

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTI-VIH-1 DE LOS CRUDOS
ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR LOS HONGOS *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.***

**LAURA FLÓREZ SAMPEDRO
LINA PAOLA OROZCO MARÍN**

Trabajo escrito para optar al título de Bióloga

Asesora:

**MARÍA TERESA RUGELES LÓPEZ, Bact, MSc, DSci
Profesora titular, Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina,
Universidad de Antioquia**

Co-asesor

**WILDEMAN ZAPATA BUILES, Bact, MSc
Estudiante de Doctorado, Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina,
Universidad de Antioquia**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN**

2011

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Pandemia del VIH	4
1.2. Generalidades y patogénesis del VIH-1	5
1.3. Tratamiento contra el VIH-1	7
1.4. Género <i>Ganoderma</i>	9
1.5. Género <i>Lentinus</i>	10
1.6. Lacasa	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. HIPOTESIS DE TRABAJO	16
4. OBJETIVOS	16
4.1. Objetivo General	16
4.2. Objetivos Específicos	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1. Área de trabajo	17
5.2. Producción del crudo enzimático	17
5.3. Líneas celulares	18
5.4. Producción del virus	18
5.5. Ensayo de citotoxicidad	19
5.6. Inhibición de la replicación	19
5.7. Inhibición de la transcripción reversa	20
5.8. Análisis estadístico	20
6. RESULTADOS	21
7. DISCUSIÓN	24
8. BIBLIOGRAFÍA	30
9. TABLAS Y FIGURAS	39

RESUMEN

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es una pandemia mundial, para la cual existen más de 20 medicamentos antirretrovirales, que han mejorado considerablemente la calidad y la expectativa de vida de los individuos infectados. Sin embargo, el costo tan alto y los efectos secundarios asociados al uso continuo de estos medicamentos, resaltan la importancia de mantener la búsqueda constante de estrategias de tratamiento que limiten la replicación viral y potencien la respuesta inmune. En este sentido, es prioritario emprender la búsqueda de tratamientos alternativos, que sean efectivos, económicos y de fácil acceso.

El potencial de muchos hongos del filo Basidiomycota como medida terapéutica o preventiva de algunas enfermedades, ha despertado el interés de la comunidad científica, la cual ha invertido mucho esfuerzo y dinero en el aislamiento y caracterización de componentes activos y en determinar los procesos moleculares involucrados en el mecanismo de acción. Los géneros *Ganoderma* y *Lentinus*, hacen parte del conjunto de hongos medicinales a los que se les han atribuido diversas propiedades y que además, se encuentran distribuidos dentro del territorio colombiano, con algunas especies reconocidas y otras autóctonas. Estudios previos indican que la enzima lacasa de varias especies de hongos inhibe la transcriptasa reversa (TR) del VIH-1, en modelos *in vitro* libre de células. Sin embargo, no existen reportes de la actividad contra el VIH-1 de la lacasa obtenida de especies autóctonas de hongos pertenecientes a estos géneros. El objetivo de esta tesis fue evaluar la actividad anti-VIH-1 *in vitro* de los crudos enzimáticos ricos en la enzima lacasa, producidos por dos especies autóctonas de hongos pertenecientes al género *Ganoderma* y al género *Lentinus*, usando un modelo celular cuyas condiciones se asemejan más a las encontradas *in vivo*. De encontrarse actividad antiviral, se exploraría si la lacasa tiene o no actividad sobre la transcripción reversa.

Al crudo enzimático (CE) producido en un biorreactor se le evaluó la citotoxicidad en la línea celular U373-MAGI, por medio del ensayo MTT. Para las infecciones se

utilizaron virus recombinantes (VR) producidos por medio de una cotransfección de los plásmidos pHIV.GFP delta env y pVSV.G (gen G/virus de estomatitis vesicular), en las células 293T. La evaluación de la inhibición de la replicación viral se realizó en la línea celular U373-MAGI infectada con los VR y en presencia/ausencia del CE rico en lacasa. Cuarenta y ocho horas post-infección (hpi), se determinó el porcentaje de células infectadas por citometría de flujo (CF) para GFP y ELISA para p24. Se cuantificaron los productos tempranos/tardíos de TR mediante PCR en tiempo real. Para estos experimentos se contó con un control de inhibición de la transcripción reversa, Zidovudina (AZT). Los análisis estadísticos de los resultados se hicieron con el programa GraphPad Prism versión 5.0.

Según los resultados obtenidos, los crudos enzimáticos ricos en lacasa de *Ganoderma sp.* y de *Lentinus sp.* inhiben de forma significativa ($p < 0.05$) la replicación del virus VIH-1, entre la concentración citotóxica del 50% (CC_{50}) y la concentración citotóxica del 30% (CC_{30}), con porcentajes comparables a los obtenidos con el AZT (80-90%). Además, parecen tener un efecto igualmente significativo sobre la actividad de la enzima viral TR ($p \leq 0.02$). Las concentraciones inhibitorias del 50% (IC_{50}) encontradas para cada tratamiento fueron: Lote 1 *Ganoderma sp.*: 1042.127 U/L; Lote 2 *Ganoderma sp.*: 2034.835 U/L; *Lentinus sp.*: 516.871 U/L. Los índices de selectividad (IS) encontrados para los crudos se encuentran entre 2 y 4.

Estos resultados muestran la capacidad inhibitoria de los crudos enzimáticos ricos en lacasa de *Ganoderma sp.* y de *Lentinus sp.* sobre la replicación del VIH-1. Se hace necesario seguir su caracterización para que eventualmente puedan ser considerados como terapia alternativa o complementaria a la terapia antirretroviral convencional.

Palabras clave: Productos naturales, extractos de hongos, virus de la inmunodeficiencia humana, actividad antiviral, *Ganoderma*, *Lentinus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Pandemia del VIH

Desde su aparición y con el transcurso del tiempo, la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha constituido en uno de los principales problemas de salud pública mundial, instaurando nuevos retos para lograr su prevención y control. A nivel mundial, casi 60 millones de personas se han infectado con el VIH-1 y 25 millones de personas han fallecido por causas relacionadas con este virus (ONUSIDA, 2009). Los datos epidemiológicos recientes señalan que para finales del año 2009, en el mundo un estimado de 33,3 millones de personas vivían con el VIH; además, se reportaron aproximadamente 2.6 millones de nuevas infecciones y 1.8 millones de personas murieron por causa de enfermedades relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)(ONUSIDA, 2010).

La epidemia del VIH es heterogénea; afecta a diferentes poblaciones y regiones de distintas maneras. Según el reporte más reciente de ONUSIDA, para Colombia a finales del año 2009 un estimado de 160000 personas vivían infectadas con el VIH-1, con una prevalencia en adultos del 0.5% y aproximadamente 14000 personas murieron por causa del SIDA (ONUSIDA 2010). En Colombia se observa una epidemia de tendencia creciente con un aumento progresivo en el número de hombres infectados; el mecanismo más probable de transmisión es heterosexual y la mortalidad tiene un crecimiento lento, con predominio en hombres de todas las edades (ONUSIDA Colombia 2010).

La terapia antirretroviral ha sido muy eficiente en disminuir la carga viral, la probabilidad de nuevas infecciones y en prolongar y mejorar la calidad de vida de aquellos que se encuentran infectados; sin embargo, el acceso limitado y los efectos secundarios, son los principales problemas que se asocian con este tipo de tratamiento. A nivel mundial, para finales del año 2009, solo el 36% (alrededor de 5.2 millones de personas) de las 15 millones de personas que necesitaban tratamiento

en países de ingresos medios y bajos estaban recibiendo la terapia antirretroviral. En este mismo año, en Colombia la terapia tuvo una cobertura del 71% (ONUSIDA Colombia 2010). Recientemente, se demostró que menos del 40% de los jóvenes tienen información básica acerca del VIH y menos del 40% de las personas que viven con el VIH conocen su estado serológico. Es por esto que las nuevas infecciones siguen teniendo la ventaja respecto al número de personas que reciben tratamiento, tanto que por cada dos personas que comienzan el tratamiento, otras cinco se infectan con el virus (ONUSIDA, 2009). La falta de conciencia y cultura en este tema, dificulta la obtención de resultados positivos frente a esta pandemia.

1.2. Generalidades y patogénesis del VIH-1

El VIH es un miembro de la familia *Retroviridae*, perteneciente al género *Lentivirus* (Pascual y Corral, 2003). Desde su descubrimiento en 1983 se han identificado dos serotipos, denominados VIH-1 y VIH-2 (Requejo, 2006). El VIH-1, distribuido por todo el mundo, es la causa más frecuente del SIDA. El VIH-2, el cual difiere en su estructura genómica y antigenicidad respecto al VIH-1, se ha encontrado principalmente en el oriente de África, así como también en Europa, Estados Unidos y Sur America (O'Brien *et al.*, 1992), produciendo un síndrome clínico similar aunque menos severo.

El proceso de replicación viral, que se lleva a cabo en aproximadamente 24 horas, incluye las siguientes etapas: i) unión de la partícula viral a los receptores de la célula, y fusión de la envoltura viral con la membrana celular; ii) entrada de la cápside y liberación del genoma viral al citoplasma; iii) síntesis de la copia de ADN; iv) transporte al núcleo de este ADN e integración en el genoma de la célula hospedera; v) transcripción del RNA viral, exportación al citoplasma y síntesis de las proteínas virales; vi) ensamblaje del virión y salida por gemación de las partículas virales y vii) maduración de los viriones.

El proceso se inicia con la unión de la proteína viral gp120 a la molécula CD4 de la célula blanco; esta interacción induce un cambio conformacional en la gp120 que favorece la interacción de esta proteína con las proteínas celulares que actúan como correceptores virales, las moléculas CCR5 y CXCR4. Estas interacciones promueven la exposición de un motivo de fusión en el extremo N-terminal de la proteína gp41, induciendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Posteriormente se da el desnudamiento de la cápside proteica dentro del citoplasma, el material genético, que se encuentra allí en forma de dos cadenas idénticas de ARN, es transcrito a ADN dentro de la célula usando la enzima viral TR, una enzima multifuncional característica de los retrovirus y blanco de muchos fármacos, que lleva a cabo la polimerización de ADN dependiente de ARN y de ADN. El resultado de este proceso es una doble cadena de ADN, que luego entra en el núcleo y se integra en el genoma de la célula hospedera como provirus (Sato *et al.*, 1992), mediante la acción de la enzima viral integrasa. El provirus utiliza la maquinaria celular para su transcripción (Poli y Fauci, 1992). La síntesis de partículas virales infecciosas depende de la producción de transcritos de ARN virales completos y la obtención de proteínas virales; la producción de estas proteínas involucra la exportación de los ARNm desde el núcleo celular y su traducción a poliproteínas en el citoplasma, que posteriormente serán escindidas a proteínas por proteasas celulares o víricas, durante el empaquetamiento de dichos transcritos dentro de un complejo nucleoprotéico que incluye proteínas estructurales; este complejo se rodea por una cubierta de membrana y se libera de la célula por un proceso de gemación desde la membrana plasmática, dando origen finalmente a nuevos viriones (von Schwedler *et al.*, 2003).

Durante la infección por el VIH-1 se observa una disminución progresiva en el número y función de los linfocitos T CD4+, células fundamentales en el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral; su eliminación induce una inmunodeficiencia severa, que hace susceptibles a los individuos infectados al desarrollo de diferentes neoplasias y enfermedades oportunistas que, en última instancia, conducen a la muerte (Zapata *et al.*, 2006).

El VIH-1 es transmitido por medio de fluidos corporales que contienen VIH-1 o células infectadas con el virus incluyendo suero, semen, secreciones vaginales, fluidos amnióticos y leche materna (Staprans y Feinberg, 1997). La cantidad de virus en los fluidos es un factor determinante de la transmisión, lo cual está directamente relacionado con la etapa de la infección del individuo seropositivo (SP) (Bradley-Springer y Cook, 2006), así como con el estado de salud y si recibe o no tratamiento antirretroviral. El individuo es más infeccioso durante la fase aguda o en SIDA, etapas en las cuales la carga viral es más alta; sin embargo, ya que la mayoría de individuos durante la fase aguda no son conscientes de estar infectados, es durante esta etapa que se tiene el mayor riesgo de transmitir el VIH-1 (Shattock y Moore, 2003).

La patogénesis de la infección por el VIH-1 es un proceso complejo y variable que depende tanto de variantes virales como de condiciones inmunes y genéticas del hospedero; los individuos infectados exhiben diferentes velocidades de progresión hacia SIDA; el 10% desarrollan SIDA en menos de 5 años, mientras que el 80% desarrolla la inmunodeficiencia en un promedio de 8 a 10 años. De otro lado, del 8-10% de los individuos infectados se consideran progresores lentos o no progresores y se caracterizan porque en ausencia de antirretrovirales, permanecen asintomáticos por 10 años ó más, sin deterioro inmunológico y con cargas virales bajas o indetectables (Munoz *et al.*, 1995). Adicionalmente, existen individuos que a pesar de haber estado expuestos en múltiples ocasiones al VIH-1, no tienen evidencia clínica ni serológica de la infección; estas personas se conocen como expuestos seronegativos (Kulkarni *et al.*, 2003).

1.3. Tratamiento contra el VIH-1

En 1987, la FDA (del inglés Food and drug administration) en los Estados Unidos aprobó la primera droga antirretroviral catalogada como un análogo nucleósido inhibidor de la TR. Debido al complejo ciclo de replicación del VIH que ha ofrecido numerosas oportunidades para la intervención farmacológica, hasta ahora se han

desarrollado y aprobado más de 20 drogas antirretrovirales que tienen como blanco las diferentes proteínas y fases del ciclo replicativo del virus: entrada, transcripción reversa, integración del genoma viral y ensamble de nuevas partículas virales. Estas drogas hacen parte del tratamiento clásico conocido como terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) que consiste en combinar tres o cuatro de estos medicamentos con el fin de evitar o disminuir el riesgo de aparición de cepas virales resistentes (Adamson y Freed, 2009).

A pesar de que los antirretrovirales se han convertido en el tratamiento estándar para la infección por el VIH-1 (Carpenter *et al.*, 1998), se han reportado algunos casos de hipersensibilidad a los medicamentos (Stekler *et al.*, 2006), resistencia del virus frente al tratamiento (Kozisek *et al.*, 2007) e incluso efectos colaterales sobre el sistema inmune y otros sistemas del hospedero (Kolber *et al.*, 2008). Existe además otro aspecto negativo, relacionado con el modo en que los individuos SP siguen el tratamiento, ya que es difícil que con las condiciones precisas que requiere cada medicamento, se siga perfectamente esta terapia; este factor se conoce como adherencia (Bonfanti *et al.*, 1999). En los casos donde no hay adherencia al tratamiento, la replicación viral no se inhibe por completo, por lo que algunos virus se pueden replicar en presencia del medicamento, seleccionándose aquellos que son resistentes (Bangsberg *et al.*, 2004) y disminuyendo en gran medida la efectividad de los medicamentos.

Debido a esto, el uso de la medicina tradicional y productos naturales benéficos para la salud, se presenta con frecuencia en los individuos infectados por el VIH-1, muchas veces, en combinación con los medicamentos que hacen parte de la terapia convencional, tratando de mitigar los efectos adversos asociados. Los productos naturales usualmente provienen de las plantas medicinales, por lo que la mayoría de las personas infectadas las utilizan como terapia alternativa (Bedoya *et al.*, 2001); Dentro de este grupo, se han ensayado diferentes extractos que han demostrado tener efecto antiviral, tales como el de la planta medicinal *Rhus chinensis* (Wang *et al.*, 2008), el de las semillas de *Croton tiglium* (El-Mekkawy *et al.*, 2000), el de las

plantas *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *Intermedia* (Wei *et al.*, 2008), *Sutherlandia frutescens* y *Lobostemon trigonus* (Harnett *et al.*, 2005), entre otras. Hasta el momento no se sabe con certeza cómo los extractos de estas plantas logran inhibir la replicación del VIH; sin embargo, se ha postulado que la inhibición se da luego de la entrada del virus a la célula y representan una excelente propuesta alternativa para el desarrollo de nuevos compuestos antivirales.

De igual importancia que las plantas medicinales, aunque menos utilizados, los hongos medicinales han demostrado tener en sus extractos compuestos como, proteínas inactivadoras de ribosomas, lectinas, proteínas tipo ubiquitina y enzimas lacasas con un fuerte efecto antiviral (Eo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). Ejemplos de especies con esta propiedad son: *Tricholoma giganteum* (Wang y Ng, 2004a) *Hericium erinaceum* (Wang y Ng, 2004b), *Russula paludosa* (Wang *et al.*, 2007), *Pleurotus eryngii* (Wang y Ng, 2004c), *Ganoderma lucidum* (Wang y Ng, 2006) y *Lentinus edodes* (Park *et al.*, 2004) entre otros.

1.4. Género *Ganoderma*

Los hongos de la descomposición blanca de la madera, también llamados hongos ligninolíticos, comprenden un grupo de organismos pertenecientes en su mayoría a la clase *Basidiomycetes*, cuya característica es su capacidad de mineralizar eficientemente la lignina, un heteropolímero contenido en la madera y otros tejidos vasculares de plantas (Lin y Dence, 1992). Esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía (ten Have y Teunissen, 2001). Dentro de esta clase de hongos se ha estudiado ampliamente el género *Ganoderma*, no solo por su potencial ligninolítico sino también porque algunas de sus especies poseen propiedades medicinales (Jong y Birmingham, 1992). Este género se encuentra distribuido por todo el mundo, tanto en zonas tropicales como regiones geográficas templadas, pero ha sido usado especialmente en la medicina tradicional China debido a sus grandes beneficios para la salud, aparente ausencia de efectos secundarios y por promover la longevidad en las personas (Shiao *et al.*, 1994). Se ha reportado su efectividad en

el tratamiento de la hipertensión, hiperglicemia, hepatopatías crónicas y neoplasias (Lee *et al.*, 1995). Hoy en día se continúan aislando nuevos metabolitos que muestran diversos tipos de actividad biológica, por ejemplo: anti-colesterol (ácido ganodérico B y C) (Gao *et al.*, 2002), anti-histamínico (ácidos ganodéricos C1 y C2); efectos citotóxicos contra el sarcoma Meth A (ganodermanondiol y lucidunoles A y B), el carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) (lucidunoles A Y B y ácido ganodérico θ), y el cáncer de seno (ganodermanondiol) (Gao *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha reportado su efecto anti-VIH-1 (ganoderiol F y ganodermanontriol) (Gao *et al.*, 2002), específicamente contra la proteasa (lucidumol B y ácido ganulocídico A) (Min *et al.*, 2001) y contra la TR del mismo virus (lacasa) (Wang y Ng, 2004a; Wang *et al.*, 2007).

Hasta el momento no existen muchos reportes acerca del uso de hongos pertenecientes a este género en nuestro país. Sin embargo, Ruíz y Varela en el 2006 y Vasco y col. en el 2005, reportaron la existencia de algunas especies de este género en varias regiones de Colombia. Aunque no hay estudios de caracterización molecular que verifiquen este hecho, la clasificación taxonómica de estos hongos sugiere que se trata de especies o cepas diferentes a las que han sido reportadas en la literatura, incluyendo especies autóctonas tales como *Ganoderma amazonense* (Ruíz y Varela, 2006).

1.5. Género *Lentinus*

Los hongos del género *Lentinus* han sido cultivados en muchas partes del mundo por su gran potencial comercial, especialmente a nivel alimenticio (Leatham, 1982). El hecho de ser considerado como un excelente alimento, no sólo por su sabor, sino también por su contenido de factores esenciales para la nutrición humana como vitaminas y aminoácidos, lo han convertido en objeto de muchas investigaciones. Se ha descubierto que algunas de sus especies tienen propiedades benéficas para la salud, por la síntesis de heterobeta-glucanos (Minato *et al.*, 1999), lectinas y terpenoides (Wasser y Weis., 1999), los cuales han demostrado tener actividad

antitumoral y antimicrobiana y han sido considerados como un tratamiento potencial para enfermedades atópicas, artritis (Park *et al.*, 2004), cáncer e hipercolesterolemia (Suzuki y Oshima, 1976). Además de los compuestos con actividad biológica, este género produce enzimas para la degradación y/o transformación de residuos agroindustriales que han generado un gran interés en el área de investigación biotecnológica (Zheng y Shetty, 2000).

Según los reportes publicados, los extractos provenientes del micelio de estos hongos, son los más estudiados en los países asiáticos, por sus propiedades inmunomoduladoras, como el incremento en la producción de IL-1, activación de macrófagos, estimulación y proliferación de células de médula ósea *in vitro* (Suzuki *et al.*, 1989) y el efecto mitogénico (Badalyan, 2004). Dentro de sus propiedades, también se destaca el efecto antiviral *in vitro* contra diferentes virus, como el del papiloma humano, evitando el crecimiento de células tumorales mediante la inducción de apoptosis (Park *et al.*, 2004); inhiben las últimas etapas del ciclo replicativo del virus Herpes simplex tipo 1, impidiendo su salida de la célula hospedadora (Sarkar *et al.*, 1993) y la infección por el virus mosaico del Tabaco, bloqueando etapas iniciales de su ciclo replicativo (Suzuki *et al.*, 1989). Además, inhiben la replicación en células humanas del citomegalovirus (Chatterjee *et al.*, 1996) y del VIH-1 (Tochikura *et al.*, 1988; Kawano *et al.*, 2010). Finalmente, se han caracterizado algunos compuestos específicos obtenidos a partir de estos hongos; por ejemplo, el Lentinano, un polisacárido obtenido de *Lentinus edodes*, incrementa la resistencia del hospedero a la infección por bacterias, hongos, parásitos y virus, incluyendo el VIH-1. Se ha demostrado que la sola administración del Lentinano es capaz de disminuir los niveles de p24 y que además si se administra en combinación con Didanosina (DDI) o AZT, inhibidores de la TR del VIH-1 usados en la terapia antirretroviral, disminuye la toxicidad de éstos e incrementa el número de células CD4+ en individuos con infección aguda por el VIH-1 (Gordon *et al.*, 1998).

La lacasa del género *Lentinus*, también ha sido reconocida por el amplio rango de propiedades que la han hecho útil en el procesamiento de los desechos agrícolas, detoxificación de suelos contaminados, decoloraciones, catálisis en síntesis química,

entre otros (Hsu *et al.*, 2011). A pesar de esto, hasta la fecha, no se ha reportado evidencia del efecto antiviral de la enzima lacasa producida por hongos del género *Lentinus*; sin embargo, debido a la evidencia antiviral reportada para la lacasa obtenida de los hongos del género *Ganoderma*, se podría considerar como un potencial inhibidor del VIH.

1.6. Lacasa

La lacasa es una enzima que hace parte del grupo de las fenol oxidasas, las cuales contienen átomos de cobre en su centro catalítico (Baldrian, 2005); es típicamente encontrada en plantas, insectos y en una variedad de hongos incluyendo levaduras (e.j., *Cryptococcus*), mohos (e.j., *Penicillium*), setas (e.j., *Agaricus*), y hongos de descomposición blanca (e.j., *Ganoderma*) (Hoegger *et al.*, 2006). En estos últimos hongos participa en la morfogénesis, interacción planta/patógeno, defensa contra el estrés y degradación de lignina (Thurston, 1994).

La lacasa típica de hongos es una proteína de aproximadamente 60-70 kDa, con un punto isoeléctrico alrededor de 4.0 y una temperatura óptima entre 50 y 70°C (Baldrian, 2005). Puede presentar una estructura monomérica, dimérica u oligomérica, por lo que existe una gran heterogeneidad en las propiedades de las diferentes isoenzimas, principalmente en cuanto a peso molecular. Estas diferencias se han visto incluso en proteínas purificadas de la misma especie de hongo y es soportado por la presencia de múltiples genes de lacasa en los hongos (Chen *et al.*, 2003). Otra fuente de variabilidad es el número de residuos glicosilados y tipo de glicosilación, dando origen a la diversidad de lacasas que se ha encontrado en diferentes especies y tejidos de hongos (Baldrian, 2005).

La lacasa cataliza la reducción de O₂ a H₂O usando un amplio rango de compuestos fenólicos como donadores de hidrógeno (Solomon *et al.*, 1996), posibilitando varios tipos de reacciones que la hacen apropiada para diferentes aplicaciones biotecnológicas, como decolorante, biosensor, desintoxicante de aguas

contaminadas o productos agrícolas, pesticidas y detergentes, entre otros (Baldrian, 2005).

En cuanto a su potencial biológico, recientemente la lacasa ha demostrado tener actividad antiviral, incluso contra el VIH-1 y esto ha despertado el interés de la comunidad científica. Los investigadores Wang y Ng se han enfocado en la extracción y caracterización de la lacasa de diferentes especies de hongos y han determinado su actividad contra el VIH-1 en ensayos libre de células. Estos autores reportaron la inhibición de la TR del VIH-1 en la síntesis de ADN *In vitro* por parte de la lacasa pura obtenida de los hongos *G. lucidum* (CI₅₀ de 1.2 µM) (Wang y Ng, 2006), *Tricholoma giganteum* (CI₅₀ de 2.2 µM) (Wang y Ng, 2004a), *Pleurotus eryngii* (CI₅₀ de 2.2 µM) (Wang y Ng, 2004 c) y *Hericium erinaceum* (IC₅₀ de 9.5 µM) (Wang y Ng, 2004b); así mismo, la lacasa obtenida de *Pleurotus cornucopiae* por Wong y col. en el 2010 y la obtenida de *Agrocybe cylindracea* por Hu y col. en el mismo año, inhibieron la TR del VIH-1 con una CI₅₀ de 22 µM y 12.7 µM respectivamente.

Se ha propuesto que una posible interacción tipo proteína-proteína puede ser el mecanismo responsable de la actividad antiviral de esta enzima; sin embargo, es necesaria una investigación dirigida para esclarecer este hecho.

Adicionalmente a esta enzima, se han reportado otros compuestos como ganoderiol F que también bloquea la replicación del VIH-1, probablemente a través de la inhibición de la TR (Wang *et al.*, 2007) y lucidumol B y ganodermanontriol que inhiben la proteasa viral (Min *et al.*, 2001). Aunque todos estos compuestos comparten esta propiedad antiviral, el efecto de la lacasa sobresale debido a su baja concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀), lo que la convierte en una alternativa de tratamiento mucho más viable que las otras, debido a que se requiere menos concentración del compuesto para obtener un efecto significativo en la inhibición de la infección.

Todas estas investigaciones se han podido realizar no solo por la amplia distribución de la enzima dentro de hongos *Basidiomycetes*, sino también por su fácil obtención. Las propiedades que se le atribuyen a esta enzima se han visto incluso en crudos enzimáticos donde su producción es inducida por procesos biotecnológicos que permite obtener cantidades mayores a los otros componentes que hacen parte de la composición natural del cuerpo fructífero (Camarero *et al.*, 2004; Kino *et al.*, 1989), lo que facilitaría el desarrollo eventual de cualquier medicamento. El CE es el producto de fermentación líquida a partir del cultivo de hongos sin refinar que contiene diversas enzimas, como la lacasa y la manganeso peroxidasa, entre otras. De esta manera, es posible evaluar la actividad antimicrobiana de esta enzima mediante la producción del CE de cualquier hongo ligninolítico.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por el VIH-1 ha impuesto el reto a la comunidad científica de realizar una búsqueda constante de nuevas alternativas terapéuticas que permitan un manejo adecuado de la infección y eventualmente la erradicación viral. Hasta el momento, se han encontrado medicamentos y tratamientos que pueden disminuir la carga viral, mejorando la respuesta inmune, retardando la progresión hacia SIDA y disminuyendo la probabilidad de infectar a otros.

Dentro de estas terapias la más común y más usada es TARGA o simplemente terapia antirretroviral, dependiendo de la intensidad y número de medicamentos que se incluyan en la terapia (Shafer y Vuitton, 1999). Su principal acción se centra en bloquear las enzimas necesarias para la viabilidad viral, tales como la TR, la proteasa e integrasa, inhibiendo de este modo la replicación viral y a su vez, mejorando los mecanismos de respuesta inmune. Sin embargo, se han reportado una serie de inconvenientes con este tipo de terapia: i) cambios en el perfil de enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa, aumentando el estrés oxidativo, potenciando la replicación viral, y disminuyendo la

respuesta inmune (Sundaram *et al.*, 2008); ii) reacción de hipersensibilidad en algunos individuos, con fiebre, sarpullidos y en algunos casos, la muerte (Davis y Shearer, 2008; Stekler *et al.*, 2006); iii) disminución en número y función de los linfocitos T CD8+, dificultando la respuesta ante infecciones oportunistas y procesos malignos (Kolber *et al.*, 2008); iv) generación de resistencia viral a los medicamentos, afectando la efectividad a largo término de los antirretrovirales (Menendez-Arias, 2002), y v) falta de adherencia, por condiciones para su ingesta y efectos secundarios asociados a su uso (Bangsberg *et al.*, 2004).

Con todo esto se ha considerado la necesidad de adoptar nuevos enfoques terapéuticos contra el VIH/SIDA. Se ha sugerido usar compuestos naturales, a partir de materia prima renovable, de fácil acceso para la comunidad afectada. Las nuevas opciones terapéuticas deben tener fuerte actividad antiviral y el menor efecto colateral posible, para contrarrestar la resistencia viral, el alto costo y los problemas asociados a la adherencia y toxicidad; todas, situaciones asociadas al tratamiento actual.

Los hongos del género *Ganoderma* y *Lentinus*, se han empleado desde hace siglos por la medicina china como alternativa terapéutica de varias enfermedades, sin efectos secundarios aparentes (Shiao *et al.*, 1994). La enzima lacasa, producto de los hongos del género *Ganoderma*, han demostrado tener un fuerte efecto anti-VIH-1 *in vitro* (Wang y Ng, 2006). Estudios con cepas de *Ganoderma sp* y *Lentinus sp*, realizados por el Grupo BIOPOLIMER (U de A) indican que estas cepas se pueden inducir para la producción de grandes cantidades de lacasa. Ya que éstos son hongos autóctonos colombianos, se hace necesario investigar la citotoxicidad y la actividad antiviral, para lograr obtener a mediano plazo, un tratamiento antiviral económico a partir de ellos.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El crudo enzimático rico en lacasa producido por los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, pueden disminuir significativamente la replicación *in vitro* del VIH-1 en células susceptibles, sin efectos citotóxicos sobre las células blanco.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad anti-VIH-1 *in vitro* de los crudos enzimáticos ricos en lacasa producidos por los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, en líneas celulares susceptibles a la infección, utilizando un sistema de única ronda de replicación.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Producir el virus recombinante HIV-GFP+VSV-G de una ronda de replicación, mediante la transfección en células 293T.

4.2.2. Evaluar la citotoxicidad de los crudos enzimáticos ricos en lacasa producidos por los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, sobre la línea celular U373-MAGI, por medio de la técnica del MTT.

4.2.3. Determinar la actividad antiviral *in vitro* de los crudos enzimáticos ricos en lacasa producidos por los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, sobre la replicación del VIH-1, en un ensayo con virus de una sola ronda de replicación.

4.2.4. Determinar si el proceso de transcripción reversa del VIH-1 es afectado por el crudo enzimático rico en lacasa producido por los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*

5. METODOLOGÍA

5.1. Área de trabajo

Grupo Inmunovirología, Laboratorio 532 Torre 2, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia.

5.2. Producción del crudo enzimático

Los crudos enzimáticos fueron producidos por el Grupo BIOPOLIMER de la Universidad de Antioquia en un bioreactor (Braun Biotech Inc.) de 5L para cada hongo, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura 30°C, agitación de 200 rpm, aireación de 7.5L/min, pH inicial 4.5, en un medio de cultivo para hongos ligninolíticos con un inductor para la enzima lacasa durante 5 días. Se tomaron muestras diarias del bioreactor para determinar la actividad enzimática, axenidad y crecimiento de cada hongo. Posteriormente, cada CE se concentró en una unidad de ultrafiltración (Millipore, Amicon) con una membrana de punto de corte de 10 kDa. Luego se filtró el crudo de cada hongo independientemente en una membrana whatman y se dializaron durante 16 horas a 4°C en una membrana de diálisis de punto de corte de 12 kDa para obtener un volumen final de 50ml. Los crudos enzimáticos fueron donados al grupo Inmunovirología para la realización de este proyecto.

La actividad enzimática de cada crudo, así como de la lacasa comercial, se determinó el mismo día de su entrega, utilizando el 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazozin-6-sulfonic acid) (ABTS) como mediador, buffer citrato (pH 3) y una muestra de cada CE. La oxidación de ABTS se monitoreó en un espectrofotómetro UV- Vis Cary 50 bio a una absorbancia de 420 nm. Una unidad (U) de lacasa se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 mol de ABTS en un minuto.

Todos los crudos enzimáticos fueron recibidos a temperatura ambiente y en condiciones no estériles, por lo que inmediatamente después de su entrega estos crudos se filtraron, alicuotaron y guardaron a -70°C hasta su uso.

5.3. Líneas celulares

La línea celular 293T se utilizó para la producción de virus recombinantes y la evaluación de la actividad antiviral; éstas, son células embrionarias de riñón humano, que se cultivaron en monocapa a 37°C y en 5% de CO₂, con medio DMEM (Invitrogen) al 10% de suero fetal bovino (SFB). Adicionalmente, para los ensayos antivirales se utilizó la línea celular U373-MAGI, la cual es establecida a partir de fibroblastos de embrión de humano. Las células fueron cultivadas en monocapa a una temperatura de 37°C, en 5% CO₂, con medio DMEM (Invitrogen) al 10% de SFB. Esta línea celular fue obtenida de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID).

5.4. Producción del virus

Las células 293T fueron cotransfectadas con los plásmidos pHIV-GFP delta *env* y pVSV-G. El plásmido pHIV-GFP delta *env*, contiene el gen de la proteína verde fluorescente y el genoma del VIH-1 con una mutación en el gen *env*. El plásmido pVSV.G (envoltura del virus de estomatitis vesicular) infecta por endocitosis, sin necesidad de usar los receptores típicos virales (CD4, y los correceptores CCR5 y/o CXCR4). Los sobrenadantes fueron recogidos a las 48 horas hpi y se cuantificó su progenie viral por medio de un kit de ELISA (Perkin Elmer) que detecta la proteína viral p24. Para obtener los virus, estos sobrenadantes se centrifugaron, se filtraron con una membrana de 0,2µm (Millipore ®) y se precipitaron con Polietilenglicol (PEG) por 48 horas a 4°C a una proporción 2:1. Luego, se centrifugaron, se resuspendieron en 1ml de DMED y se guardaron a -70°C como reserva viral para el siguiente experimento. Los constructos virales fueron donados por el Dr. Johnny He de la Universidad de Indiana, Indianápolis, USA y el Dr. Sodroski del Instituto de Cáncer Dana-Farber, Boston, USA.

5.5. Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los crudos enzimáticos, se sembraron en platos de 96 pozos de fondo plano 10.000 células de la línea celular U373-MAGI por pozo, resuspendidas en 200µL de medio DMEM con SFB al 10%; después de 24 horas se adicionaron diluciones dobles de cada CE, lacasa comercial y el medio de producción (vehículo control) por triplicado con un volumen final de 200µl. Cuarenta y ocho horas postratamiento, se evaluó el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT. Para esto, se descartó el medio de cultivo y se adicionó 28µl de MTT (2µg/ml) por pozo, se incubaron por 2h a 37°C y se adicionó 130µl de DMSO por pozo; después de 15 minutos de agitación se leyó en un espectrofotómetro a 490nm.

Con este ensayo, se determinó cuál es la concentración de los crudos enzimáticos y lacasa comercial que es capaz de eliminar el 50% de las células (CC₅₀). Una vez se determinó esta concentración, se evaluó su efecto antiviral y además, el de dos concentraciones por debajo de ésta, la CC₃₀ y CC₁₅. También se utilizaron como control de células, tres pozos sin tratamiento. La lacasa comercial y el medio de producción fueron donados por el grupo BIOPOLIMER.

5.6. Inhibición de la replicación

Para determinar la inhibición de la replicación del virus recombinante HIV-GFP+VSV-G, se utilizó la línea celular U373-MAGI. Se utilizaron platos de 96 pozos y se sembraron 10.000 células por pozo. Se infectó con 3ng/ml de p24 del virus, en presencia o ausencia de la CC₅₀, CC₃₀ y CC₁₅ de los crudos enzimáticos, de la lacasa comercial (Novozyme®) y del medio de producción como controles. El tratamiento comenzó una hora antes de la infección y permaneció por 48 hpi. Pasado este tiempo se cuantificó el porcentaje de células infectadas mediante citometría de flujo para GFP y se cuantificó a partir de los sobrenadantes la cantidad de p24 mediante un kit de ELISA (Perkin Elmer). La capacidad inhibitoria de cada compuesto fue determinada, graficada y expresada como la CI₅₀; es decir, la concentración requerida para inhibir la replicación viral en un 50%. La proporción

entre la CC_{50} y la CI_{50} , denominada índice de selectividad o índice terapéutico (IS), se determinó con el fin de conocer el potencial terapéutico de los crudos enzimáticos.

5.7. Inhibición de la transcripción reversa

Para determinar si la inhibición de la replicación del VIH-1 por el extracto puro de lacasa del hongo afecta el proceso de transcripción reversa, se utilizó la línea celular U373-MAGI, la cual fue tratada del mismo modo que en el experimento anterior. El ADN de las células infectadas y tratadas con los diferentes tratamientos, así, como de las células control, fue extraído 48hpi mediante un kit de extracción de ADN (Qiagen®). Los productos tempranos y tardíos de la TR fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real (qPCR); los oligonucleótidos utilizados son los siguientes:

GAPDH-FW: 5' GCACCACCAACTGCTTAGCA 3'

GAPDH-RV: 5' GTCTTCTGGGTGGCAGTGATG 3'

Transcriptos tardíos: FW-Late 5'-TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT- 3'

RV-Late 5'-GAGTCCTGCGTCGAGAGAGC -3'

Transcriptos tempranos: Early FW 5'-GTGCCCGTCTGTTGTGTGAC-3'

Early RV 5'-GGCGCCACTGCTAGAGATTT-3'

La reacción de PCR incluyó: 2uL de ADN, 12.5uL de Máxima master mix (Fermentas) y 0.2uM de cada primer. El ADN de GAPDH se utilizó para normalizar el contenido de ADN en cada preparación; los resultados se expresan como unidades relativas de transcritos. Las condiciones térmicas para GAPDH, son las siguientes: 95°C 10 min, 40 ciclos: 95°C 15 seg, 66°C 1 min, Lectura: 72°C 0.02seg, Lectura: 72°C 3min. Las condiciones térmicas para los transcritos tempranos y tardíos, son las siguientes: 95°C 10 min, 40 ciclos: 95°C 15 seg, 60°C 1 min, Lectura: 72°C 0.02seg, Lectura: 72°C 3min.

5.8. Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas t de student no paramétricas (test de Mann Withney), debido al tipo de distribución de los datos, para establecer las diferencias entre los grupos. Los datos cuantitativos se presentaron como medianas con rangos intercuartiles. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 3.02. Las concentraciones inhibitorias del 50% fueron calculadas por medio de una regresión lineal, usando el mismo programa.

6. RESULTADOS

6.1 Citotoxicidad

La citotoxicidad de los crudos enzimáticos fue determinada usando la línea celular U373-MAGI, por medio de la técnica MTT. Como se observa en las figuras 1a-d, en todos los casos la citotoxicidad disminuye a medida que las concentraciones son más bajas, de una manera dosis dependiente; así mismo, el medio de producción es menos citotóxico mientras más alta sea su dilución.

Para los siguientes experimentos se tuvo en cuenta la CC_{50} , CC_{30} y CC_{15} . El cálculo se hizo de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de Citotoxicidad} = \left[\frac{\bar{\lambda}_c - \lambda_x}{\bar{\lambda}_c} \right] * 100$$

$\bar{\lambda}_c$ = Promedio de la longitud de onda de las células control

λ_x = Longitud de onda de la concentración x.

De acuerdo a los resultados obtenidos, como se observan en las figuras 1a-d, las CC_{50} de los distintos tratamientos fueron: Para *Ganoderma sp.* Lote 1, CC_{50} : 3437 U/L; para *Ganoderma sp.* Lote 2, CC_{50} : 4938 U/L; para *Lentinus sp.* Lote 1, CC_{50} :

2466 U/L; para la Lacasa comercial, CC₅₀: 125 U/L y para el medio de producción, la dilución 1:4.

6.2. Inhibición de la replicación del VIH-1

El efecto inhibitorio en la replicación del VIH-1 de los crudos enzimáticos fue determinado usando la línea celular U373-MAGI mediante citometría de flujo para GFP y ELISA para p24, usando las concentraciones citotóxicas determinadas por el ensayo de MTT. El cálculo se hizo de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left[\frac{\% \text{ de infección con tratamiento} * 100}{\% \text{ infección control}} \right]$$

Las figuras 2a-d muestran el porcentaje de inhibición de la replicación basados en los datos obtenidos de la citometría de flujo de cada uno de los tratamientos. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de student basado en los datos de porcentaje de infección determinados por este mismo método (no mostrado). La mayoría de las concentraciones de los crudos enzimáticos de los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, así como las de la lacasa comercial, inhibieron por encima del 50% la replicación del virus respecto al control de infección de manera significativa, con un valor $p \leq 0.05$. La inhibición mínima obtenida fue de 45,4% y 44,8%, correspondiente al lote 1 del crudo de *Ganoderma sp.* a una concentración de 3437 U/L y a la lacasa comercial a una concentración de 62.5 U/L, respectivamente. La máxima inhibición fue 86,4%, obtenida con el crudo de *Lentinus sp.* a una concentración de 2466 U/L. El medio de producción no tuvo efecto significativo sobre la inhibición de la replicación comparado con el control de infección (valor $p \geq 0.1$). El AZT inhibió la replicación del virus en un 97,65% ($p < 0,0001$).

La inhibición de la replicación también es representada como la expresión de GFP de las células infectadas en presencia de los diferentes tratamientos, en la Fig.3.

Para determinar la cantidad de virus producido en presencia de cada tratamiento, se cuantificó la cantidad de p24 mediante una prueba de ELISA en los sobrenadantes de los cultivos de células U373-MAGI tratadas con cada CE e infectadas con el virus recombinante. A partir de estos valores se determinó el porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones de cada tratamiento. El análisis estadístico fue realizado tomando los datos de concentración de p24 (Fig.4). Como se observa en las figuras 5a-d, los crudos de *Ganoderma sp.*, y de *Lentinus sp.*, al igual que la lacasa comercial, lograron inhibir la replicación del virus. Los porcentajes de inhibición máximos obtenidos con cada tratamiento fueron: 74,49% con la lacasa comercial a 125 U/L ($p=0.0286$); 68,1% con el lote 2 del crudo del mismo hongo a 4938 U/L ($p=0.0286$); 63,49% con el crudo de *Lentinus sp.* a 2466 U/L ($p=0.0286$); 60,8% con el lote 1 del crudo de *Ganoderma sp.* a 3437 U/L ($p=0.0286$). La inhibición obtenida a las concentraciones 1718 U/L y 859 U/L para el lote 1 de *Ganoderma sp.*, a 1234 U/L para el lote 2 del mismo hongo ($p=0.1143$) y a 616 U/L del crudo de *Lentinus sp.* ($p=0.1423$), no fueron estadísticamente significativos. Aunque el medio de producción logró inhibir en un 27,2% la replicación del virus a una dilución 1:4, este porcentaje no presentó diferencias estadísticamente significativas comparado con el control de infección ($p=0.3143$). El control de inhibición, AZT, logró inhibir la replicación del virus en un 83,2% ($p=0.0286$).

Con los valores de inhibición de la replicación determinados a partir de la concentración de p24, se realizó un análisis de regresión lineal para determinar la CI_{50} con el fin de calcular el IS de cada CE. Estos valores, así como la CC_{50} , se muestran en la tabla 1. El mejor IS encontrado corresponden al crudo de *Lentinus sp.*, seguido por el lote 1 del crudo de *Ganoderma sp.* y el lote 2 para este mismo hongo.

6.3. Inhibición de la transcripción reversa del VIH-1

Con el fin de evaluar el efecto de los crudos ricos en lacasa sobre el proceso de transcripción reversa del VIH-1, se midieron las unidades relativas de transcriptos tempranos y tardíos por qPCR. Basados en estos resultados, se calculó el

porcentaje de inhibición de la expresión de transcritos. El análisis estadístico fue realizado con los datos de unidades relativas de transcritos (no mostrado). Como se observa en la figura 6, los lotes 1 y 2 del crudo de *Ganoderma sp.* y el crudo de *Lentinus sp.* lograron inhibir de manera significativa tanto los transcritos tempranos como los transcritos tardíos, entre un 80% y 90% ($p < 0.02$), similar a la inhibición para el control AZT, correspondiente a 98,18% ($p = 0,0191$).

7. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, son muchos los reportes que se encuentran sobre el potencial de los productos naturales para inhibir la infección por el VIH. La búsqueda de este tipo de compuestos naturales se hace cada vez más intensa, por lo que diferentes extractos siguen siendo aislados, caracterizados y sujetos a diferentes investigaciones. (Bedoya *et al.*, 2001).

Hace algunas décadas, se descubrió la existencia de una enzima extracelular de diferentes tejidos de hongos ligninolíticos, como los del género *Ganoderma* y *Lentinus* (Hoegger *et al.*, 2006). Esta enzima se conoce como lacasa y además de sus ya conocidas aplicaciones industriales, recientemente se describió su actividad antiviral, como inhibidor de la TR del VIH-1 en modelos *in vitro*, libres de células (Wang y Ng, 2006 c; Wang y Ng, 2004a; Wong *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010).

En varias regiones de Colombia, ya se ha reportado la existencia de hongos pertenecientes a estos dos géneros. El grupo BIOPOLIMER de la Universidad de Antioquia, ha recolectado e identificado especies de estos hongos, a partir de los cuales se han obtenido extractos crudos enzimáticos ricos en la enzima lacasa, por medio de procesos biotecnológicos que inducen la producción de esta enzima. (Camarero *et al.*, 2004; Kino *et al.*, 1989).

Estos crudos enzimáticos obtenidos de los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.* fueron donados al grupo Inmunovirología, para la evaluación de su actividad anti-VIH-1. Según los reportes publicados, esta es la primera vez que se evalúa la actividad antiviral de este tipo de productos en nuestro país, utilizando hongos autóctonos y un modelo celular *in vitro*. Para definir la concentración a la cual los crudos enzimáticos podían utilizarse en este modelo celular sin efecto citotóxico significativo, se determinó la CC_{50} , la CC_{30} y la CC_{15} , mediante el ensayo de MTT en la línea celular U373-MAGI. Con estas concentraciones se analizó la capacidad antiviral de los diferentes tratamientos por dos métodos. Los resultados demostraron que los crudos enzimáticos obtenidos de los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, así como la lacasa comercial, tienen una actividad inhibitoria significativa contra el VIH, a pesar de ser menor que la observada con el control positivo de inhibición, el medicamento AZT. Sin embargo, el porcentaje de inhibición es menor cuando se evalúa con base en las concentraciones de p24 en comparación con la inhibición establecida por citometría de flujo; considerando que se utilizan dos técnicas que se concentran en medir aspectos diferentes, se espera que los datos obtenidos tengan un margen de diferencia entre ellos, conservando el mismo patrón de inhibición. En nuestro caso, la mayoría de los tratamientos evaluados con ambas técnicas mostraron el mismo efecto respecto a los controles.

El CE del hongo *Lentinus sp.* mostró mayor capacidad de inhibir la replicación viral, que el crudo del hongo *Ganoderma sp.* Esto puede estar indicando que la lacasa de *Lentinus sp.* posee una estructura, ya sea en secuencia o en arreglos postraduccionales, más adecuada para inhibir la replicación viral. Para *Ganoderma sp.* se evaluaron dos lotes de producción diferentes de CE, con el fin de probar la consistencia y reproducibilidad de los resultados. Se observaron diferencias en los porcentajes de inhibición entre los dos lotes de *Ganoderma sp.*, por medio de las dos técnicas. Estos resultados pueden ser explicados por la dificultad que presenta esta metodología a la hora de inducir el mismo tipo de lacasa, dentro de todas las posibles variantes. La lacasa es una enzima con múltiples funciones biológicas, una de ellas es su actividad antiviral. Se ha reportado la presencia de esta enzima en el

micelio y el cuerpo fructífero de varias especies de hongos, a modo de isoenzimas que difieren entre ellas por cambios pequeños en su secuencia, o en su nivel de glicosilación. Existen además varios genes para la lacasa, los cuales parecen estar involucrados en diferentes estadios del organismo. Debido a estas variables, las diferentes lacasas que se pueden extraer de una misma especie pueden variar en cuanto a su actividad enzimática y por tanto, en cuanto a su potencial biológico (Thurston, 1994). Toda esta variabilidad más que una desventaja, indica que es necesario probar el potencial de las diferentes lacasas existentes para determinar cuál es la o las que inhiben el VIH-1 de forma más eficiente, e instaurar una forma de producción estable de la enzima donde su actividad antiviral sea reproducible. Una opción prometedora es la producción heteróloga, por medio de la cual se ha logrado producir esta enzima a gran escala con propiedades deseadas para aplicaciones industriales; esto sugiere que se podría aplicar este mismo método para producir enzimas para uso biológico (Piscitelli *et al.* 2010).

La actividad antiviral del medio de producción, el cual se usa para la inducción de la enzima lacasa, se analizó con el fin de verificar que el efecto antiviral observado realmente provenía del crudo enzimático rico en la enzima lacasa, y no de otro componente del medio de producción. Por citometría de flujo no se observó ninguna actividad inhibitoria del medio de producción; sin embargo, los análisis con base en los niveles de p24 mostraron que el medio tenía la capacidad de inhibir el 20% de la replicación viral. Es posible que alguno de los componentes del medio de producción haya afectado algún punto del ciclo viral entre la traducción de proteínas y la salida de nuevos viriones, modificando así la concentración de p24 en el sobrenadante, más no la expresión de GFP dentro de la célula.

Basados en los diferentes porcentajes de inhibición de la replicación obtenidos con base en la expresión de p24, se determinaron las concentraciones a las que se lograba una inhibición del virus del 50% (CI_{50}) para cada tratamiento (Tabla1.). Todas las CI_{50} encontradas son menores que las CC_{50} , lo que indica que el efecto antiviral observado es debido a interacciones específicas entre el CE rico en lacasa y

algún componente involucrado en el ciclo viral, el cual es aún desconocido, más que a un efecto citotóxico sobre la célula hospedera. Tomando estas concentraciones y las CC_{50} , se establecieron los IS (Tabla 1). Considerando que el IS indica la proporción entre la CC_{50} y la CI_{50} , un compuesto terapéutico debe tener un IS alto, lo que indica que se requiere utilizar una concentración mayor del compuesto para causar un efecto tóxico, de la que se necesita para obtener un efecto terapéutico. El mejor IS corresponde al del crudo de *Lentinus sp.* (4.77), seguido por el lote 1 del crudo de *Ganoderma sp.* (3.3) y el lote 2 para este mismo hongo (2.43). Considerando los resultados obtenidos, se puede concluir que la enzima lacasa de *Lentinus sp.* exhibe mayor potencial para el desarrollo de un tratamiento alternativo para la infección por el VIH-1, que el de *Ganoderma sp.* Los reportes anteriores acerca de la lacasa de otros hongos (Wang y Ng 2004 c; Wang y Ng 2007), incluyendo a los del género *Ganoderma* (Wang y Ng, 2006), son bastante limitados debido a que no fueron evaluadas en modelos celulares, no se tuvieron controles de inhibición de la infección adecuados y no se establecieron ni las CC_{50} ni los IS. Teniendo en cuenta esto y que los resultados en este estudio fueron obtenidos por medio de un modelo celular que se asemeja más al microambiente celular real en el que se desarrolla la infección, se podría decir que este efecto inhibitorio observado con la lacasa de *Lentinus sp.* puede ser extrapolado al que se encontraría en un modelo *in vivo*.

Con el fin de tener una aproximación a la determinación de la fase del ciclo replicativo del virus en la cual, los crudos enzimáticos ricos en lacasa producidos por los hongos *Ganoderma sp* y *Lentinus sp.* tienen algún efecto inhibitorio, se realizó un único experimento para evaluar su efecto en el proceso de transcripción reversa del virus mediante la cuantificación de las unidades relativas de transcritos tempranos y tardíos. Basados en los resultados obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición de la producción de transcritos tempranos y tardíos (Fig. 6a-b). Con ambos lotes del crudo de *Ganoderma sp.* se observó una inhibición de forma dosis dependiente y estadísticamente significativa, tanto en transcritos tempranos, como en tardíos ($p \leq 0,02$). El crudo de *Lentinus sp.* mostró un efecto opuesto, con una capacidad

inhibitoria mayor a una concentración menor, aunque ambas concentraciones inhibieron significativamente la producción de transcriptos ($p \leq 0,02$). Teniendo en cuenta que en los resultados de inhibición de la replicación por citometría de flujo y ELISA no se observó este efecto para el crudo de *Lentinus sp.* y que el crudo de *Ganoderma sp.* conservó la misma tendencia, es necesario realizar más repeticiones de este experimento para corroborar estos resultados. Los porcentajes de inhibición de cada crudo, son similares a los observados para el control de inhibición, AZT, el cual también disminuyó significativamente la producción de transcriptos ($p = 0,0191$) en un 97%.

Se debe tener presente que en este estudio se está evaluando el efecto de un extracto crudo enzimático que puede contener otros compuestos diferentes a la enzima de interés, por lo que es necesario realizar un estudio similar con la lacasa purificada de cada hongo, para confirmar estos resultados y determinar una CI_{50} y un IS más precisos, que puedan ser comparados con otros compuestos. Para el caso de los resultados obtenidos con este estudio los IS son muy bajos respecto al IS del AZT, que está por encima de 10000. Sin embargo, se espera que con la purificación de la enzima estos valores aumenten, así como se observa en el reporte de Notka *et al.* en el 2003, donde se evaluó la actividad anti-VIH-1 de extractos acuosos y alcohólicos ricos en galotaninos de la planta *Phyllanthus amarus*, los cuales mostraron un aumento significativo del IS a medida que se purificaban estos compuestos a partir de los extractos. Además, debido a que la enzima purificada ya ha demostrado tener un efecto anti-VIH-1 y que en este estudio se determinó la actividad anti-VIH-1 de una lacasa comercial purificada, dando como resultado porcentajes de inhibición por encima del 50%, se espera que el efecto inhibitorio de las lacasas purificadas a partir de los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.* aumente considerablemente.

En conclusión, los crudos enzimáticos ricos en lacasa obtenidos a partir de los hongos *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*, inhiben de manera significativa la replicación del VIH-1. Aunque no se evaluaron todas las fases del ciclo viral en la que la enzima

podría ejercer el efecto antiviral, los resultados sugieren que puede actuar a nivel de la transcripción reversa, lo que soporta resultados anteriormente reportados. Sin embargo, es necesario evaluar su efecto sobre otras etapas del ciclo viral para descartar que también actúen a otro nivel. Con estos resultados se establecieron las bases para una investigación posterior en la cual se estudie más detalladamente, el mecanismo de acción de la enzima purificada, sus propiedades bioquímicas y otras posibles aplicaciones en farmacología. Teniendo en cuenta que en nuestro país se encuentra la materia prima para la producción de estos crudos, es factible que en un futuro se logre contribuir con el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la que se incluya esta enzima, que representen una alternativa para las personas infectadas con el VIH-1.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adamson CS y Freed EO. 2009. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. *Antiviral Res.*

Badalyan SM. 2004. Antiprotozoal activity and mitogenic effect of mycelium of culinary-medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms*.6:131–8.

Baldrian P. 2005. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30: 215–242.

Bangsberg DR, Moss AR y Deeks SG. 2004. Paradoxes of adherence and drug resistance to HIV antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother*, 53: 696-699.

Bedoya LM, Sanchez-Palomino S, Abad MJ, Bermejo P y Alcami J. 2001. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol*, 77: 113-116.

Bonfanti P, Capetti A y Rizzardini G. 1999. HIV disease treatment in the era of HAART. *Biomed Pharmacother*, 53: 93-105.

Bradley-Springer LA y Cook PF. 2006. Prevention with HIV-infected men: recommendations for practice and research. *J Assoc Nurses AIDS Care*, 17: 14-27.

Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ y Martínez AT. 2004. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 71, No. 4: 1775–1784.

Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Saag MS, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Yeni PG y Volberding PA. 1998. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1998:

updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *Jama*, 280: 78-86.

Chatterjee S, Koga J and Whitley RJ. 1996. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of human cytomegalovirus in human cells, *Antivir. Res.* 30.

Chen DM, Bastias BA, Taylor AFS y Cairney JWG. 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. *New Phytol*, 157: 547–554.

Davis CM y Shearer WT. 2008. Diagnosis and management of HIV drug hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 121, Issue 4, April 2008, Pages 826-832.e5

EI-Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T y Otake T. 2000. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, 53: 457-464.

Eo SK, Kim YS, Lee CK y Han SS. 2000. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *J Ethnopharmacol*, 72: 475-481.

Gao JJ, Min BS, Ahn EM, Nakamura N, Lee HK y Hattori M. 2002. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 50: 837-840.

Gordon M, Bihari B, Goosby E, Gorter R, Greco M, Guralnik M, Mimura T, Rudinicki V, Wong R and Kaneko A. 1998. A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV positive patients: a phase I/II trial. *J. Med.* 29: 305–330.

Harnett SM, Oosthuizen V y van de Venter M. 2005. Anti-HIV activities of organic and aqueous extracts of *Sutherlandia frutescens* and *Lobostemon trigonus*. *J Ethnopharmacol*, 96: 113-119.

Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR y Kues U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *Febs J*, 273: 2308-2326.

Hsu CA, Wen TN y Shyur LF. A Novel laccase from *Lentinus* sp. *FASEB J*. April 2010.

Hu DD, Zhang RY, Zhang GQ, Wang HX, Ng TB. 2010. A laccase with antiproliferative activity against tumor cells from an edible mushroom, white common *Agrocybe cylindracea*. *Phytomedicine*, epub ahead for print.

Jong SC y Birmingham JM. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv Appl Microbiol*, 37: 101-134

Kawano M, Sakagami H, Satoh K, Shioda S, Kanamoto T, Terakubu S, Nakashima H, Makino T. 2010. Lignin-like Activity of *Lentinus edodes* Mycelia Extract (LEM). *In Vivo*. 4: 543-51.

Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, Shimizu K y Tsunoo H. 1989. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidium*. *J Biol Chem*, 264: 472-478.

Kolber MA, Saenz MO, Tanner TJ, Arheart KL, Pahwa S y Liu H. 2008. Intensification of a suppressive HAART regimen increases CD4 counts and decreases CD8+ T-cell activation. *Clin Immunol*, 126: 315-321.

Kozisek M, Bray J, Rezacova P, Saskova K, Brynda J, Pokorna J, Mammano F, Rulisek L y Konvalinka J. 2007. Molecular analysis of the HIV-1 resistance

development: enzymatic activities, crystal structures, and thermodynamics of nelfinavir-resistant HIV protease mutants. *J Mol Biol*, 374: 1005-1016.

Kulkarni PS, Butera ST y Duerr AC. 2003. Resistance to HIV-1 infection: lessons learned from studies of highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals. *AIDS Rev*, 5: 87-103.

Lee SS, Wei YH, Chen CF, Wang SY y Chen KY. 1995. Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*. *J Chin Med*, 6: 1–12.

Leatham GF. 1982. Cultivation of Shiitake, the Japanese Forest Mushroom, on Logs: A Potential Industry for the United States. *Forest Products Journal [FOR. PROD. J.]*. Vol. 32, no. 8, pp. 29-35.

Lin SY y Dence CW. 1992. *Methods in lignin chemistry. Springer-Verlag.*

Menendez-Arias L. 2002. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci*, 23: 381-388.

Min BS, Gao JJ, Hattori M, Lee HK y Kim YH. 2001. Anticomplement activity of terpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Planta Med*, 67: 811-814.

Minato K, Mizuno M, Terai H, and Tsuchida H. 1999. Autolysis of Lentinan, an Antitumor Polysaccharide, during Storage of *Lentinus edodes*, Shiitake Mushroom. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1530-1532.

Munoz A, Kirby AJ, He YD, Margolick JB, Visscher BR, Rinaldo CR, Kaslow RA y Phair JP. 1995. Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 8: 496-505.

Notka F, Meier GR, Wagner R. 2003. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. *Antiviral Research* 58:175–186

O'Brien TR, George JR y Holmberg SD. 1992. Human immunodeficiency virus type 2 infection in the United States. Epidemiology, diagnosis, and public health implications. *Jama*, 267: 2775-2779.

ONUSIDA. 2009. Global report HIV.

ONUSIDA. 2010. Global report HIV.

ONUSIDA. 2010. Informe UNGASS, Seguimiento de la Declaración de compromiso sobre el VIH/sida. INFORME NACIONAL, República de Colombia.

Park JM, Lee SH, Kim JO, Park HJ, Park JB y Sin JI. 2004. In vitro and in vivo effects of extracts of *Lentinus edodes* on tumor growth in a human papilloma virus 16 oncogenes-transformed animal tumor model-Apoptosis-mediated tumor cell growth inhibition. *Journal of the Korean Society for Food Science and Technology*. 36: 141–146.

Pascual A y Corral J. 2003. El virus de la inmunodeficiencia humana: Inmunopatogenia. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 29-36.

Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V y Giovanni S. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1:4, 252-262.

Poli G y Fauci AS. 1992. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8: 191-197.

Requejo HI. 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica*, 40: 331-345.

Ruiz A y Varela A. 2006. New reports of Aphyllophorales (basidiomicota) in humid and cloudy mountain forest from Colombia. *Caldasia*, 28: 259-266.

Sarkar S, Koga J, Whitley RJ, Chatterjee S. 1993. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 4:293-303.

Sato H, Orenstein J, Dimitrov D y Martin M. 1992. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology*, 186: 712-724.

Shafer RW y Vuitton DA. 1999. Highly active antiretroviral therapy (Haart) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Biomedecine y Pharmacotherapy*. Volume 53, Issue 2, March 1999, Pages 73-86

Shattock RJ y Moore JP. 2003. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*, 1: 25-34.

Shiao MS, Lee KR, Lin LJ y C.T. W. 1994. Natural products and biological activities of the Chinese medical fungus, *Ganoderma lucidum* Food Phytochemicals for Cancer Prevention. II: Teas, Spices, and Herbs. *American Chemical Society*, 12.

Solomon EI, Sundaram UM y Machonkin TE. 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev*, 96: 2563-2606.

Staprans S y Feinberg M. 1997. Natural history and immunopathogenesis of HIV-1 disease. In M. Sande y P. Volberding (Eds.). *The medical management of AIDS*, 27.

Stekler J, Maenza J, Stevens C, Holte S, Malhotra U, McElrath MJ, Corey L y Collier AC. 2006. Abacavir hypersensitivity reaction in primary HIV infection. *Aids*, 20: 1269-1274.

Sundaram M, Saghayam S, Priya B, Venkatesh KK, Balakrishnan P, Shankar EM, Murugavel KG, Solomon S y Kumarasamy N. 2008. Changes in antioxidant profile among HIV-infected individuals on generic highly active antiretroviral therapy in southern India. *Int J Infect Dis*, 12: e61-66.

Suzuki H, Okubo A, Yamazaki S, Suzuki K, Mitsuya H, Toda S. 1989. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Biochem Biophys Res Commun*. 160:367–73.

Suzuki S y Oshima, S. 1976. Influence of Shii-te-ke (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom science* 1: 463-467.

ten Have R y Teunissen PJ. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem Rev*, 101: 3397-3413.

Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19–26.

Tochikura TS, Nakashima H, Ohashi Y, Yamamoto N. 1988. Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med Microbiol Immunol*. 177:235–44.

Vasco-P. A., Franco-Molano A. E., López-Q. C. A., Boekhout T. 2005. Hongos macromicetes (Ascomycota, Basidiomycota) de la región del medio caquetá, departamentos de Caquetá y Amazonas (Colombia). *Biota Colombiana* 6 (1) 127-140

von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbora DM, Scott A, Krausslich HG, Kaplan J, Morham SG y Sundquist WI. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell*, 114: 701-713.

Wang H y Ng TB. 2004a. Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides*, 25: 1-5.

Wang HX y Ng TB. 2004b. A new laccase from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 322: 17-21.

Wang HX y Ng TB. 2004d. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 315: 450-454.

Wang HX y Ng TB. 2006. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72: 508-513.

Wang J, Wang HX y Ng TB. 2007. A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*. *Peptides*, 28: 560-565.

Wang RR, Gu Q, Wang YH, Zhang XM, Yang LM, Zhou J, Chen JJ y Zheng YT. 2008. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *J Ethnopharmacol*, 117: 249-256.

Wasser SP, Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*. 1:65-96.

Wei Y, Ma CM, Chen DY y Hattori M. 2008. Anti-HIV-1 protease triterpenoids from *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *intermedia*. *Phytochemistry*, 69: 1875-1879.

Wong JH, Ng TB, Jiang Y, Liu F, Sze SC, Zhang KY. 2010. Purification and characterization of a Laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*). *Protein Pept Lett*,17:1040-7.

Zapata W, Montoya CJ y Rugeles MT. 2006. Soluble factors with inhibitory activity against type 1 Human Immunodeficiency Virus. *Biomedica*, 26: 451-466.

Zheng Z y Shetty K. 2000. Solid-State Bioconversion of Phenolics from Cranberry Pomace and Role of *Lentinus edodes* α -Glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 48: 895-900.

9. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Actividad biológica de cada uno de los crudos enzimáticos

Tratamiento	CC₅₀^a (U/L)	CI₅₀^b (U/L)	IS (CC₅₀/ CI₅₀)^c
CE de <i>Ganoderma sp.</i> Lote 1	3437	1042.127	3.3
CE de <i>Ganoderma sp.</i> Lote 2	4938	2034.835	2.43
CE de <i>Lentinus sp.</i> Lote 1	2466	516.871	4.77

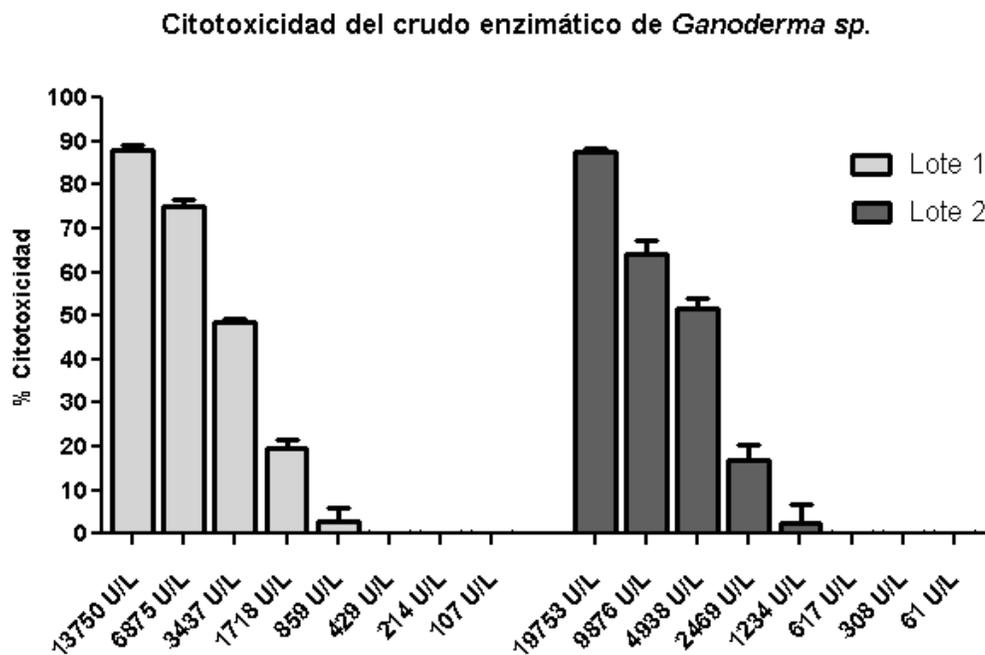
^a **CC₅₀**: Concentración del CE requerido para tener un efecto citotóxico en el 50% de la población celular. (Tres experimentos independientes por triplicado).

^b **CI₅₀**: Concentración del CE requerido para inhibir el 50% de la infección por VIH-1. (Tres experimentos independientes por triplicado).

^c **IS**: Proporción entre la concentración citotóxica 50 y la concentración inhibitoria 50 (CC₅₀/ CI₅₀).

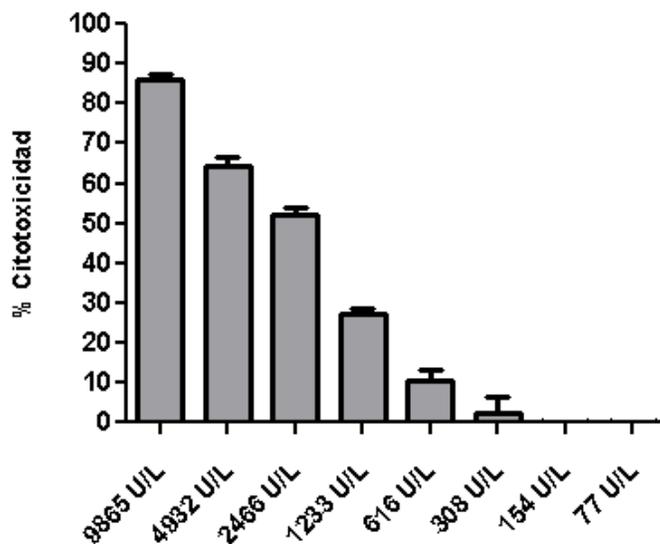
Figura 1.

a.

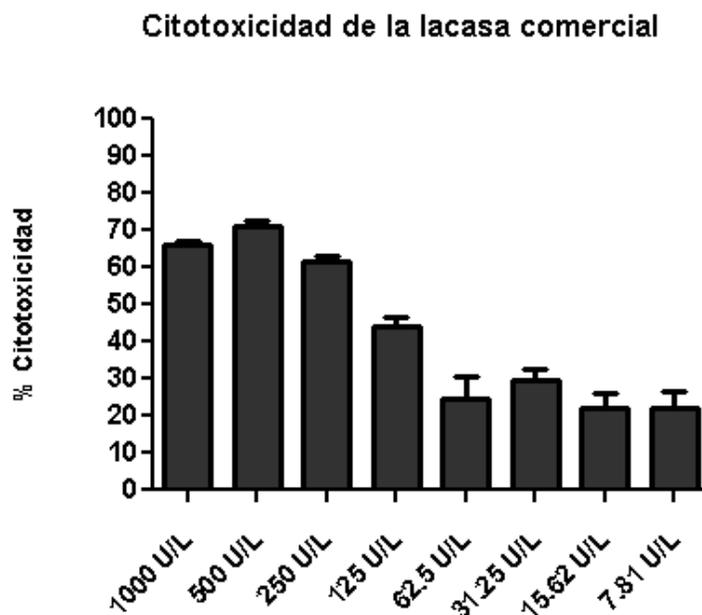


b.

Citotoxicidad del crudo enzimático de *Lentinus sp.*



c.



d.

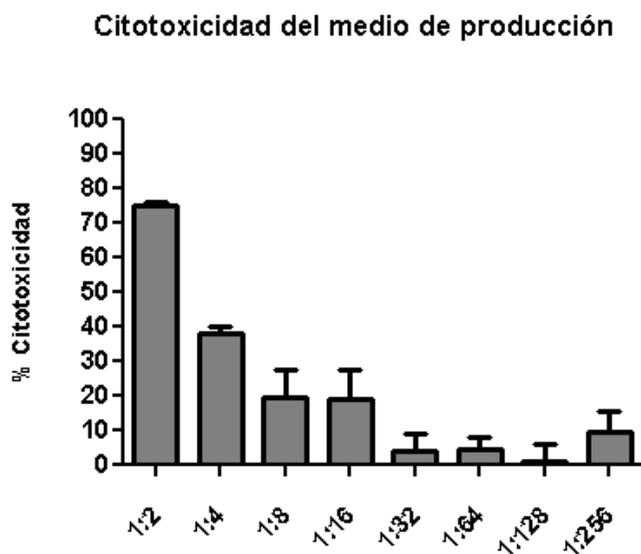
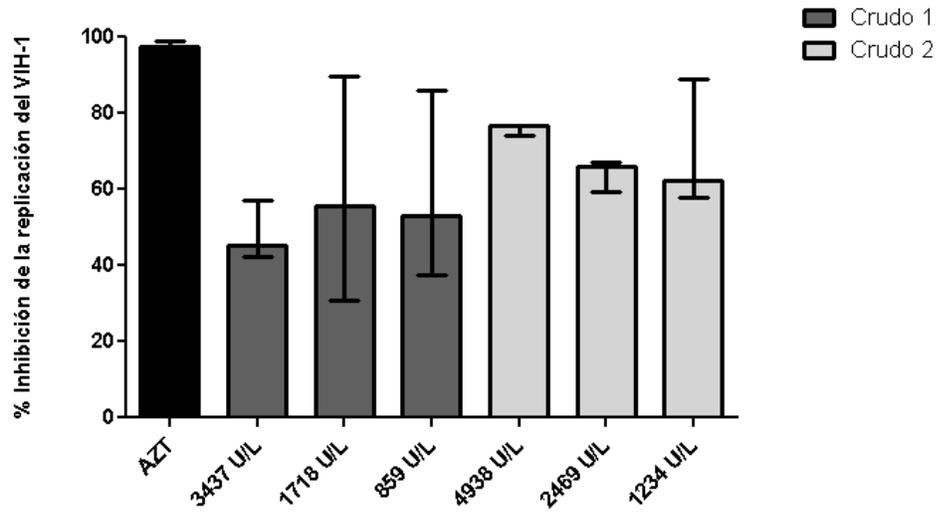


Figura 1. Efecto citotóxico de los diferentes tratamientos. La línea celular U373-MAGI se trató con diluciones dobles de los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* lote 1 y 2 (1a) y *Lentinus sp.* (1b). La lacasa comercial (Novozyme®) (1c) y el medio de producción (1d) fueron utilizados como controles. 48 horas postratamiento, se determinó el efecto citotóxico mediante MTT; la lectura se realizó en un espectrofotómetro a 490nm. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado.

Figura 2.

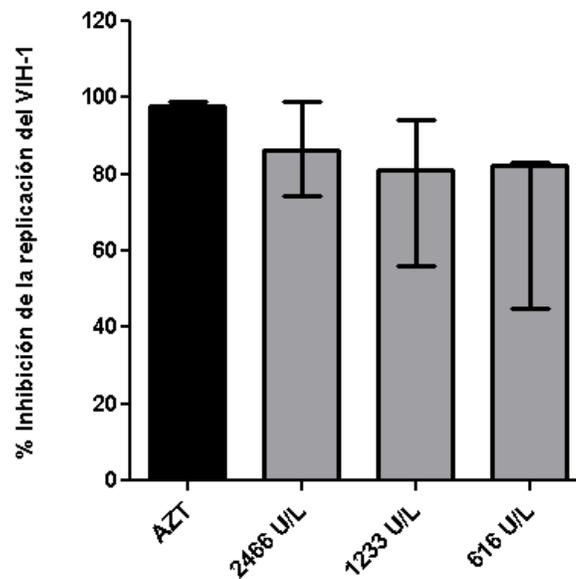
a.

Inhibición de la replicación con el crudo enzimático de *Ganoderma sp.*



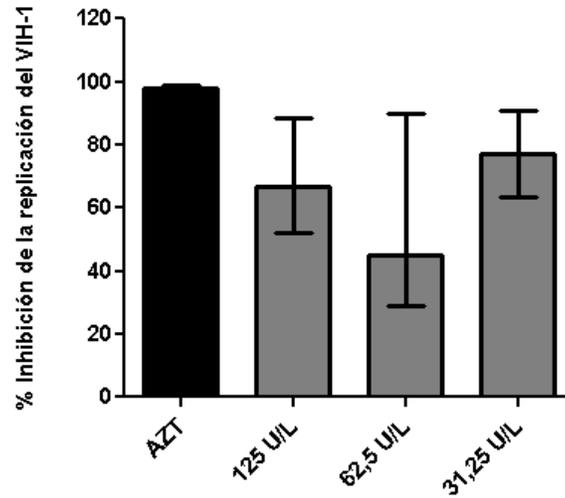
b.

Inhibición de la replicación con el crudo enzimático de *Lentinus sp.*



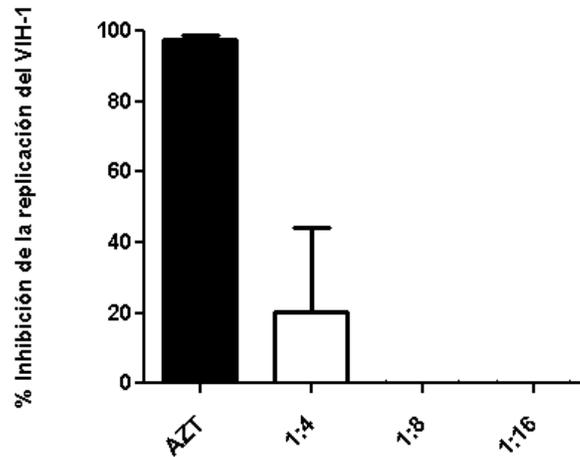
c.

Inhibición de la replicación con la lacasa comercial



d.

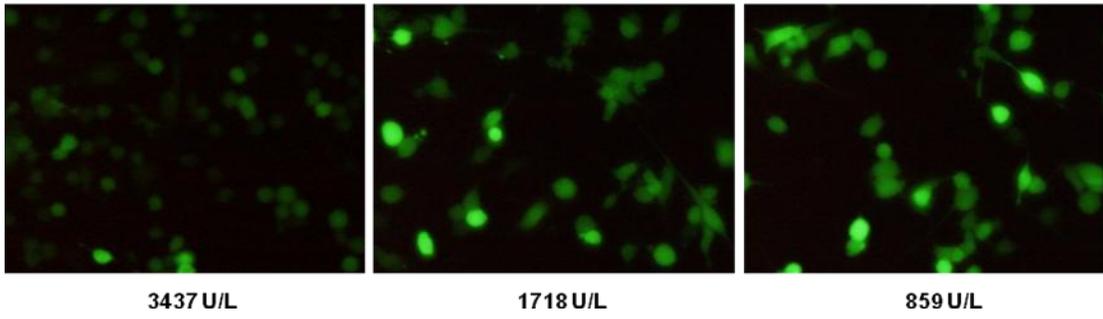
Inhibición de la replicación con el medio de producción



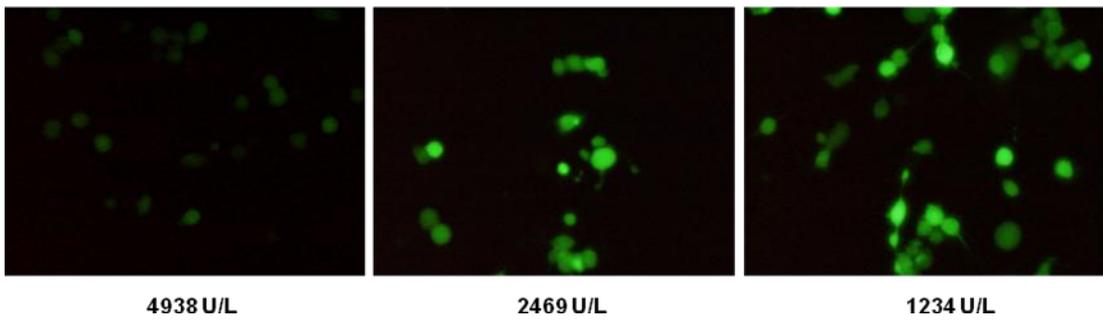
Figuras 2. Efecto inhibitorio del VIH-1 por los diferentes tratamientos, evaluado por citometría de flujo. La línea celular U373-MAGI se infectó con 3ng/ml de p24 del virus, en presencia o ausencia de las CC_{50} , CC_{30} y CC_{15} de los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* lote 1 y 2 (2a) y *Lentinus sp.* (2b). La lacasa comercial (Novozyme®) (2c) y el medio de producción (2d) fueron utilizados como controles. 48 hpi, se cuantificó el porcentaje de células infectadas mediante citometría de flujo para GFP. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado.

Figura 3.

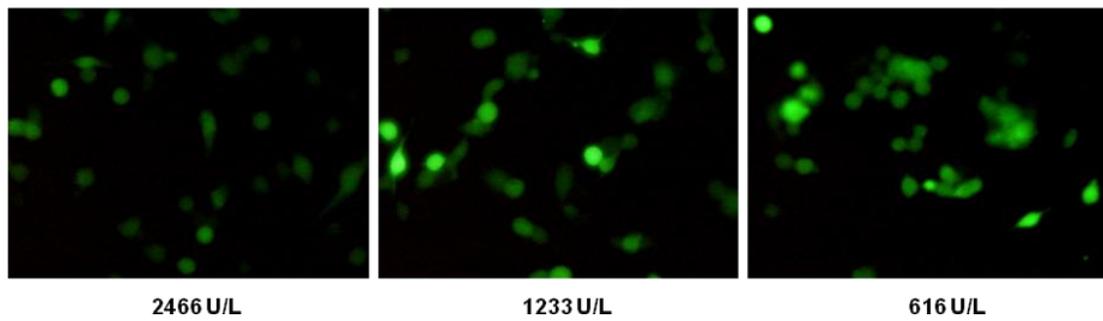
a.



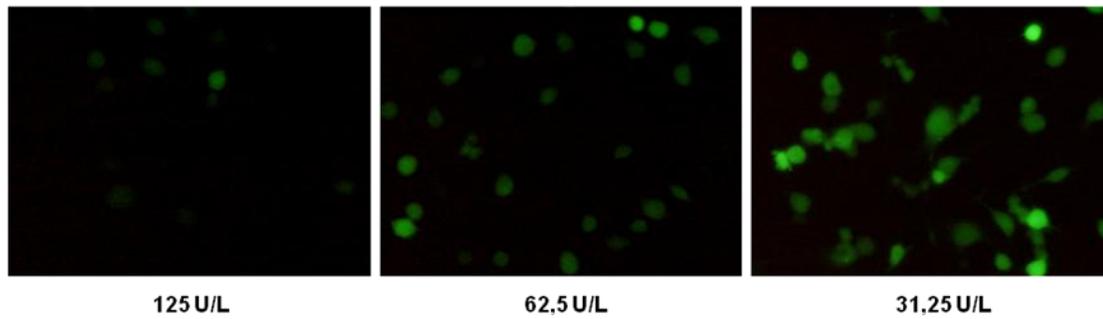
b.



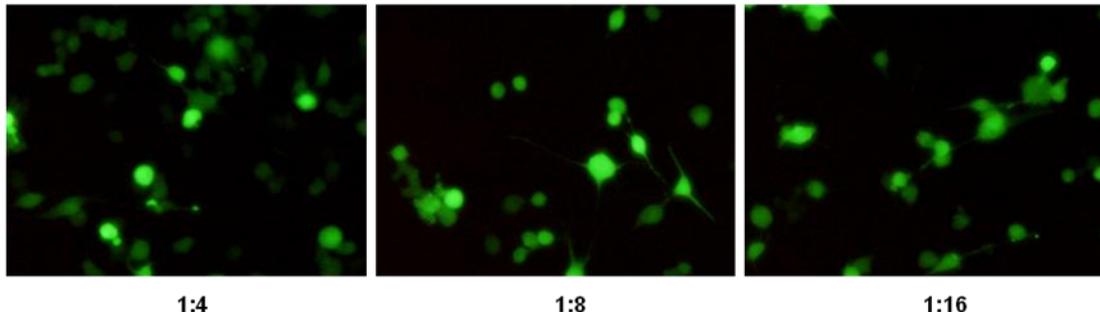
c.



d.



e.



f.

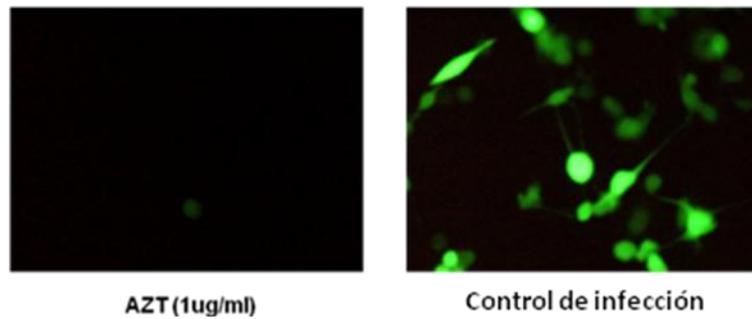


Figura 3. Expresión de GFP en células U373MAGI infectadas con VIH-1 en presencia de los diferentes tratamientos. La línea celular U373-MAGI se infectó con 3ng/ml de p24 del virus, en presencia o ausencia de las CC_{50} , CC_{30} y CC_{15} de los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* lote 1(3a) y 2 (3b) y *Lentinus sp.*(3c); las células también fueron tratadas con los controles, lacasa comercial (Novozyme®) (3d), medio de producción (3e) y AZT (3f). Control la infección (3f). 48 hpi, se observó en un microscopio de fluorescencia la expresión de GFP.

Figura 4.

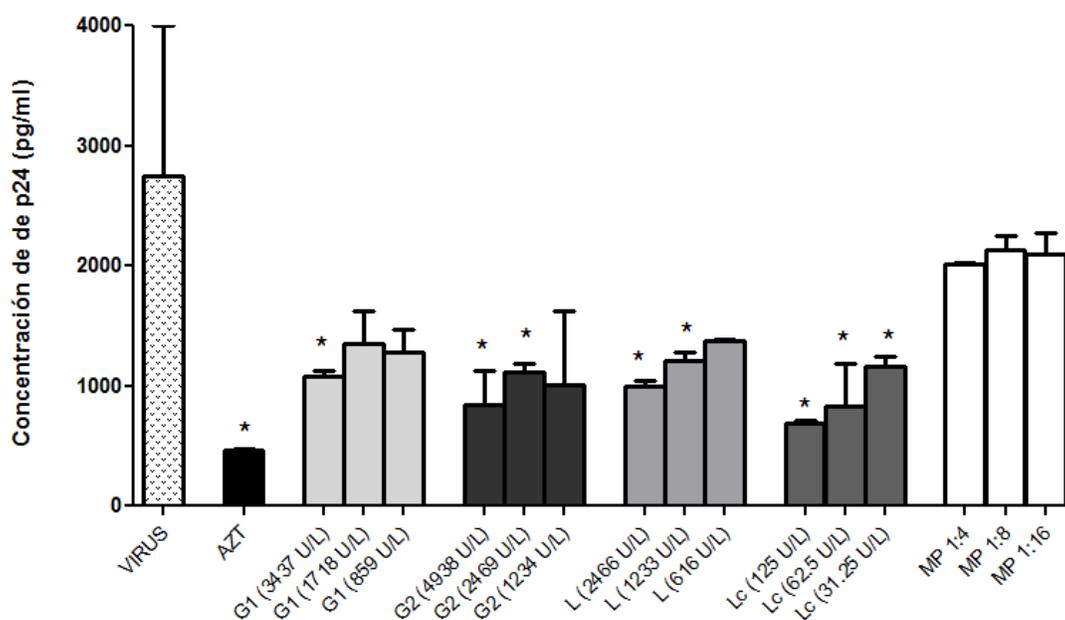
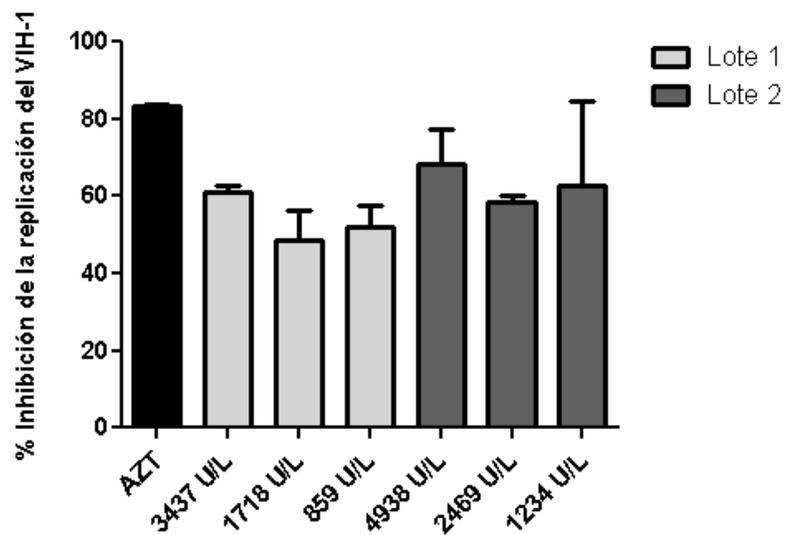


Figura 4. **Gráfica representativa del análisis estadístico.** Basados en los resultados de concentración de p24 encontrados por ELISA, se realizó una prueba t de student, comparando cada tratamiento con el control de infección. Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa, con $p < 0.05$. Para los resultados de infección obtenidos por Citometría y los de inhibición de la producción de transcritos tempranos y tardíos de la TR, obtenidos por qPCR, se realizó la misma prueba estadística.

Figura 5.

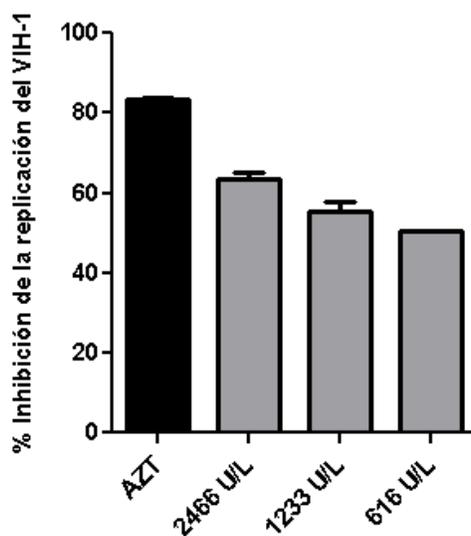
a.

Inhibición de la replicación con el crudo enzimático de *Ganoderma sp.*



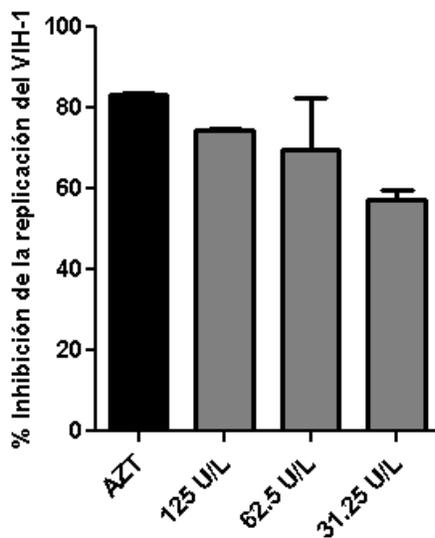
b.

Inhibición de la replicación con el crudo enzimático de *Lentinus sp.*



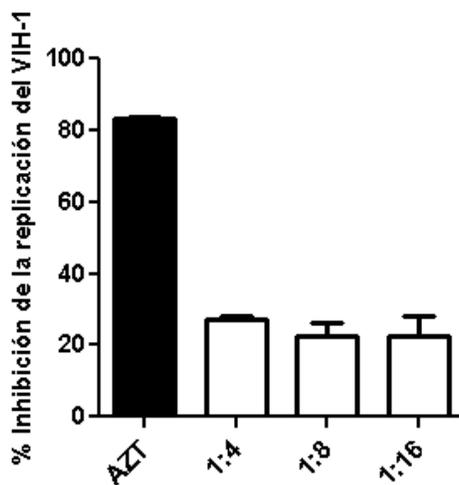
c.

Inhibición de la replicación con la lacasa comercial



d.

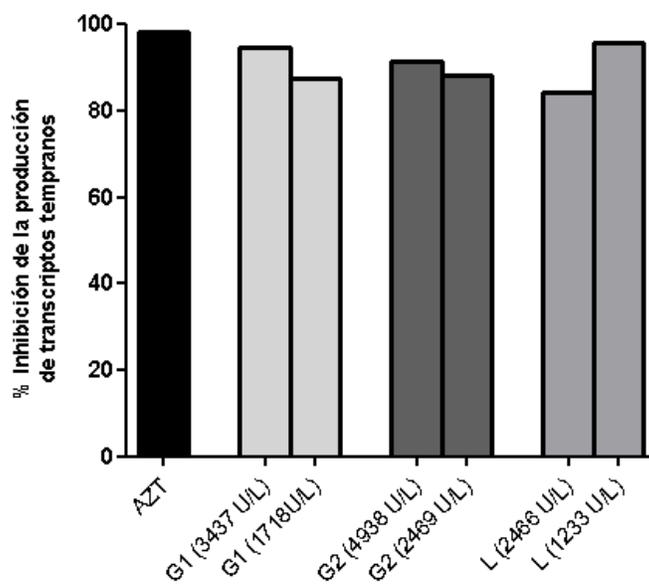
Inhibición de la replicación con el medio de producción



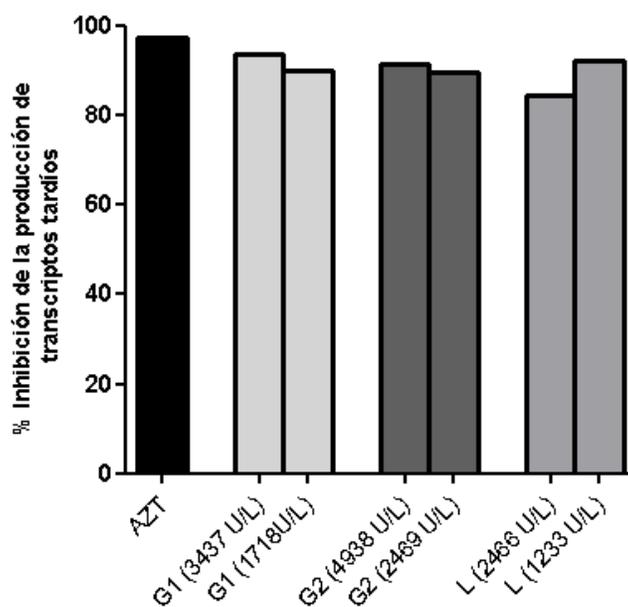
Figuras 5. Efecto inhibitorio del VIH-1 por los diferentes tratamientos, evaluado por medio de ELISA para p24. La línea celular U373-MAGI se infectó con 3ng/ml de p24 del virus, en presencia o ausencia de las CC_{50} , CC_{30} y CC_{15} de los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* lote 1 y 2 (5a) y *Lentinus sp.* (5b). La lacasa comercial (Novozyme®) (5c) y el medio de producción (5d) fueron utilizados como controles. 48 hpi, y se cuantificó a partir de los sobrenadantes la cantidad de p24 mediante una prueba de ELISA. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado.

Figura 6.

a.



b.



Figuras 6. **Inhibición de la transcripción reversa del VIH-1 por los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* y *Lentinus sp.*** La línea celular U373-MAGI se infectó con 3ng/ml del virus, en presencia o ausencia de las CC₅₀, CC₃₀ y CC₁₅ de los crudos enzimáticos de *Ganoderma sp.* lote 1 y 2 (6a) y *Lentinus sp.* (6b). 48 hpi, el ADN de las células fue extraído con kit de extracción de Qiagen® y los productos tempranos (4.1) y tardíos(4.2) de la TR fueron cuantificados mediante qPCR.