



# Actividad citotóxica de extractos de hongos silvestres de Ensenada, Baja California, México

## Cytotoxic activity of wild mushrooms extracts from Ensenada, Baja California, Mexico

Hugo López Sánchez<sup>1</sup>, Nahara Ayala Sánchez<sup>1</sup>, Olivia Rodríguez Alcantar<sup>3</sup>, Amelia Portillo López<sup>1</sup>,  
Ana Íñiguez Martínez<sup>2</sup>, Irma Soria Mercado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias y <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Km 103 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada CP 22830, Baja California, México. <sup>3</sup>Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara, Zapopan CP 45101, Jalisco, México

### RESUMEN

Un total de 35 extractos etanólicos fueron obtenidos a partir de cuerpos fructíferos de hongos silvestres de Ensenada, Baja California. Un total de 18 extractos fueron seleccionados con base en su solubilidad para analizar su efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de pulmón H-460. De los extractos analizados: *Agaricus xanthodermus*, *Boletus amygdalinus* y *Gastrum corollinum* resultaron ser los más bioactivos presentando más del 50% de mortalidad en los cultivos celulares probados. Este estudio representa el primer reporte del potencial uso medicinal de la diversidad fúngica de la región.

**PALABRAS CLAVE:** anticancerígenos, citotoxicidad, basidiomicetos.

### ABSTRACT

A total of 35 ethanol extracts were obtained from wild fruiting bodies mushrooms from Ensenada, Baja California. Eighteen extracts were selected based on their solubility to analyze their cytotoxic effect on lung cancer cell lines H-460. Extracts analyzed: *Agaricus xanthodermus*, *Boletus amygdalinus* and *Gastrum corollinum* were the most bioactive presented more than 50% of mortality on tested cell cultures. This study represents the first report of the medicinal potential use from fungal diversity located in this region.

**KEYWORDS:** anticancer, cytotoxicity, basidiomycetes.

Los hongos silvestres de Ensenada, Baja California, han sido estudiados por varios autores, tanto sus aspectos taxonómicos como ecológicos (Ayala y Guzmán, 1984; Ayala *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1993; Candusso *et al.*, 1994; Moreno y Ayala, 1996, 2003, 2007). Sin embargo, solo se conoce su distribución en la zona mediterránea californiana.

Uno de los atributos más relevantes que se ha documentado en hongos silvestres, son sus propiedades medicinales como

antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y anticancerígenas. Entre los principios activos anticancerígenos, bioquímicamente están representados por lectinas,  $\beta$ -glucanos, ergosteroles y argininas, que actúan en la estimulación del sistema inmunológico, antiproliferación, angiénesis y daño celular (Novaes *et al.*, 2007, 2011).

El presente estudio tiene como objetivo analizar el efecto citotóxico de extractos orgánicos de hongos silvestres de Ensenada, Baja California, sobre líneas celulares epiteliales de cáncer de pulmón (ATCC: NCI-H-460). Para lo cual se realizaron recolectas de cuerpos fructíferos de hongos en la región de Ensenada, en áreas con encino (*Quercus agrifolia* Nee.), durante los meses de noviembre a marzo del año 2012 al 2013, periodo en el que se presentó la mayor precipitación pluvial en la zona. Las

Recibido / Received: 10/08/2015

Aceptado / Accepted: 27/04/2016

Autor para correspondencia / Corresponding author:

Irma Soria Mercado

iesoria@uabc.edu.mx

especies obtenidas fueron caracterizadas y deshidratadas para su conservación. Todo el material fue descrito macroscópicamente en fresco y para el análisis microscópico se empleó material deshidratado, para lo cual se hicieron cortes finos y se montaron con hidróxido de potasio (KOH) al 5%, rojo de Congo y azul de algodón de lactofenol. El material fue identificado microscópicamente con base en bibliografía especializada (Earle, 1905; Breitenbach y Kränzlin, 1991; Moser y Ammirati, 1997; Ayala y Moreno, 2007; Bojantchev y Davis, 2011). Los ejemplares identificados se depositaron en el herbario BCMEX de la Universidad Autónoma de Baja California.

De cada ejemplar identificado se prepararon extractos etanólicos, para lo cual se tomó una muestra de cuerpo fructífero deshidratado y se cortó en pequeños trozos (aprox. 1 cm<sup>3</sup>) y se colocaron por separado en recipientes de vidrio con etanol. Se dejaron extraer por aproximadamente dos semanas, se filtraron al vacío y el líquido se concentró hasta sequedad mediante destilación a presión reducida en un rotoevaporador (HEIDOLPH®, modelo Collegiate) a una temperatura no mayor a 35 °C. El sólido resultante se recuperó con 5 mL de etanol en viales a peso constante y de nuevo se concentraron a sequedad en el rotoevaporador y se pesaron. De cada extracto se hicieron diluciones a una concentración de 0.1 mg/mL con agua destilada.

Una vez preparadas las diluciones para el bioensayo, se cultivaron las células epiteliales de cáncer de pulmón en medio comercial "Roswell Park Memorial Institute Medium" (RPMI, SIGMA # R0883) suplementado con suero fetal bovino (SIGMA # 12133C) y antibiótico (SIGMA # A5955) en una campana de flujo laminar. Las células fueron resuspendidas en medio fresco de RPMI. Se tomó 1 mL de esta suspensión y se le añadió 5 µL de azul de metileno y 85 µL de amortiguador de fosfatos salino pH 7.0 para su cuantificación en una cámara Neubauer bajo un microscopio óptico a 400X. Enseguida se ajustó la concentración a 500,000 células por mililitro (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012).

Para la valoración de citotoxicidad se colocaron 5,000 células en cada uno de los 96 pozos de la placa, se les añadió 100 µL del medio RPMI y 20 µL de cada extracto etanólico, por triplicado. Como control positivo se empleó sulfóxido de dimetilo (DMSO) y como control negativo se empleó el mismo método pero sin extracto. Los cultivos se incubaron por 24 horas en un

ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, se valoraron las células viables en proliferación, añadiendo 20 µL del reactivo CELLTiter 96® a cada pozo y dejándolas reposar de 3 a 4 h. Enseguida se realizó la lectura de las placas observando su absorbancia a 495 nm en un lector ELISA (Thermo Scientific®). Finalmente se calculó el porcentaje de mortalidad de células de cáncer de pulmón, empleando las absorbancias obtenidas utilizando las siguientes formulas:

$$\% \text{ de mortalidad} = (\text{Abs del DMSO} / \text{Abs de la muestra}) * 100$$

$$\% \text{ de sobrevivencia} = 100 - \% \text{ de mortalidad}$$

Donde Abs = Absorbancia, Abs del DMSO = 0.2440

Se obtuvieron un total de 35 extractos etanólicos a partir de los cuerpos fructíferos secos correspondientes a 26 especies de hongos, los cuales fueron recolectados en 17 diferentes localidades, principalmente de bosques de encino (Tabla 1). Es importante recalcar que la cantidad de extracto que se obtuvo, dependió directamente de la biomasa de los basidiomas, de tal manera que a mayor biomasa mayor extracto obtenido.

Aunque se lograron recolectar 35 muestras, solo de 18 extractos de 15 especies fue posible evaluar su efecto citotóxico, ya que la poca solubilidad que presentaron en agua destilada, impidió que se registraran datos confiables de absorbancia. Lo anterior debido a que estos extractos contienen en su mayoría sustancias apolares como ácidos grasos, que pueden ser utilizado en otros estudios, para evaluar otro tipo de actividades como: antibacteriales o cardiotónicos.

Se consideraron bioactivos aquellos extractos que produjeron un porcentaje de mortalidad mayor al 50% en los cultivos celulares de cáncer de pulmón, sin que esto signifique que aquellas que presentaron un porcentaje menor no la tengan, ya que como se puede observar en la Figura 1 hay una gran bioactividad en las muestras seleccionadas. De tal manera que *A. xanthodermus* Genev., *Boletus amygdalinus* (Thiers) Thiers, y *Geastrum corollinum* (Batsch) Hollós resultaron ser las más bioactivas por tener los porcentajes de mortandad por encima del 50 % (Figura 1).



Tabla 1. Especies estudiadas, datos de colecta y cantidad de extracto obtenido

Especie	Sitio de colecta	Número de colección	Peso del extracto obtenido (g)
<i>Agaricus bisporus</i>	11	BCMEX-5575	0.1684
<i>A. xanthodermus</i>	14	BCMEX-5588	0.2679
	2	BCMEX-5601	0.1252
	2	BCMEX-5563	0.1563
	7	BCMEX-5678	0.412
<i>Amanita magniverrucata</i>	3	BCMEX-5609	0.4037
<i>A. velosa</i>	8	BCMEX-5647	0.1664
<i>Armillaria mellea</i>	4	BCMEX-5520	0.8229
<i>Astraeus hygrometricus</i>	6	BCMEX-5529	0.1854
<i>Boletus amygdalinus</i>	2	BCMEX-5565	3.3343
	14	BCMEX-5578	3.0718
<i>B. dryophilus</i>	2	BCMEX-5566	0.8079
<i>Calvatia fragilis</i>	9	BCMEX-5539	0.2593
<i>Chlorophyllum brunneum</i>	3	BCMEX-5557	0.8739
<i>Coprinopsis atramentaria</i>	15	BCMEX-5497	0.1337
<i>Coprinus comatus</i>	12	BCMEX-5531	1.6845
<i>Cortinarius</i> sp.	3	BCMEX-5552	1.6177
<i>Geastrum corollinum</i>	14	BCMEX-5592	0.029
<i>Gymnopilus spectabilis</i>	5	BCMEX-5521	1.9881
<i>Gymnopus</i> sp.	13	BCMEX-5543	4.0842
<i>Laccaria laccata</i>	8	BCMEX-5637	3.0284
<i>Lactarius alnicola</i>	4	BCMEX-5517	1.6159
	3	BCMEX-5606	0.6476
	13	BCMEX-5623	0.4063
	17	BCMEX-5626	0.3122
	8	BCMEX-5632	2.8632
<i>L. rufilus</i>	3	BCMEX-5669	0.2072
<i>Lepista nuda</i>	2	BCMEX-5572	1.0532
<i>Leucopaxillus gentianeus</i>	14	BCMEX-5581	0.234
<i>Omphalotus olivascens</i> var. <i>indigo</i>	10	BCMEX-5511	2.9905
	3	BCMEX-5522	6.6575
<i>Suillus brevipes</i>	16	BCMEX-5747	5.3027
<i>Tulostoma fimbriatum</i>	9	BCMEX-5685	0.1268
<i>Volvariella speciosa</i>	2	BCMEX-5599	1.5043
<i>Xerocomus subtomentosus</i>	6	BCMEX-5524	3.1352

Localidades: 1. Arroyo San Miguel. 2. Arroyo Villas del Prado. 3. Cañón Doña Petra. 4. El Gallo. 5. El Junco. 6. El Salto. 7. Ejido Uruapan. 8. Las Chichihuas. 9. La Misión. 10. Las Lomas. 11. Parque Revolución. 12. Presa Emilio López Zamora. 13. Rancho la cascada. 14. San José de la Zorra. 15. La Misión. 16. UABC Sauzal. 17. Zona Urbana.

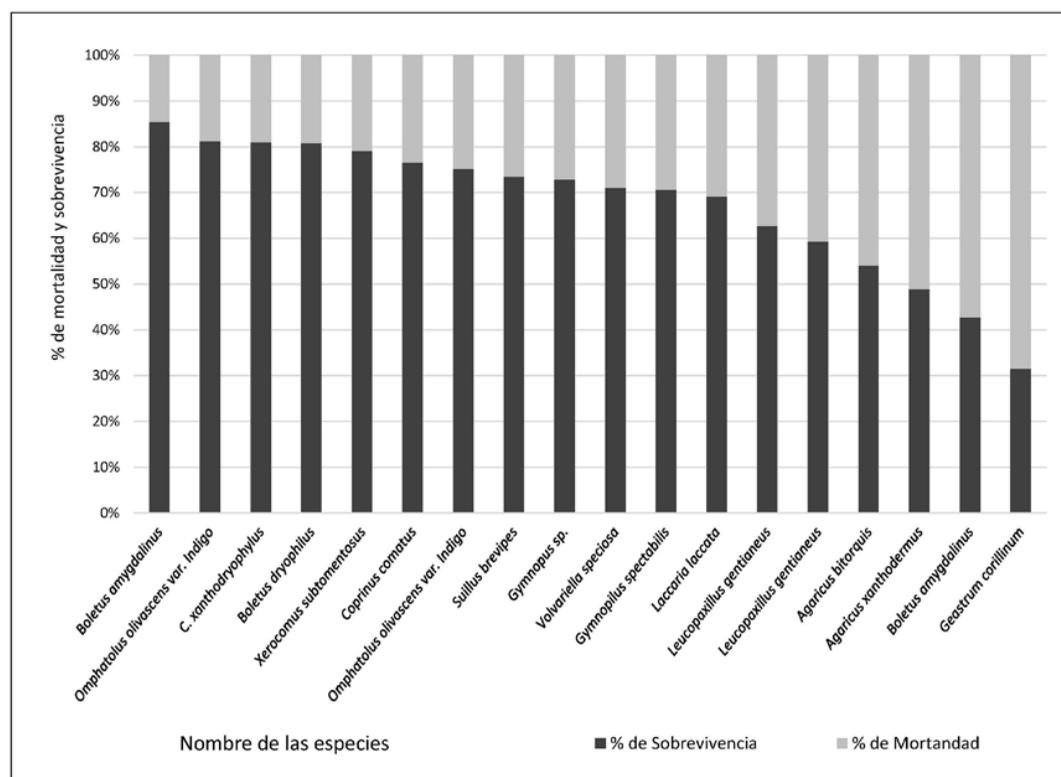


Figura 1. Porcentaje de mortalidad y supervivencia en los cultivos, con extractos etanólicos de hongos silvestres frente a la línea celular de cáncer de pulmón H-460.

Evidentemente todos los *taxa* que fueron sometidos a esta evaluación tienen por naturaleza una importancia ecológica. Sin embargo *A. xanthodermus*, *B. amygdalinus* y *G. corollinum* se les asigna un valor adicional por los atributos medicinales que pueden representar, los cuales se discuten a continuación:

*Agaricus xanthodermus* se reconoce fácilmente por su cambio de color amarillo intenso, ya sea al tacto o al agregarle KOH al 5%, además de su fuerte olor a fenol. Es considerada una especie tóxica no mortal, que cuando se ingiere causa dolor estomacal, náuseas, vómito y diarrea (Arora, 1986). Estudios sobre la composición química de este basidiomiceto, indican que los trastornos que ocasiona son debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos que contiene, como 4,4'-dihidroxiabenzeno, fenol, p-quinol, y 4,4'-dihidroxi-bifenilo, los cuales están también involucrados en el cambio de color para su identificación (Gill y Strauch, 1984).

*Boletus amygdalinus* es una especie de la región mediterránea californiana, la cual forma una asociación micorrizógena con *Quercus agrifolia* (García-Jiménez, 1999). Esto en aspectos

de conservación y manejo de recurso bióticos, simboliza una señal de alarma para valorar y contemplar a estos hongos, tanto por su relevancia ecosistémica, como por su potencial medicinal. Cabe destacar que en especies cercanas con alto valor culinario como *Boletus edulis*, se ha examinado su efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de hepatoma BEL-7402, colon HT-29, pulmón SPC-A1 y glioblastoma U-251, con una concentración inhibitoria máxima media ( $IC_{50}$ ) de 6.29, 6.98, 4.79 y 7.54  $\mu$ M, respectivamente (Liang, 2014).

Un dato relevante es la variación de la citotoxicidad de los extractos, en una especie de acuerdo con los sitios de colecta. En la Figura 1 se pueden apreciar como las muestras de *Boletus amygdalinus* colectadas en distintas localidades, presentaron resultados de mortalidad (14.61% y 57.23%) y supervivencia (85.39% y 42.77%), en un intervalo muy amplio. Se ha señalado que los factores ambientales y/o sustrato influyen en la producción de ciertos metabolitos secundarios (Páres y Juárez, 1997), condiciones que habría que demostrar si estarían afectando en la producción de compuestos citotóxicos, como en este estudio.



*Geastrum corollinum* obtuvo los valores más altos en mortalidad (68.48%), sobre los cultivos celulares de cáncer de pulmón. Al respecto, se ha documentado en otras especies del mismo género como *G. saccatum* Fr., que tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citotóxicas, y sus extractos son abundantes en  $\beta$ -glucanos (Dore *et al.*, 2007).

La bioactividad encontrada en este trabajo es similar a la encontrada en un trabajo paralelo en el que se estudiaron varias especies de hongos agaricales, reportados con propiedades medicinales.

Específicamente la especie *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. recolectada también en la región de Ensenada, presentó un porcentaje de mortalidad de 47% frente a células de cáncer de pulmón H-460, y de 27 % frente a células de cáncer colorrectal HCT-116. *Ganoderma lucidum* también presentó propiedades antioxidantes al dar positiva la reacción de decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno con un 51.04%, así como reducción del radical catión ABTS<sup>+</sup> con una concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) de 0.987 (Proyecto de Investigación 2012-Oseo-Cdti-188920, CONACYT), *G. lucidum* contiene metabolitos secundarios que comprenden polisacáridos, triterpenoides y esteroides, con propiedades farmacológicas como antitumorales, inmunomoduladoras, hipoglucemiantes, entre otras (Lindequist, 1995; Zhou, *et al.*, 2007; Chang y Buswell, 2008).

En este estudio se comprobó que los ejemplares colectados en Ensenada, BC, podrían representar una buena fuente de compuestos con actividad citotóxica y antioxidante. Este estudio representa el primer reporte del potencial uso medicinal de la diversidad fúngica de la región.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PROMEP de la Red Calidad Ambiental y Desarrollo Sustentable # 9023. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico en la realización de la tesis de maestría, el cual uno de los productos finales es la publicación de este artículo. Al proyecto CONACYT: Producción de principios activos de alto valor agregado a partir de hongos medicinales y evaluación de su aplicabilidad en el sector alimentario y farmacéutico, clave 2012-oseo-cdti-188920. Asimismo a Mario Raygoza Reyes, estudiante de Biología, UABC, por su

colaboración en las recolectas del material fúngico, a C. Meza por el apoyo en la elaboración de la Figura 1.

## LITERATURA CITADA

- Arora, D., 1986. Mushrooms demystified. Ten Speed Press, Berkeley.
- Ayala, N., G. Guzmán, 1984. Los hongos de la península de Baja California, I. Las especies conocidas. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología 19: 73-91.
- Ayala, N., I. Manjarrez, G. Guzmán, H. Thiers, 1988. Los hongos de Baja California, III. Las especies conocidas del género *Amanita*. Revista Mexicana de Micología 4: 69-74.
- Ayala, N., G. Moreno, 2007. Catálogo de hongos Agaricoides de Baja California, México. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 31: 91-109.
- Becerril-Espinosa, A., G. Guerra-Rivas, N. Ayala-Sánchez, I. Soria-Mercado, 2012. Antitumor activity of actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay. Baja California, Mexico. Revista de Biología Marina y Oceanografía 47: 317-325.
- Bojantchev, D., R.M. Davis, 2011. *Cortinarius xanthodryophilus* sp. nov. - a common *Phlegmacium* under oaks in California. Mycotaxon 116: 317-328.
- Breitenbach, J., F. Kränzlin, 1991. Fungi of Swizerland. In: Agarics, Cortinariaceae. Mykologia, Switzerland. pp. 338.
- Candusso, M., A. Gennari, N. Ayala, 1994. Agaricales of Baja California - México. Myxotaxon 50: 175-189.
- Chang, S., J. Buswell, 2008. Safety, quality control and regulational aspects relating to mushroom nutraceuticals. Proc. 6th Intl. Conf. Mushroom Biology and Mushroom Products. GAMU GmbH, Krefeld, Bonn, p. 188.
- Dore, C.M.P.G., T.C.G. Azevedo, M.C.R. de Souza, L.A. Rego, J.C.M. de Dantas, F.R.F. Silva, H.A.O. Rocha, I.G. Baseia, E.L. Leite, 2007. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. Immunopharmacology 7: 1160-1169.
- Earle, F.S., 1905. Mycological Studies II. Bulletin of the New York Botanical Garden 3: 289-463.
- García-Jiménez, J., 1999. Estudio sobre la taxonomía, ecología y distribución de algunos hongos de la familia Boletaceae (Basidiomycetes, Agaricales) de México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Forestales, UANL, Linares.
- Gill, M., R.J. Strauch, 1984. Constituents of *Agaricus xanthodermus* Geneviev: The first naturally endogenous azo compound and toxic phenolic metabolites. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung 39: 1027-1029.
- Liang, Q.L., 2014. Isolation, structure identification and cytotoxicity evaluation of three steroids from *Boletus edulis*. Applied Mechanics and Materials 675-677: 1670-1673.
- Lindequist, U., 1995. Structure a biological activity of triterpens, polysaccharides and other constituents of *Ganoderma lucidum*. In: Kim B.K., I.H. Kim, Y.S. Kim (ed.), Recent advances in *Ganoderma lucidum* research. Pharmaceutical Society of Korea, Seoul. pp 61-69.
- Moreno, G., N. Ayala, 1996. Agaricales *sensu lato* de Baja California (México) I. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 21: 305-323.
- Moreno, G., N. Ayala, 2003. Agaricales *sensu lato* de Baja California (México) II. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 27: 67-78.
- Moreno, G., N. Ayala, 2007. Agaricales *sensu lato* de Baja California (México) III. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 31: 21-33.

- Moreno, G., F. Esteve-Raventos, R. Poder, N. Ayala, 1993. *Omphalotus olivaceus* var. *indigo*, var. nov. from Baja California (México). *Mycotaxon* 48: 217-222.
- Moser, M., J. Ammirati, 1997. Studies on North American *Cortinarii* IV. New and interesting *Cortinarius* species (subgenus *Phlegmациum*) from oak forest in Northern California. *Sydowia* 49: 25-48.
- Novaes, M.R.C.G., L.C.G. Novaes, V.C. Taveira, 2007. Natural products from Agaricales medicinal mushrooms: Biology, nutritional properties, and pharmacological effects on cancer. *Revista Brasileira de Cancerología* 53: 411-420.
- Novaes, M.R.C.G., F. Valadares, M.C. Reis, D.R. Goncalves, M.C. Menezes, 2011. The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence based medicine. *Clinics* 66: 2133-2139.
- Páres, R., A.R. Juárez, 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté, Barcelona.
- Zhou, X., J. Lin, Y. Yin, J. Zhao, X. Sun, K. Tang, 2007. Ganodermataceae: Natural products and their related pharmacological functions. *American Journal of Chinese Medicine* 35: 559-574.