



A-2017-24357



(11) **CL 46032**  
(13) B1

(12)

## PATENTE DE INVENCION

(43) Fecha de publicación: **12/10/2001**

(51) Int. Cl. <sup>(7)</sup> **A 61K 35/84, C 12N 1/14**

(22) Número de solicitud: **P/2000/002396**

(30) Prioridad(es):

(71) Solicitante:

**UNIVERSIDAD DE TALCA 2 NORTE 685 TALCA, Talca, Región del Maule, CHILE**

(72) Inventor(es):

**GUILLERMO SCHMEDA HIRSCHMANN[CL]**

(74) Representante:

**SILVA & CIA.  
Hendaya 60, 4º piso, Las Condes, Región Metropolitana, CHILE**

(54) Título:

**USO DE ESPECIES DE CYTTARIA (DIGÜENES) EN LA PREPARACION DE UNA COMPOSICION NUTRACEUTICA DE ADMINISTRACION ORAL, UTIL PARA ESTIMULAR LA RESPUESTA INMUNE DEL ORGANISMO.**

(57) Resumen:

LA PRESENTE INVENCION SE RELACIONA CON UN USO DE ESPECIES DE CYTTARIA (DIGÜENES) EN LA PREPARACION DE UN PRODUCTO NUTRACÉUTICO PARA ESTIMULAR LA RESPUESTA INMUNE DEL ORGANISMO. SE OBTUVIERON EXTRACTOS SOLUBLES EN AGUA Y ALCOHOL-AGUA DE ESPECIES CHILENAS DE CYTTARIA. ESTOS EXTRAIBLES, PRESENTES EN LOS DIGÜENES TAL CUAL COMO SE CONSUMEN, SE ADMINISTRARON POR VIA ORAL. EL EFECTO SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE EXTRACTOS SOLUBLES SE EVALUÓ MEDIANTE DOS ENSAYOS INMUNOLÓGICOS: MEDICIÓN DEL INCREMENTO EN LA FAGOCITOSIS DE MACROFAGOS ALVEOLARES CONTRA LA LEVADURA CANDIDA ALBICANS; Y HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA AL DINITROFLUOROBENCENO (DNFB).



## MEMORIA DESCRIPTIVA

46032

### CAMPO DE APLICACIÓN

Se describe el efecto inmunomodulador de extractos solubles de cuatro especies chilenas de *Cyttaria* ("digüeños", "quireños"), el procedimiento de obtención del extracto, la forma en que este extracto actúa en la fagocitosis de macrófagos alveolares y en la hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno.

### DESCRIPCIÓN DEL ARTE PREVIO

Los cuerpos fructíferos de especies de *Cyttaria* han sido recolectados como fuentes alimenticias por varias etnias Amerindias en el Sur de Argentina y Chile. Las especies de *Cyttaria* son hongos del grupo de los Discomycetos que crecen como parásitos en árboles pertenecientes al género *Nothofagus* (Fagaceae). Los cuerpos fructíferos fueron considerados frutos de los árboles hospederos, y también se fermentaron para obtener chicha, una bebida alcohólica (Mosbach, 1991). Los Mapuches del Sur de Chile y Argentina, los Selkriam (Onas) de Tierra del Fuego así como los Kawashkar y Yámana de los canales fueguinos, recolectaron y consideraron las especies de *Cyttaria* como un alimento (Muñoz, 1981; Schmeda-Hirschmann et al. 1999).

En Chile Central y Sur, la recolección y comercialización de especies de *Cyttaria*, principalmente *C. espinosae* es una actividad económica de campesinos en áreas rurales donde todavía existen bosques nativos de *Nothofagus*. La *Cyttaria espinosae* normalmente se consume fresca, en ensaladas, frecuentemente con cebolla y cilantro, o fritas.

Se conoce muy poco sobre el efecto de hongos y plantas alimenticias nativas recolectadas por indígenas sudamericanos sobre el sistema inmune. Mas aún, la



relación entre dieta y compuestos farmacológicamente activos con frecuencia no es suficientemente considerada en estudios científicos (Etkin and Ross 1991). Sin embargo, el estatus nutricional juega un papel importante en la respuesta inmune (Shronts 1993). El consumo de especies de *Cyttaria* spp. es característico de Chile Central y Sur y representa una de las pocas tradiciones indígenas integradas a la actividad nacional que aún se conservan. Las *Cyttaria* también se encuentran en el sur de Argentina y Nueva Zelanda.

Las *Cyttaria* contienen distintos tipos de compuestos, que en su mayoría son polisacáridos. Esto se demuestra tanto en los estudios de composición alimenticia (proximal) como por las determinaciones realizadas con la porción empleada para investigar efecto sobre el sistema inmune que llevó a esta solicitud de patente.

Los polisacáridos de las *Cyttaria* de Argentina han sido intensivamente investigados. Los estudios incluyen acetólisis de polisacáridos de *C. hariatii* y *C. johowii* (Fernández-Cirelli et Lederkremer, 1974; Couto et Lederkremer, 1984), identificación y cuantificación de ácido D-arabino- hexulosónico (Waksman et al., 1975),  $\beta$ -D-glucano (Fernández-Cirelli et Lederkremer, 1976) y -D-glucano (Waksman et al., 1977). Fernández-Cirelli et al. (1989) informaron la presencia de ácido D-arabino-hexulosónico en polisacáridos de *C. darwinii* y *C. hariatii*. Estudios adicionales incluyen el efecto de la sulfatación sobre la actividad antitumoral de los glucanos de *C. hariatii* (Fernández-Cirelli et al., 1989), oxidación e hidrólisis parcial de polisacáridos de *C. johowii* y su efecto en la actividad antitumoral en sarcoma de ratón (Chasseing et al., 1986; Chasseing et al., 1988). Oliva et al. (1985) publicaron estudios estructurales de un glicopéptido de *C. hariatii*. Un nuevo polisacárido bioactivo se aisló de *C. johowii* y su actividad antitumoral fue reportada por Lederkremer et al. (1983).

Las investigaciones de actividad biológica realizados en Argentina emplearon polisacáridos purificados de *Cyttaria*. En la actividad antitumoral, los compuestos se



inyectaron intraperitonealmente a la dosis 5 mg/kg durante cinco días (Lederkremer et al., 1983, Fernández Cirelli et al., 1989).

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se obtuvieron extractos solubles en agua y alcohol-agua de especies chilenas de *Cyttaria*. Estos extraíbles, presentes en los digüehes tal cual como se consumen se administraron por vía oral a animales de experimentación para verificar su efecto sobre el sistema inmune.

El efecto sobre el sistema inmune de extractos solubles en agua de cuatro especies chilenas de *Cyttaria* se evaluó mediante dos ensayos inmunológicos.

- Medición del incremento en la fagocitosis de macrófagos alveolares contra la levadura *Candida albicans*. Se determinaron el porcentaje de fagocitosis, el índice fagocítico y el índice digestivo (Stossel, 1974).
- Hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno (DNFB). Se determinó la reacción ante el DNFB aplicando una segunda dosis en la oreja del animal y midiendo el incremento en grosor de la misma (reacción de hipersensibilidad retardada) según (Noonan et al., 1984).

Al ser interesante los resultados, los extractos empleados se analizaron en cuanto a proteínas, cenizas, carbohidratos y sulfatos.

Con respecto al efecto de extractos de *Cyttaria* en la capacidad fagocítica de macrófagos alveolares, la función de los macrófagos aumentó marcadamente a consecuencia de la administración oral de extractos de *Cyttaria*. Los valores para el ensayo de fagocitosis *in vitro* mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados con *Cyttaria*, los no tratados y los controles.

Teniendo en cuenta el desarrollo de hipersensibilidad retardada ante el DNFB, en



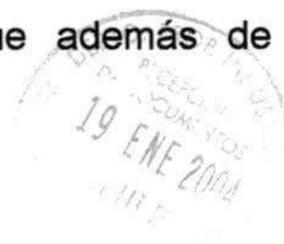
el grupo control, los valores promedios de incremento en el grosor de la oreja fueron de alrededor de  $150 \pm 37\mu$ , mientras que en las ratas tratadas con extractos de *Cyttaria* los valores promedio oscilaron entre  $91,44 \pm 13,91\mu$  para *C. harioti*,  $60,96 \pm 13,91\mu$  para *C. darwinii*,  $35,56 \pm 13,91\mu$  para *C. espinosae* y  $45,72 \pm 11,35\mu$  para *C. berteroi*. El valor para los animales no tratados fue de  $61,2\mu$ .

La administración oral de extractos solubles en agua de cuatro especies de *Cyttaria* chilenas a ratones inmunosuprimidos mostró un efecto inmunoestimulante significativo. En el modelo de linfoma L5178Y, una dosis diaria vía oral de 100 mg extracto de *Cyttaria* durante siete días incrementó el porcentaje de fagocitosis y el índice fagocítico en animales que recibieron extractos de *Cyttaria berteroi*, *C. darwinii*, *C. espinosae* y *C. harioti*. Se observaron diferencias en el índice digestivo de animales tratados con *C. darwinii* y *C. berteroi*. En el modelo de la hipersensibilidad retardada, sólo *C. harioti* fue capaz de modificar la respuesta inmune.

Se ha descubierto recientemente que distintas *Cyttaria*: *Cyttaria berteroi*, *C. darwinii*, *C. espinosae* y *C. harioti* tienen además otras actividades biológicas. La composición proximal (composición nutricional) de las muestras fue similar a la de otros hongos comestibles. Además, la mayoría de los extractos acuosos de *C. espinosae* y *C. harioti* mostraron actividad de unión al ADN (Schmeda Hirschmann et al., 1999).

Los resultados demuestran que extractos solubles en agua de muestras chilenas de *Cyttaria berteroi*, *Cyttaria darwinii*, *Cyttaria espinosae* y *Cyttaria harioti* ejercen efectos sobre la respuesta inmune no específica en ratones inmunosuprimidos. La *Cyttaria harioti* es capaz de rescatar la respuesta celular inmune en ratones inmunosuprimidos.

Según Wagner (1995) los agentes inmunomoduladores de plantas son mayoritariamente polisacáridos que estimulan la respuesta inmune no-específica. La composición proximal de los extractos de las muestras indica que además de



polisacáridos éstas contienen un porcentaje elevado de proteínas. La composición proximal de los extractos usados en el presente estudio, sin embargo, también muestran un contenido de proteína cruda entre 85 - 116 g/kg para *C. harioi* y *C. berteroi* a 350 - 390 g/kg por *C. darwinii* y *C. espinosae*. Se ha determinado que una dieta rica en proteínas favorece la función de las células T y los macrófagos (Shronts 1993). Las proteínas presentes en los extractos de *Cyttaria* probablemente juegan un rol regulando la función fagocítica y la hipersensibilidad retardada en animales inmunosuprimidos con el linfoma L5178Y.

Se puede concluir que un factor a ser considerado con respecto a los recursos alimenticios es la relación entre alimentación y compuestos activos farmacológicamente (Etkin et Ross, 1991). La exposición a constituyentes dietarios nutricionales y no nutricionales influencia la salud de los consumidores. Los estudios muestran que la administración oral de extractos de *Cyttaria* produce inmunoestimulación con una tendencia a rescatar los animales inmunosuprimidos por el linfoma L5178Y.

La dosis oral de extractos de *Cyttaria* empleados en los experimentos corresponde a cantidades entre 3 - 5 g hongo fresco/kg/día. Como las *Cyttaria* se consumen durante un periodo corto del año (septiembre a noviembre) su efecto en la salud humana todavía debe ser establecido.

Otros estudios a ser realizados deberán relacionar el efecto inmunoestimulante de las *Cyttarias* con un solo grupo de compuestos y evaluar la evolución de tumores en animales. Después de 7 días, se observó el 30% de supresión de la respuesta inmune no específica y los cambios en la supresión pueden ser dependientes del tiempo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La mayor parte del material utilizado, fueron hongos recolectados en Chile Central. Estos se emplean estacionalmente como alimento, pero sin dársele ningún



valor como nutracéuticos.

#### Procedimiento de obtención de los extractos.

Se maceraron los hongos frescos en metanol (MeOH), se licuaron en juguera y se re-extrajeron con MeOH. Los extractos combinados se filtraron se concentraron a presión reducida. Una vez eliminado el metanol, el concentrado acuoso se extrajo con diclorometano (DCM) para separar componentes de baja polaridad. La fracción soluble en agua, libre de componentes apolares fue concentrada bajo presión reducida y liofilizada. La fracción soluble en agua se usó para bioensayos. Los rendimientos de extracción peso/peso en base al material de partida seco, variaron entre 12,5% y 17% (*Cyttaria berteroi* 12,5; *Cyttaria Darwinii* 15,3; *Cyttaria espinosae* 17,0 y *Cyttaria harioti* 14,8). También pueden usarse otros alcoholes, tales como el etanol.

Con los extractos solubles se pueden preparar composiciones, las cuales pueden ser ingeridas oralmente. Por otra parte, los hongos consumidos como tales también contienen los compuestos activos.

La parte soluble en agua del extracto de *Cyttaria*, empleada en los bioensayos, se analizó en cuanto a proteínas, cenizas, compuestos no-nitrogenados (carbohidratos) y sulfatos. El contenido de proteína cruda fue determinado por la conversión estándar de Kjeldahl. El contenido de carbohidratos fue obtenido por diferencia de la suma de proteínas y cenizas del total de materia seca. Los niveles de sulfatos se determinaron por espectrofotometría (Heldrich 1970, Schmeda-Hirschmann et al., 1999). La composición proximal en peso de los extractos solubles en agua de *Cyttaria* en base seca, se presenta en la Tabla 1. Los valores presentados son el promedio de tres determinaciones.



**Tabla 1.**

Composición proximal de extractos hidrosolubles de *Cyttaria* en base a peso seco.

	<i>C. berteroi</i>	<i>C. espinosae</i>	<i>C. darwinii</i>	<i>C. hariotti</i>
Ceniza (g/kg)	58	98	110	81
Proteínas (g/kg)	116	390	350	85
Extracto libre de nitrógeno (g/kg) (determinado por diferencia)	826	512	540	834
SO <sub>4</sub> = (mg/kg)	3,0	3,96	4,2	3,2

Para los ensayos biológicos se emplearon ratones macho adultos BALB/c (de 6 semanas de edad, y entre 20 g a 24 g), los cuales se mantenían en condiciones estándar de laboratorio con agua y alimento disponible todo el tiempo del experimento. Cada grupo de ratones consistía de 5 animales.

Para probar la actividad de los extractos de *Cyttaria* en el sistema inmune, se inocularon ratones con un número definido ( $2 \times 10^6$ ) de células de linfoma L5178Y. La línea tumoral empleada se deriva de linfoma del timo de ratón (Gómez et al., 1979; Ramos et al., 1980) y se mantuvo en forma ascítica por pasaje semanal inyectando intraperitonealmente  $10 \times 10^6$  células en ratones singénicos BALB/c (H-2d). Esta metodología ha sido empleada con anterioridad en estudios del sistema inmune y está bien descrito en protocolos normalizados. Se ha demostrado que ratones con linfoma L5178Y presentan un estado de inmunosupresión (Orozco 1999, Daneri 1995).

El tratamiento con extractos acuosos de *Cyttaria* se inició 24 h después de la inoculación de las células de linfoma. Los animales recibieron una dosis oral diaria de 100 mg extracto de *Cyttaria* por kg de peso durante siete días. Como grupos de control, se emplearon ratones normales y ratones inoculados con L5178Y sin ningún tratamiento.

Con respecto a los macrófagos alveolares, para obtenerlos se lavaron los espacios de aire con 1,5 ml de solución salina balanceada de Hanks (HBSS). Se usó el



fluido de lavado bronquioalveolar para ensayos de fagocitosis en alícuotas de 0,5 ml.

Se usó la levadura *Candida albicans* para los ensayos de fagocitosis. Los cultivos del microorganismo se mantuvieron en el medio de cultivo agar dextrosa-Sabouraud (Difco, México) a temperatura ambiente. Las levaduras en fase de crecimiento exponencial se extrajeron con una solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a partir de cultivos en crecimiento en el medio Sabouraud (24 horas a 32° C). La suspensión se centrifugó a 150xG por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y los pellets de células se lavaron con HBSS. Después de la centrifugación se estandarizó la suspensión de levaduras contando directamente en un hemocitómetro. Este protocolo se emplea en forma normalizada para estudios de fagocitosis.

Para los ensayos de fagocitosis, los grupos tratados y de control fueron sacrificados un día después de la última administración del extracto. Los macrófagos alveolares se incubaron en placas de vidrio (22 x 22 mm.) a 37° C por 30 minutos en una cámara humidificada. Las células que se adhirieron al vidrio se incubaron con células de *C. albicans* vivas ( $3 \times 10^5$ ) a 37° C x 30 minutos (tiempo de digestión), lavados con HBSS e incubadas 30 minutos con suero autólogo (tiempo de digestión). Se tiñeron las placas con colorante de Wright y se observaron a la luz del microscopio. En cada placa se contó un número total de 300 células. Los resultados se informaron como promedios  $\pm$  la desviación estándar de fagocitosis porcentual, el índice de fagocitosis (PI) y el índice de digestión (DI) (Stossel, 1974). El efecto de los extractos de *Cyttaria* en la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares de ratas BALB/c inmunosuprimidas con L5178Y se muestra en la Tabla 2.



Tabla 2.

Efecto de extractos de *Cyttaria* en la fagocitosis de macrófagos alveolares de ratones BALB/c inmunosuprimidos con linfoma L5178Y.

Grupo	% Fagocitosis	Indice de Fagocitosis	Indice de Digestión
Control	42,40 ± 13,46	1,18 ± 0,69	0,67 ± 0,41
L5178Y	29,8 ± 4,27 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,07
<i>Cyttaria berteroi</i>	91,0 ± 7,81 <sup>bd</sup>	6,89 ± 1,18 <sup>bd</sup>	1,67 ± 0,76 <sup>ac</sup>
<i>Cyttaria darwinii</i>	81,5 ± 4,94 <sup>ad</sup>	3,17 ± 0,30 <sup>ad</sup>	1,42 ± 0,15 <sup>ac</sup>
<i>Cyttaria espínosae</i>	95,5 ± 2,89 <sup>bd</sup>	5,47 ± 0,50 <sup>bd</sup>	1,01 ± 0,30
<i>Cyttaria harioti</i>	86,00 ± 4,24 <sup>ad</sup>	3,41 ± 0,13 <sup>bd</sup>	1,01 ± 0,64

<sup>a</sup> p<0,01 vs. Control; <sup>b</sup> p<0,001 vs. Control; <sup>c</sup> p<0,01 vs. L5178Y; <sup>d</sup> p<0,001 vs. L5178Y. Todos los grupos excepto el de control fueron previamente inoculados con 2x10<sup>6</sup> células de linfoma L5178Y.

Los resultados se expresaron como promedios ± la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante el test de Student pareado " t " y se consideraron relevantes cuando la significancia " p " < 0,05.

En cuanto a la reacción de hipersensibilidad retardada al dinitrofluorobenceno (DNFB), las ratas fueron sensibilizadas con DNFB (sigma D-6879) colocando 20µl de 0,5% DNFB en aceite de oliva - acetona en sus abdómenes rasurados, en los días 1 y 2. En el quinto día se coloca una solución de 10 µl de DNFB al 0,2% en su oreja derecha. Se determina la respuesta de hipersensibilidad midiendo la variación del grosor de la oreja, comparado los animales tratados con animales normales y sin tratar. Se midió el grosor de la oreja derecha, 48 horas después con un micrómetro. La diferencia entre el grosor de la oreja derecha antes y después del cambio con DNFB fue calculado (Noonan et al, 1984). Los resultados de ratas tratadas con extractos de *Cyttaria* en cuanto a la hipersensibilidad retardada ante el DNFB se presentan en la Tabla 3.



Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante el test de Student pareado " *t* " y se consideraron relevantes cuando la significancia "*p*" < 0,05.

Tabla 3.

Hipersensibilidad retardada al DNFB en ratones tratados con extractos de *Cyttaria*.

Ratones y tratamiento	Aumento en el grosor promedio de la oreja $\pm$ S.D. ( $\mu$ )
Control	151 $\pm$ 37,42
L5178Y	61,2 $\pm$ 22,8 <sup>b</sup>
<i>Cyttaria berteroi</i>	45 $\pm$ 11,35 <sup>b</sup>
<i>Cyttaria darwinii</i>	60,96 $\pm$ 13,91 <sup>b</sup>
<i>Cyttaria espinosae</i>	35,56 $\pm$ 13,91 <sup>b</sup>
<i>Cyttaria harioti</i>	91,44 $\pm$ 13,91 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> *p*<0,01 vs. Control; <sup>b</sup> *p*<0,001 vs. Control; <sup>c</sup> *p*<0,01 vs. L5178Y; <sup>d</sup> *p*<0,001 vs. L5178Y.





## REIVINDICACIONES

1. Uso de especies de *Cyttaria* (digüeños) CARACTERIZADO porque sirven para preparar una composición nutracéutica de administración oral, útil para estimular la respuesta inmune del organismo.
2. Uso de especies de *Cyttaria* según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque sirven para preparar una composición nutracéutica de administración oral, útil para estimular la respuesta inmune de mamíferos inmunosuprimidos.
3. Uso de especies de *Cyttaria* según la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque dichas especies pueden ser: *C. espinosae*; *C. harioti*; *C. darwinii* o *C. berteroi*.
4. Uso de especies de *Cyttaria* según la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque se preparan extractos solubles de dichas especies.
5. Uso de especies de *Cyttaria* según la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque los extraíbles activos se preparan a partir de extractos (de los digüeños) solubles en agua.
6. Uso de especies de *Cyttaria* según la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque los extraíbles activos se preparan a partir de extractos (de los digüeños) solubles en agua-alcohol.

