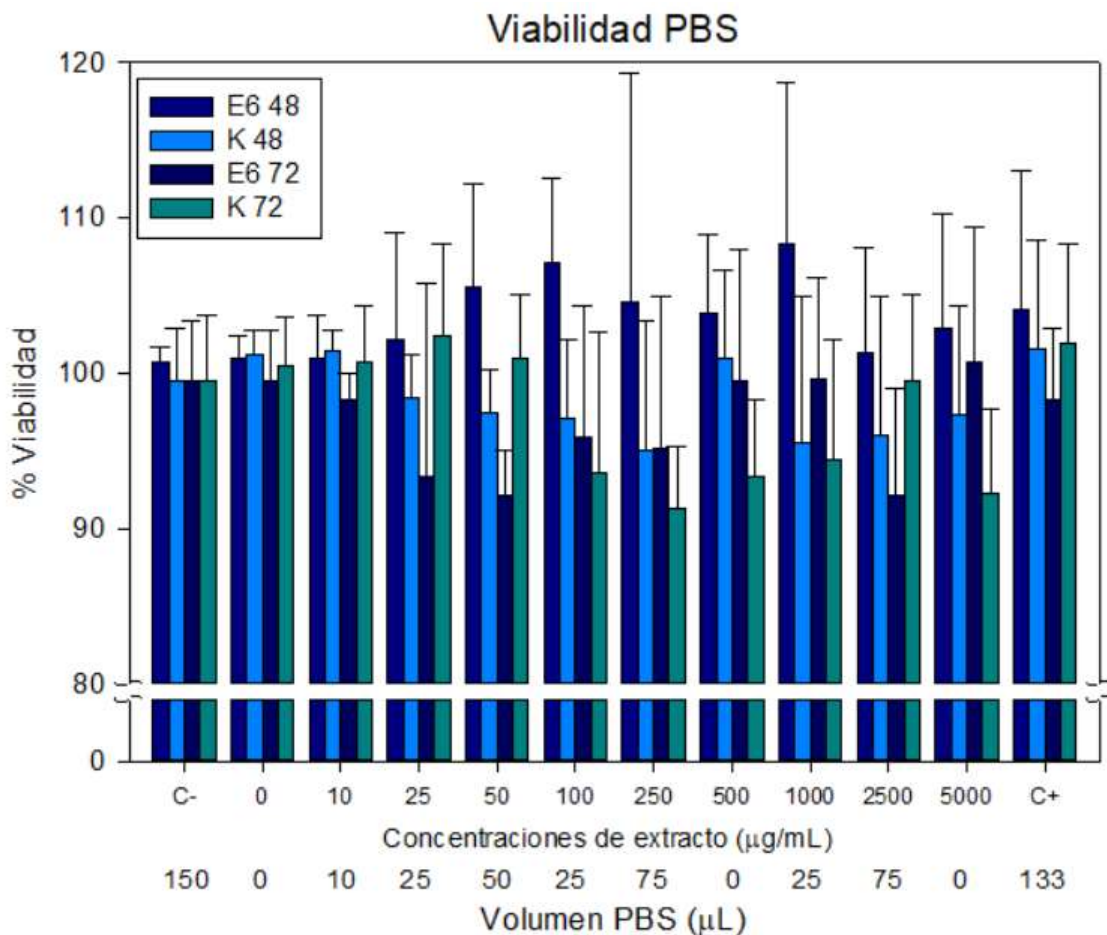


Figura A8. Porcentajes de viabilidad obtenidos para las células Jurkat E6 y K562 tratadas con diferentes volúmenes de PBS por 48 y 72 horas. Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.05$ en ninguna de las concentraciones de PBS utilizadas. C- se refiere al volumen de PBS utilizado en ensayos posteriores, los números indican las concentraciones del extracto y el volumen respectivo de PBS utilizado en ensayos posteriores, y C+ es el volumen de PBS utilizado en ensayos posteriores, en este ensayo a C+ no se le añadió H_2O_2 al 3%. La desviación estándar arriba de 100% indica proliferación celular.

12.7 Cálculo de CC₅₀

Para obtener la concentración inhibitoria media se realizaron cuatro gráficas (Figura A9) de porcentaje de citotoxicidad contra el logaritmo de la concentración del extracto (o fracción del mismo) por cada n de cada tratamiento. Posteriormente, en el programa SigmaPlot 12 se llevó a cabo la regresión lineal (anexo 12.8) para obtener la ecuaciones con la forma:

Ecuación 9. Ecuación lineal para el cálculo de CC₅₀.

$$\% \text{ Citotoxicidad} = m (\ln \text{ Concentración}) + b$$

Donde finalmente se realizó el cálculo (n = 4) para determinar la concentración promedio necesaria para tener el 50% de citotoxicidad, y la desviación estándar.

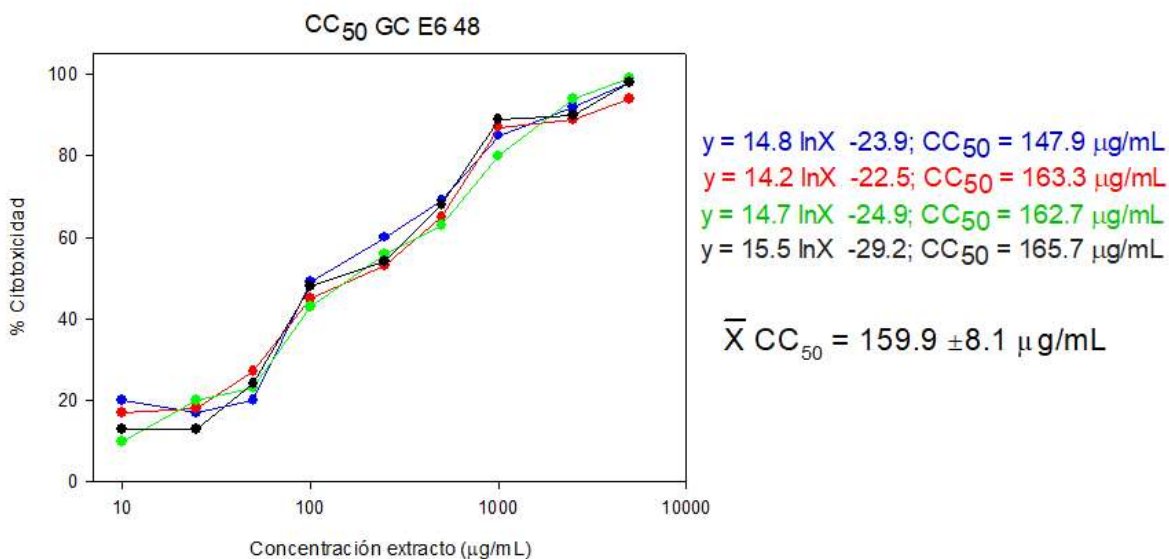


Figura A9. Ejemplo de cálculo de CC₅₀ (por cada n) para las células Jurkat E6 tratadas con el extracto de glucosa por 48 horas.

12.8 Análisis estadísticos

12.8.1 Análisis estadístico para obtener diferencias entre bandas de placas

TLC

One Way Analysis of Variance

viernes, julio 20, 2018, 13:16:56

Data source: Datos RF in Citotoxicidad.JNB

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.565)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

viernes, julio 20, 2018, 13:16:56

Data source: Datos RF in Citotoxicidad.JNB

Group	N	Missing	Median	25%	75%
gc1	30	0	0.878	0.838	0.902
gc2	30	0	0.576	0.561	0.595
gc3	30	0	0.228	0.208	0.251
gb1	30	0	0.898	0.872	0.921
gb2	30	0	0.555	0.508	0.582
gb3	30	0	0.194	0.176	0.209
lc1	30	0	0.919	0.894	0.937
lc2	15	0	0.609	0.594	0.648
lc3	30	0	0.503	0.469	0.542
lc4	30	0	0.186	0.166	0.205
lb1	30	0	0.909	0.879	0.931
lb2	30	0	0.554	0.537	0.602
lb3	30	0	0.193	0.174	0.213

H = 344.564 with 12 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)
To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
lc1 vs lc4	284.517	10.166	Yes
lc1 vs lb3	278.417	9.948	Yes
lc1 vs gb3	276.317	9.873	Yes
lc1 vs gc3	241.350	8.623	Yes
lc1 vs lc3	179.383	6.409	Yes
lc1 vs gb2	152.617	5.453	Yes
lc1 vs lb2	138.850	4.961	Yes
lc1 vs gc2	124.483	4.448	Yes
lc1 vs lc2	93.183	2.718	No
lc1 vs gc1	36.150	1.292	Do Not Test
lc1 vs gb1	17.533	0.626	Do Not Test
lc1 vs lb1	6.917	0.247	Do Not Test
lb1 vs lc4	277.600	9.919	Yes
lb1 vs lb3	271.500	9.701	Yes
lb1 vs gb3	269.400	9.626	Yes

lb1 vs gc3	234.433	8.376	Yes
lb1 vs lc3	172.467	6.162	Yes
lb1 vs gb2	145.700	5.206	Yes
lb1 vs lb2	131.933	4.714	Yes
lb1 vs gc2	117.567	4.201	Yes
lb1 vs lc2	86.267	2.517	Do Not Test
lb1 vs gc1	29.233	1.044	Do Not Test
lb1 vs gb1	10.617	0.379	Do Not Test
gb1 vs lc4	266.983	9.539	Yes
gb1 vs lb3	260.883	9.321	Yes
gb1 vs gb3	258.783	9.246	Yes
gb1 vs gc3	223.817	7.997	Yes
gb1 vs lc3	161.850	5.783	Yes
gb1 vs gb2	135.083	4.826	Yes
gb1 vs lb2	121.317	4.335	Yes
gb1 vs gc2	106.950	3.821	Yes
gb1 vs lc2	75.650	2.207	Do Not Test
gb1 vs gc1	18.617	0.665	Do Not Test
gc1 vs lc4	248.367	8.874	Yes
gc1 vs lb3	242.267	8.656	Yes
gc1 vs gb3	240.167	8.581	Yes
gc1 vs gc3	205.200	7.332	Yes
gc1 vs lc3	143.233	5.118	Yes
gc1 vs gb2	116.467	4.161	Yes
gc1 vs lb2	102.700	3.669	Yes
gc1 vs gc2	88.333	3.756	Yes
gc1 vs lc2	57.033	4.664	Yes
lc2 vs lc4	191.333	5.582	Yes
lc2 vs lb3	185.233	5.404	Yes
lc2 vs gb3	183.133	5.343	Yes
lc2 vs gc3	148.167	4.322	Yes
lc2 vs lc3	86.200	2.515	No
lc2 vs gb2	59.433	1.734	Do Not Test
lc2 vs lb2	45.667	1.332	Do Not Test
lc2 vs gc2	31.300	0.913	Do Not Test
gc2 vs lc4	160.033	5.718	Yes
gc2 vs lb3	153.933	5.500	Yes
gc2 vs gb3	151.833	5.425	Yes
gc2 vs gc3	116.867	4.176	Yes
gc2 vs lc3	54.900	3.962	Yes
gc2 vs gb2	28.133	1.005	Do Not Test
gc2 vs lb2	14.367	0.513	Do Not Test
lb2 vs lc4	145.667	5.205	Yes
lb2 vs lb3	139.567	4.987	Yes
lb2 vs gb3	137.467	4.912	Yes
lb2 vs gc3	102.500	3.662	Yes
lb2 vs lc3	40.533	1.448	Do Not Test
lb2 vs gb2	13.767	0.492	Do Not Test
gb2 vs lc4	131.900	4.713	Yes
gb2 vs lb3	125.800	4.495	Yes
gb2 vs gb3	123.700	4.420	Yes

gb2 vs gc3	88.733	3.770	Yes
gb2 vs lc3	26.767	0.956	Do Not Test
lc3 vs lc4	105.133	3.756	Yes
lc3 vs lb3	99.033	3.538	Yes
lc3 vs gb3	96.933	3.463	Yes
lc3 vs gc3	61.967	2.214	Do Not Test
gc3 vs lc4	43.167	1.542	No
gc3 vs lb3	57.067	3.324	Yes
gc3 vs gb3	34.967	1.249	Do Not Test
gb3 vs lc4	8.200	0.293	Do Not Test
gb3 vs lb3	2.100	0.0750	Do Not Test
lb3 vs lc4	6.100	0.218	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

12.8.2 Ejemplo de análisis estadístico para calcular citotoxicidad celular

One Way Analysis of Variance

martes, marzo 07, 2017, 01:08:42 p. m.

Data source: GC E6 48 in Citotoxicidad

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0.533)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.795)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
C+	4	0	99.750	2.217	1.109
5000	4	0	97.250	2.217	1.109
2500	4	0	91.250	2.217	1.109
1000	4	0	85.250	3.862	1.931
500	4	0	66.250	2.754	1.377
250	4	0	55.750	3.096	1.548
100	4	0	46.250	2.754	1.377
50	4	0	23.500	2.887	1.443
25	4	0	17.000	2.944	1.472
10	4	0	15.000	4.397	2.198
0	4	0	5.000	1.826	0.913
C-	4	0	2.750	2.217	1.109

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	11	60938.667	5539.879	671.500	<0.001
Residual	36	297.000	8.250		
Total	47	61235.667			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
C- vs. C+	97.000	47.759	<0.001	Yes
C- vs. 5000	94.500	46.529	<0.001	Yes

C- vs. 2500	88.500	43.574	<0.001	Yes
C- vs. 1000	82.500	40.620	<0.001	Yes
C- vs. 500	63.500	31.265	<0.001	Yes
C- vs. 250	53.000	26.095	<0.001	Yes
C- vs. 100	43.500	21.418	<0.001	Yes
C- vs. 50	20.750	10.217	<0.001	Yes
C- vs. 25	14.250	7.016	<0.001	Yes
C- vs. 10	12.250	6.031	<0.001	Yes
C- vs. 0	2.250	1.108	0.887	No

12.8.3 Ejemplo de análisis estadístico para obtener la regresión lineal para el cálculo de CC₅₀

Nonlinear Regression

jueves, marzo 14, 2017, 16:08:42

Data Source: Datos ET 48 in Citotoxicidad

Equation: Logarithm, 2 Parameter I

f = if(x>0, y0+a*ln(abs(x)), 0)

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.9737	0.9481	0.9407	7.8159

	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	-23.9084	7.5847	-3.1522	0.0161
a	14.7923	1.3077	11.3116	<0.0001

Analysis of Variance:

	DFSS	MS	
Regression 2	36716.3844	18358.1922	
Residual	7	427.6156	61.0879
Total	9	37144.0000	4127.1111

Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression1		7816.3844	7816.3844	127.9530	<0.0001
Residual	7	427.6156	61.0879		
Total	8	8244.0000	1030.5000		

Statistical Tests:

Normality Test (Shapiro-Wilk)

Passed (P = 0.8581)

W Statistic= 0.9660 Significance Level = 0.0500

Constant Variance Test

Passed
(P = 0.0583)

12.8.4 Ejemplo de análisis estadístico para comparar las CC₅₀ entre diferentes tratamientos

One Way Analysis of Variance

jueves, julio 12, 2017, 18:15:51

Data source: Datos CC50 in Citotoxicidad

Normality Test (Shapiro-Wilk)

Passed (P = 0.699)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.442)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
GC E6 48	4	0	159.900	8.104	4.052
LC E6 48	4	0	275.219	23.003	11.502
GC E6 72	4	0	136.743	9.935	4.967
LC E6 72	4	0	188.103	12.719	6.360
GC K 48	4	0	270.912	20.139	10.070
LC K 48	4	0	487.750	9.197	4.599
GC K 72	4	0	203.200	7.834	3.917
LC K 72	4	0	395.862	10.909	5.454
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	7	416438.207	59491.172	311.911	<0.001
Residual	24	4577.557	190.732		
Total	31	421015.764			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0.050
LC K 48 vs. GC E6 72	351.008	8	50.832	<0.001	Yes
LC K 48 vs. GC E6 48	327.850	8	47.478	<0.001	Yes
LC K 48 vs. LC E6 72	299.647	8	43.394	<0.001	Yes
LC K 48 vs. GC K 72	284.551	8	41.208	<0.001	Yes
LC K 48 vs. GC K 48	216.838	8	31.402	<0.001	Yes
LC K 48 vs. LC E6 48	212.531	8	30.778	<0.001	Yes
LC K 48 vs. LC K 72	91.889	8	13.307	<0.001	Yes
LC K 72 vs. GC E6 72	259.119	8	37.525	<0.001	Yes
LC K 72 vs. GC E6 48	235.962	8	34.171	<0.001	Yes
LC K 72 vs. LC E6 72	207.759	8	30.087	<0.001	Yes
LC K 72 vs. GC K 72	192.662	8	27.901	<0.001	Yes
LC K 72 vs. GC K 48	124.950	8	18.095	<0.001	Yes
LC K 72 vs. LC E6 48	120.642	8	17.471	<0.001	Yes
LC E6 48 vs. GC E6 72	138.477	8	20.054	<0.001	Yes
LC E6 48 vs. GC E6 48	115.319	8	16.700	<0.001	Yes
LC E6 48 vs. LC E6 72	87.116	8	12.616	<0.001	Yes
LC E6 48 vs. GC K 72	72.020	8	10.430	<0.001	Yes
LC E6 48 vs. GC K 48	4.307	8	0.624	1.000	No
GC K 48 vs. GC E6 72	134.169	8	19.430	<0.001	Yes
GC K 48 vs. GC E6 48	111.012	8	16.076	<0.001	Yes
GC K 48 vs. LC E6 72	82.809	8	11.992	<0.001	Yes
GC K 48 vs. GC K 72	67.712	8	9.806	<0.001	Yes
GC K 72 vs. GC E6 72	66.457	8	9.624	<0.001	Yes
GC K 72 vs. GC E6 48	43.300	8	6.271	0.004	Yes
GC K 72 vs. LC E6 72	15.097	8	2.186	0.776	No
LC E6 72 vs. GC E6 72	51.360	8	7.438	<0.001	Yes
LC E6 72 vs. GC E6 48	28.203	8	4.084	0.120	No
GC E6 48 vs. GC E6 72	23.157	8	3.354	0.299	No