



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Departamento de Botánica

**Potencial efecto antioxidante y neuroprotector del
extracto de polisacáridos aislado del digüeño
*Cyttaria espinosae***

Tesis presentada para optar al título de Biólogo

Por Ignacio Arturo Tello Valdivia

Prof. Guía Dra. Claudia Pérez Manríquez

Marzo 2023

Concepción, Chile

HOJA DE FIRMAS

Profesora Guía

Dra. Claudia Pérez Manríquez

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción

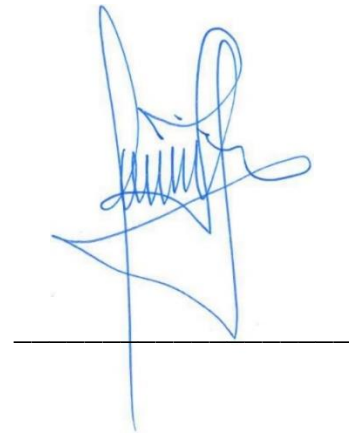


Profesores evaluadores

Dr. Jorge Fuentealba Arcos

Departamento de Fisiología

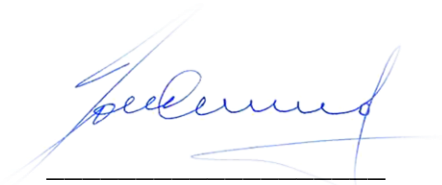
Universidad de Concepción



Dr. José Becerra Allende

Departamento de Botánica

Universidad de Concepción



AGRADECIMIENTOS

Indudablemente las palabras no son suficientes para poder agradecer a todas las personas que han sido parte de esta etapa de mi vida, sin embargo, haré el intento de expresar mi agradecimiento con cada una de ellas.

Quiero partir agradeciendo a mi familia, por su incondicional amor, apoyo y contención durante todo este proceso. A pesar de la distancia, siempre fui capaz de sentir ese calor humano que me brindó fuerzas para continuar durante los momentos difíciles.

Agradecer también a todo el equipo del laboratorio de Química de Productos Naturales, pues sin su ayuda no habría sido posible la realización de este trabajo. En especial quiero agradecer al Dr. José Becerra por su buena disposición y por todo el conocimiento que he adquirido durante estos años. También dar las gracias a la Dra. Claudia Pérez por toda su paciencia, compromiso y amabilidad durante los años en los que he estado bajo su tutela, sin duda, su apoyo intelectual ha sido fundamental para desarrollarme como profesional. Además, también agradecer al Dr. Fabián Figueroa por todo su apoyo, acompañamiento y cercanía durante el tiempo en el que hemos estado trabajando codo a codo, la multitud de experiencias compartidas, desde luego, me han ayudado a formarme como persona.

Por otra parte, también quiero agradecer al equipo del laboratorio de screening de compuestos bioactivos de la facultad de ciencias biológicas. En especial al Dr. Jorge Fuentealba y Javiera Gavilán por su buena disposición, amabilidad y guía durante todo el tiempo que trabajé en dichas instalaciones. Ciertamente, será un periodo que recordaré gustosamente.

Finalmente, agradecer a todas las increíbles personas con las que he convivido y compartido durante este último año, sin duda han sido esenciales para afrontar todos los desafíos que se me han presentado y han logrado que mis días sean mucho más satisfactorios y amenos, a pesar del arduo trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Hoja de firmas.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice de figuras.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Abreviaturas.....	8
Introducción.....	10
Los trastornos neurológicos y su problemática a nivel mundial.....	10
La enfermedad de Alzheimer.....	11
El péptido β -amiloide.....	12
Actividad antioxidante a nivel cerebral.....	13
Importancia de los productos naturales y su potencial en la industria farmacéutica.....	14
Hongos como fuente de compuestos bioactivos.....	15
Compuestos fúngicos en neuroprotección.....	16
Polisacáridos fúngicos y su uso en neuroprotección.....	18
El género <i>Cyttaria</i> Berk.....	21
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	24
Materiales y métodos.....	25
Resultados.....	33
Discusión.....	45
Conclusiones.....	52

Bibliografía.....	53
-------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A) <i>Cyttaria espinosae</i> sobre rama de <i>N.obliqua</i> . B) Estromas de <i>C.espinosae</i> . (Salazar Vidal, 2015).....	9
Figura 2: Diagrama de flujo que muestra el proceso seguido en la metodología....	24
Figura 3: Espectro del extracto de polisacáridos de <i>Cyttaria espinosae</i> obtenido mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	32
Figura 4: Curva de calibración para la cuantificación del contenido de azúcares usando el método de antrona.....	33
Figura 5: Curva de calibración para la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	34
Figura 6: Curva de calibración para la cuantificación del contenido de sulfatos usando el método de Terho et al. 1971.....	35
Figura 7: Porcentaje de inhibición del radical DPPH usando distintas concentraciones de PsCe.....	37
Figura 8: (A) IC ₅₀ de PsCe en DPPH. (B) IC ₅₀ de Trolox en DPPH.....	37
Figura 9: Porcentaje de inhibición del radical DPPH usando distintas concentraciones de PsCe.....	39
Figura 10: (A) IC ₅₀ de PsCe en ABTS ⁺ . (B) IC ₅₀ de Trolox en ABTS ⁺	40
Figura 11: Viabilidad de células PC-12 incubadas con DMSO (1ul), FCCP (1uM) y distintas concentraciones de PsCe (0,1-100 µg/ml).....	41
Figura 12: Viabilidad de las células PC-12 incubadas con distintas concentraciones de PsCe (0,1-100 µg/ml) y Aβ (1uM).....	42

RESUMEN

Las enfermedades neurológicas son un problema creciente a nivel mundial, siendo responsables de un gran porcentaje de muertes y años perdidos por discapacidad. Las demencias representan gran parte de estos casos y se estima que irán en aumento a lo largo de las próximas décadas, siendo la enfermedad de Alzheimer, la responsable de la amplia mayoría de los casos. La principal hipótesis, sobre las causas de la EA, indica que la acumulación progresiva del péptido β -amiloide desencadena una cascada de señales que da origen a esta enfermedad. Sin embargo, existen pruebas experimentales que sugieren que los oligómeros solubles del péptido β -amiloide, por sí solos, causan las principales alteraciones neuronales asociadas a esta. Además, se ha relacionado a las enfermedades neurodegenerativas, con una insuficiente capacidad antioxidante del cerebro y los daños producidos por el estrés oxidativo. Los productos naturales han sido esenciales para el desarrollo de fármacos durante décadas, destacando los organismos pertenecientes al reino fungi por su potencial medicinal. Dentro de los diferentes compuestos producidos por los hongos, los polisacáridos han destacado por sus innumerables propiedades bioactivas, teniendo numerosos estudios que respaldan su potencial frente a las enfermedades neurodegenerativas. *Cyttaria*, es un género de hongos que cuenta con un total de 11 especies descritas a nivel mundial, 7 de las cuales están presentes en Chile. Una de estas, es *Cyttaria espinosae*, de la cual existe escasa información relacionada a su potencial aplicación frente a las enfermedades neurodegenerativas. Es por ello, que el presente estudio tiene por objetivo, evaluar el efecto antioxidante y neuroprotector del extracto de polisacáridos obtenido desde esta especie. Para ello, se evaluó la capacidad antioxidante de este extracto en los ensayos DPPH y ABTS⁺ y el potencial neuroprotector en células PC-12 sometidas al daño inducido por A β . Posteriormente, se caracterizó estructuralmente el extracto, mediante FTIR y distintas metodologías para la cuantificación de distintos compuestos. Los resultados mostraron que el extracto de polisacáridos de *C. espinosae* posee una moderada actividad antioxidante asociada a su contenido de proteínas. Por otra parte, este extracto no presentó efectos neuroprotectores, pues no fue capaz de inhibir la toxicidad inducida por A β . Es por ello, que se requiere continuar con la investigación relacionada a los mecanismos y factores que intervienen en la bioactividad de estas moléculas.

Palabras clave: péptido β -amiloide, neuroprotección, *Cyttaria espinosae*, polisacáridos fúngicos

ABSTRACT

Neurological diseases are a growing problem worldwide, being responsible for a large percentage of deaths and years lost due to disability. Dementias account for a large proportion of these cases and are expected to increase over the coming decades, with Alzheimer's disease accounting for the vast majority of cases. The main hypothesis about the causes of AD indicates that the progressive accumulation of β -amyloid peptide triggers a signaling cascade that gives rise to this disease. However, there is experimental evidence suggesting that soluble oligomers of β -amyloid peptide alone cause the main neuronal alterations associated with AD. In addition, neurodegenerative diseases have been linked to insufficient antioxidant capacity of the brain and damage caused by oxidative stress. Natural products have been essential for drug development for decades, with organisms belonging to the fungi kingdom standing out for their medicinal potential. Among the different compounds produced by fungi, polysaccharides have stood out for their innumerable bioactive properties, with numerous studies supporting their potential against neurodegenerative diseases. *Cyttaria* is a genus of fungi with a total of 11 species described worldwide, 7 of which are present in Chile. One of these is *Cyttaria espinosae*, of which there is scarce information related to its potential application against neurodegenerative diseases. Therefore, the present study aims to evaluate the antioxidant and neuroprotective effect of the polysaccharide extract obtained from this species. For this purpose, the antioxidant capacity of this extract was evaluated in DPPH and ABTS+ assays and the neuroprotective potential in PC-12 cells subjected to $A\beta$ -induced damage. Subsequently, the extract was structurally characterized, using FTIR and different methodologies for the quantification of different compounds. The results showed that the polysaccharide extract of *C. espinosae* possesses moderate antioxidant activity associated with its protein content. On the other hand, this extract did not present neuroprotective effects, as it was not able to inhibit $A\beta$ -induced toxicity. Therefore, it is necessary to continue with research related to the mechanisms and factors involved in the bioactivity of these molecules.

Keywords: β -amyloid peptide, neuroprotection, *Cyttaria espinosae*, fungal polysaccharides.

ABREVIATURAS

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

APP: Proteína precursora amiloide

Ara: Arabinosa

A β : Péptido β -Amiloide

Bax/Bcl-2: Vía de señalización de la familia de genes Bcl-2, encargados de regular la apoptosis celular

Cyt-C: Citocromo C

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

EA: Enfermedad de Alzheimer

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

FVY: *Flammulina velutipes* variedad amarilla

Fx: Fomannoxina

GAE: Equivalentes de ácido gálico

Gal: Galactosa

Glc: Glucosa

GIPs: Polisacáridos de *Ganoderma Lucidum*

HePs: Polisacáridos de *Hericiium Erinaceus*

HT22: Línea celular derivada de tejidos neuronales de ratón sensibles a glutamato

IC₅₀: Mitad de la concentración inhibitoria máxima

IDE: Enzima degradadora de insulina

IoPs: Polisacáridos de *Inonotus obliquos*

L-Glu: Glutamato

LPS: Lipopolisacáridos o endotoxinas

Man: Manosa

MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridinio

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NEP: Neprilisina

Nrf2: Vía de señalización del Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2, es clave en la regulación del estrés oxidativo

P-Tau: Proteína Tau

PC-12: Línea celular derivada de feocromocitoma de rata

PcCe: Polisacáridos crudos de *Cyttaria espinosae*

PI3K/Akt: Vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 quinasa, controla el crecimiento y la supervivencia celular

PS: Peso seco

PsCe: Polisacáridos purificados de *Cyttaria espinosae*

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SH-SY5Y: Línea celular derivada de neuroblastoma humano

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente de Trolox

INTRODUCCIÓN

Los trastornos neurológicos y su problemática a nivel mundial.

Los trastornos neurológicos son una serie de alteraciones a nivel nervioso, de carácter bioquímico o estructural que afectan el cerebro, los nervios y la médula espinal. Estos trastornos se han vuelto un problema cada vez mayor a nivel mundial, pues dan origen a un grupo de enfermedades, conocidas como enfermedades neurológicas, que son responsables de un 12% de las muertes a nivel mundial y de un gran número de años perdidos por discapacidad, sobre todo debido a las demencias (Phan et al. 2015; Schwarzingler et al. 2018; World health organization 2006)

La demencia es una afección causada por diversas alteraciones que dañan las estructuras cerebrales, provocando un progresivo deterioro de la memoria y otras funciones cerebrales. Lo que a largo plazo, genera una dependencia total por parte de los pacientes, esto debido a la incapacidad de realizar las actividades cotidianas (Sosa et al. 2012).

A nivel mundial, la demencia ha tenido uno de los mayores incrementos como causante de la pérdida de años de vida saludable (más de un 200% entre 1990 y 2010) y muerte prematura (pasando desde el lugar 49 en 1990 al 17 en el año 2010) (Lozano et al. 2012; Murray & Lopez 2013). Este padecimiento implica altos costos directos e indirectos debido a sus complicaciones. Durante el año 2010, la estimación de gastos asociados a esta enfermedad fue de aproximadamente US\$604.000 millones, lo que corresponde al 1,0% del producto interno bruto a nivel mundial (Wimo et al. 2013).

De acuerdo con datos reportados por la Alzheimer's Disease International, 47 millones de personas sufren de demencia en el mundo, número que alcanzaría los 131 millones para el año 2050 (Prince et al. 2016). Estos datos concuerdan con lo reportado previamente por Hampel et al. 2011, quienes proyectaron un incremento de entre el 80-190% en los casos de demencia en países de altos ingresos; y más

de un 300% en países de menores ingresos, durante el período comprendido entre los años 2001 – 2040.

En el caso de Chile, las estimaciones indican que aproximadamente el 1% de la población presenta algún tipo de demencia. Esta afección, representa la sexta causa de muerte a nivel nacional, con un costo aproximado de 17.559 dólares anuales por paciente (Hojman et al. 2017). En Chile y el resto del mundo, se ha observado que la enfermedad de Alzheimer es una de las principales causantes de demencia a nivel mundial, representado entre un 60% y 80% de todos los casos (Sosa et al. 2012).

La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo y persistente que afecta amplias zonas de la corteza cerebral y el hipocampo (Masters et al. 2015). Esta enfermedad se caracteriza por un continuo deterioro cognitivo, el que produce una paulatina pérdida de la memoria y el comportamiento racional, provocando la necesidad total de cuidados, años después del diagnóstico clínico (Ferri et al. 2005; Price et al. 1993).

Las características neuropatológicas y neuroquímicas de la EA incluyen pérdida sináptica, muerte neuronal selectiva, disminución de neurotransmisores específicos y la presencia de estructuras anormales en las neuronas (ovillos neurofibrilares, de proteína tau) y en el espacio extracelular (placas cerebrovasculares difusas y neuríticas, de péptido β -amiloide) (Masters et al. 2015). Las primeras anomalías son detectadas generalmente en el tejido correspondiente al lóbulo frontal y temporal, y progresan lentamente hacia otras zonas del neocórtex a una velocidad que varía dependiendo del paciente (Montine et al. 2012).

La hipótesis más reciente que aborda las causas de la enfermedad de Alzheimer, indica que la acumulación progresiva del péptido β -amiloide ($A\beta$) desencadena una cascada de señales, que daría origen a las principales anomalías asociadas a esta enfermedad. Esta cascada comienza con una acumulación progresiva del $A\beta$ en múltiples sitios alrededor de los axones, generando placas cerebrovasculares que

causan una pérdida sináptica localizada en primera instancia (Karran & De Strooper 2016; Wu et al. 2010). A medida que estas placas se van acumulando, ocasionan numerosas fosforilaciones a lo largo de los axones, conduciendo a una disociación de la proteína tau de los microtúbulos, dando origen a los ovillos neurofibrilares (Ittner et al. 2010; Roberson et al. 2007). Estos ovillos en conjunto con las placas cerebrovasculares causan daños múltiples en los axones, lo que conduce finalmente a la pérdida de estos y, con ello, causan las principales alteraciones a nivel neurológico asociadas a esta enfermedad (Edwards 2019).

Por otro lado, también se ha asociado la progresión de esta enfermedad con alteraciones existentes en las células encargadas de la protección del sistema nervioso central, es decir, las microglías (Hong et al. 2016; Yuan et al. 2016). Pues, se ha sugerido que estas células retrasarían la acumulación de A β y la alteración de redes sinápticas completas, retardando así, la aparición de las principales anomalías asociadas a esta enfermedad (Edwards 2019).

El péptido β -amiloide

El β -amiloide es un péptido que se genera a partir de la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP) por parte de las secretasas β y γ (Gra et al. 2002). De esta escisión se generan numerosas isoformas del A β , cuya toxicidad y perfil de agregación varían dependiendo de su tamaño; siendo las isoformas A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂, las que se encuentran mayoritariamente presentes en las placas amiloides de los pacientes con EA (Lee et al. 2017). Los monómeros recién formados a partir de la escisión de la APP están parcialmente plegados y son propensos a interactuar entre sí, lo que conduce a la oligomerización del A β , generando pequeños conjuntos oligoméricos que, según algunas pruebas experimentales, causarían gran parte de las alteraciones neuronales asociadas a la EA (Glabe 2008). Una de ellas es el experimento que realizaron Lesné y colaboradores, en el que se inyectaron oligómeros de 56 KDa de A β en el cerebro de ratas jóvenes, demostrando que estos son capaces de afectar negativamente la memoria, sin la necesidad de la presencia de las placas cerebrovasculares (Lesné et al. 2006). Además, estos oligómeros, también indujeron la muerte celular, disminuyeron la actividad eléctrica de redes

neuronales *in vitro*, afectaron la neurotransmisión y causaron fallas sinápticas crónicas en otros experimentos (Aguayo et al. 2009; Fuentealba et al. 2011).

Actividad antioxidante a nivel cerebral

Otro punto a considerar, es la importancia de la actividad antioxidante a nivel cerebral, puesto que este órgano en concreto es más susceptible que otros tejidos a los daños derivados del estrés oxidativo (Lee et al. 2020). El estrés oxidativo, es un desequilibrio entre agentes prooxidantes y antioxidantes en el organismo, lo que causa una serie de daños a nivel tisular, llegando a inducir diversas patologías (Acharya et al. 2010; Rahal et al. 2014).

En el caso del cerebro, este órgano es particularmente proclive a sufrir daños derivados del estrés oxidativo, debido a su intensa producción de metabolitos reactivos del oxígeno (ROS), niveles relativamente bajos de moléculas antioxidantes, baja capacidad de reparación y células neuronales que no se replican (Lee et al. 2020). Es por esto, que se ha relacionado a las patologías neurológicas con una insuficiente capacidad antioxidante del cerebro y los daños producidos por el estrés oxidativo (Gao et al. 2018; Lee et al. 2020). Directamente relacionado con esto, Boll y colaboradores, cuantificaron numerosos agentes oxidativos en conjunto con enzimas y cofactores antioxidantes, en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con distintas enfermedades neurodegenerativas, demostrando que los agentes oxidantes aumentaron hasta en 4 veces y hubo una disminución en la actividad de las enzimas implicadas en la función antioxidante, como la superóxido dismutasa y la ferroxidasa en los pacientes afectados por estas enfermedades (Boll et al. 2008).

El estrés oxidativo, es normalmente contrarrestado por el sistema antioxidante del cuerpo, el que incluye muchas enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos (Rahal et al. 2014). Sin embargo, cuando este sistema se ve colapsado por radicales libres, es necesario recurrir a la utilización de antioxidantes exógenos, para prevenir sus efectos (Poljsak et al. 2013). Estos antioxidantes pueden ser sintéticos como de origen natural (Poljsak et al. 2013).

Importancia de los productos naturales y su potencial en la industria farmacéutica

A lo largo de toda nuestra historia, la importancia de los productos naturales para la medicina y salud humana es innegable, puesto que durante cientos de años, fueron el único medio para tratar lesiones y enfermedades (Solecki 1975). Existen numerosos registros que datan desde épocas anteriores a Cristo, en donde se evidencia el uso de productos de origen natural para el tratamiento de afecciones de distinta naturaleza (Cragg & Newman 2005).

Actualmente, los productos naturales siguen proporcionando una diversidad estructural única en comparación con la química combinatoria estándar, por lo que representan una gran oportunidad para el descubrimiento de nuevos compuestos medicinales, sobre todo considerando que más del 95% de toda la biodiversidad a nivel mundial aún no ha sido evaluada para ninguna actividad biológica (David et al. 2014; Días et al. 2012). En adición a lo anterior, los productos naturales tienen una probabilidad de ser exitosos muy superior a los compuestos sintéticos, lo que se debe a su alta complejidad estructural y potencia biológica. Además, estos compuestos pueden ser utilizados para identificar nuevas dianas y vías de señalización de distintas enfermedades (Lam 2007). Recientemente, se ha recobrado el interés por el uso de compuestos de origen natural, debido a que los métodos alternativos han presentado dificultades en el descubrimiento de compuestos útiles en áreas terapéuticas clave, como la inmunosupresión, los trastornos metabólicos y la neuroprotección (Lahlou 2013).

Las investigaciones actuales que utilizan productos naturales, se centran principalmente en dilucidar las estructuras responsables del efecto terapéutico de estos, para posteriormente, utilizar estas estructuras en el desarrollo de fármacos (Atanasov et al. 2021; Beutler 2019; Lahlou 2007). Es por esto, que resulta evidente que el desarrollo de fármacos y nutraceúticos a partir de productos naturales es un campo con bastante proyección. Dado lo anterior, algunos organismos a destacar por su gran potencial de cara al desarrollo de fármacos, son los hongos.

Hongos como fuente de compuestos bioactivos

Los hongos son microorganismos eucariontes con una nutrición osmoheterótrofa, es decir, obtienen su alimento absorbiendo sustancias orgánicas disueltas a través de su superficie celular (Cepero et al. 2012). Dentro de este grupo existe una gran variedad de organismos que pueden ser miceliales o unicelulares y que pertenecen a lo que hoy se conoce como el reino Mycetozoa, el que está compuesto por 9 phylum, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Kickxellomycota, Entomophthoromycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (Raghukumar 2017).

Este grupo es indispensable para el funcionamiento de los ecosistemas, pues desempeñan varios papeles relevantes, como saprófitos, descomponiendo la materia orgánica y participando en el reciclaje de esta; como mutualistas, viviendo en asociación con plantas y bacterias (micorrizas y líquenes); y siendo parásitos de otros organismos (Arnolds 1992; Dighton 2003). Sin embargo, a pesar de su gran importancia, se sabe relativamente poco acerca de su diversidad y ecología. Actualmente, se han descrito aproximadamente 120000 especies de las 3800000 que podrían existir (Hawksworth & Lücking 2017).

Los macrohongos, son un grupo parafilético que incluye representantes del phylum Basidiomycota y Ascomycota. La principal característica que tienen en común estos organismos, es que fructifican generando grandes esporocarpos morfológicamente muy diversos, que pueden apreciarse a simple vista (Lu et al. 2020; Niego et al. 2021).

Existen aproximadamente 14000 especies de macrohongos identificadas a nivel mundial, de las cuales, 2000 han sido caracterizadas como comestibles y/o medicinales (Lu et al. 2020). De entre estas especies, al menos 270 han sido investigadas como fuente de importantes metabolitos secundarios y por sus posibles aplicaciones medicinales (Niego et al. 2021).

En cuanto a la composición química de estos hongos, aproximadamente el 90% del peso fresco de los cuerpos fructíferos está representado por agua. En cambio, si

consideráramos únicamente la materia seca, los componentes mayoritarios son los carbohidratos (50-65%), seguidos por las proteínas (19-35%) y finalmente por un bajo porcentaje de lípidos (2-6%)(Wang et al. 2014). Además, de los componentes antes mencionados, estos organismos también producen una gran variedad de compuestos con efectos farmacológicos, entre los que se encuentran polisacáridos, ácidos grasos insaturados, proteínas biológicamente activas, compuestos fenólicos, vitaminas, terpenoides, ergosteroles y compuestos orgánicos volátiles (Elsayed et al. 2014; Lu et al. 2020).

En esta línea, existen numerosas investigaciones que han demostrado el potencial farmacológico que tienen los compuestos fúngicos, llegando a ser considerados por algunos científicos como la panacea para una gran variedad de enfermedades como cánceres, desórdenes inmunológicos y enfermedades neurodegenerativas (Wasser & Weis 1999).

Compuestos fúngicos en neuroprotección

El potencial medicinal de estos organismos para hacer frente a enfermedades neurodegenerativas está bastante documentado (Bills & Gloer 2016; Ma et al. 2018; Phan et al. 2015; Yadav et al. 2020)

Se ha informado que los extractos en butanol de *Cordyceps cicadae*, un hongo medicinal usado tradicionalmente desde el siglo V a.c. (Li et al. 2019), tienen una fuerte actividad neuroprotectora frente al daño inducido por glutamato en células PC-12, mostrando un 35,1% de aumento en la viabilidad celular, un 36,6% de inhibición de la enzima lactasa deshidrogenasa y una reducción de un 15,8% de la apoptosis celular, a una concentración de 200 µg/ml (Wang et al. 2018). En adición a esto, *Cordyceps militaris*, otro hongo del mismo género, contiene un compuesto químico descrito como cordicepina capaz de mejorar las deficiencias locomotoras de ratones con Parkinson y proteger a las neuronas dopaminérgicas del daño inflamatorio inducido por LPS (Sun et al. 2020).

Por otra parte, se ha reportado que el micelio de *Hericiium erinaceus*, un hongo comestible muy conocido en la medicina tradicional china (Khan et al. 2013),

presentó una fuerte actividad antioxidante, alcanzando un 90% de inhibición a una concentración de 1000 µg/ml en el ensayo DPPH, esta actividad fue muy similar a la del ácido ascórbico, él que presentó un 100% de inhibición a la misma concentración. En adición a lo anterior, en esta investigación se demostró que el micelio de este hongo es capaz de reducir los daños inducidos por MPP⁺ en células PC-12, incrementando la viabilidad celular hasta en un 40%. Además de esto, también se evidenció la capacidad de este hongo para recuperar los niveles de dopamina en ratones tratados con MPTP, logrando incrementar los valores de dopamina desde 130 ng/g hasta los 240 ng/g en el tratamiento con 1g/kg de peso corporal (Yang et al., 2020). Por otro lado, también se ha informado que los extractos acuosos de este hongo, fueron capaces de revertir la reducción de la viabilidad celular (en aproximadamente un 30%), atenuaron en gran medida los daños en la membrana mitocondrial, redujeron la sobrecarga de Ca⁺² (en un 100%) y disminuyeron un 90 % los niveles de ROS, inducidos por glutamato en células PC-12. Además, este extracto también mejoró los movimientos, tiempo de resistencia y de escape de ratones con Alzheimer (Zhang et al. 2016).

El compuesto fenólico inoscavin A aislado de *Inonotus obliquos*, presentó una fuerte actividad neuroprotectora frente al daño inducido por H₂O₂ en células SH-SY5Y, logrando aumentar la viabilidad celular a valores de 67,76 ± 1,22; 76,39 ± 1,79; 79,56 ± 0,92; 88,49 ± 1,46 y 94,60 ± 2,80% utilizando concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 µM respectivamente (Wei et al. 2022). Otros compuestos aislados del mismo hongo, conocidos como inonotsutriol A e inotolactone E, también fueron capaces de aumentar la viabilidad celular en células SH-SY5Y tratadas con H₂O₂, este aumento fue de un 20% para el inonotsutriol A y de un 16,6% para la inotolactone E, ambos a una concentración de 25µM (Zou et al. 2020a, 2020b).

El meroterpenoide bis-2-hidroxi-1-methoxi neogrifolin aislado desde un extracto en cloroformo de *Albatrellus yasudae*, presentó una fuerte actividad antiagregación del Aβ, alcanzando el IC₅₀ a una concentración de 12,3 µM (Akiba et al. 2020). Otros compuestos con propiedades antineurodegenerativas son el antroquinonol aislado de *Antrodia cinnamomea*, y la fomannoxina (Fx) proveniente de *Aleurodiscus*

vitellinus. El consumo de antroquinonol durante dos meses, mejoró notablemente el aprendizaje y memoria de ratones mutantes APP en la prueba del laberinto de Morris, además de reducir los niveles de deposición de A β y astrogliosis en el cerebro de estos individuos (Chang et al. 2015). En tanto, la Fx mostró un potente efecto neuroprotector, pues fue capaz de incrementar la viabilidad celular y la frecuencia de los transitorios de Ca⁺² citosólico hasta alcanzar valores similares al control, en células PC-12 que fueron sometidas al daño inducido por A β , utilizando una concentración de Fx de 10⁻⁵ M (González-Ramírez et al. 2018).

Aparte de estas investigaciones, existe un número considerable de otros estudios de características similares, lo que deja de manifiesto que estos organismos constituyen una vasta fuente de nuevos y potentes productos farmacéuticos, aún por explotar (Wasser 2011).

Polisacáridos fúngicos y su uso en neuroprotección

Los polisacáridos son una de las biomoléculas naturales más abundantes e importantes de la biosfera, estando presente en todos los organismos vivos, en los que desempeñan una función estructural principalmente (Glazer & Nikaido 2007; Pontón 2008). Se cree que estos compuestos son capaces de interactuar con distintas enzimas y receptores de la superficie celular, interviniendo así en numerosos procesos biológicos, como la interacción celular, el desarrollo embrionario y la modulación del sistema inmune (Liu et al. 2015; Smelcerovic et al. 2008).

Los polisacáridos están formados por unidades de monosacáridos unidas mediante enlaces glucosídicos, diferenciándose entre sí por la unidad y grado de ramificación, el tipo de conexión entre los monosacáridos y la longitud de sus cadenas (Chaplin & Kennedy 1994). Pueden dividirse en dos clases de acuerdo al tipo de monosacáridos que presentan en su estructura: Los homopolisacáridos que contienen un solo tipo de monosacárido y los heteropolisacáridos que contienen dos o más monosacáridos distintos (Mérillon & Ramawat 2015).

Los polisacáridos de origen natural varían notablemente en cuanto a su estructura química, peso molecular y naturaleza iónica. Esto depende en gran medida del organismo en el que se producen, y de los factores bióticos y abióticos del ambiente que afectan a este, como, por ejemplo, la temperatura, el pH, la exposición a luz solar, la composición química del sustrato, entre otros (Petry et al. 2000; Wang et al. 2016; Yang & Kong 2013). Esta variabilidad otorga a los polisacáridos diferentes propiedades fisicoquímicas, lo que contribuye con su amplia gama de propiedades biológicas. Desde el punto de vista farmacológico, estos compuestos poseen muchas características destacables, como baja toxicidad, biocompatibilidad, bioadhesión, estabilidad, bajo coste, naturaleza hidrofílica y disponibilidad de sitios para modificación química (Mizrahy & Peer 2012).

Los polisacáridos fúngicos pueden ser aislados desde tres fuentes principalmente, cuerpo fructífero, micelio o medio de cultivo (Mérillon & Ramawat 2015). Están compuestos principalmente por glucanos, que son polímeros formados por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces α o β . A su vez, estos glucanos pueden unirse a otros azúcares dando origen a los heteroglicanos, los que pueden clasificarse en galactanos, fucanos, xilanos y mananos dependiendo del azúcar añadido a su cadena principal (Pandya et al. 2019).

En algunas especies de hongos, los polisacáridos pueden unirse a residuos de proteínas o péptidos formando lo que se conoce como complejo polisacárido-proteína, el que se ha demostrado exhibe una mayor bioactividad (Pandya et al. 2019).

Otro atributo relevante de los polisacáridos es el grado de sulfatación presente en su estructura, pues numerosos estudios científicos han demostrado que los polisacáridos que presentan un mayor número de grupos sulfatos en sus cadenas, poseen mayores actividades biológicas, las que se deben al papel regulatorio que desempeñan estos compuestos en el organismo, el que se desarrolla mediante la unión a múltiples receptores de la superficie celular y la estimulación de diferentes vías de señalización (Huang et al. 2019).

Finalmente, es indispensable conocer la estructura de los polisacáridos investigados, pues además de los factores antes mencionados, la estructura química y su conformación tridimensional están estrechamente relacionadas con su bioactividad (Ribeiro et al. 2015).

Existen numerosas evidencias acerca del potencial que tienen los polisacáridos fúngicos para hacer frente a las enfermedades neurodegenerativas (Sun et al. 2017; Xiong et al. 2016; Zhang et al. 2015; Zhang et al. 2022). El mecanismo de acción de estos compuestos, está relacionado con la activación y promoción indirecta del sistema inmune y algunas vías de señalización como Nrf2, PI3K/Akt y Bax/Bcl-2 (Kozarski et al. 2014). Los polisacáridos fúngicos a nivel cerebral reducen los niveles de estrés oxidativo a nivel cerebral, estimulan el crecimiento de neuritas en las células neuronales, aumentan la supervivencia de las neuronas, antagonizan los iones de calcio; eliminan radicales libres y estabilizan las membranas celulares (Gao et al. 2018; Ma et al. 2021).

Hericium erinaceus, es un hongo comestible de carne blanca algo coriácea muy apreciado gastronómicamente en China y Japón, conocido como melena de león (Khan et al. 2013). Su extracto de polisacáridos (HePs), mostró una fuerte actividad antioxidante en el ensayo DPPH, alcanzando valores de captación de radicales libres de $97 \pm 1.2\%$ a una concentración de 2 mg/ml. Directamente relacionado con esto, este extracto también fue capaz de disminuir los niveles de ROS intracelulares desde un 80%, en las células PC-12 tratadas con $1.2\mu\text{M}$ de $\text{A}\beta$, hasta un 58% en las que fueron coincubadas con HePs. En adición a lo anterior, HePs aumentó notablemente la viabilidad celular (desde un 5% a un 69%) y redujo los niveles de apoptosis en células sometidas al mismo agente neurotóxico (Cheng et al. 2016).

En otra investigación, se demostró que los polisacáridos de *Inonotus obliquos* (IoPs) poseen actividad neuroprotectora frente al daño inducido por glutamato (L-Glu) en células HT22, pues la coincubación con IoPs mejoró la viabilidad celular (+19.6%), redujo la tasa de apoptosis (-15.6%), restauró el potencial de la membrana mitocondrial, suprimió la acumulación excesiva de ROS (-19.4%) y disminuyó la actividad de la caspasa 3 (-25.2%) (Han et al., 2019). Además, el tratamiento con

loPs mejoró notablemente los tiempos de ejecución en distintas pruebas de ratones con Alzheimer y redujo el grado de deposición de A β ₁₋₄₂ y P-Tau (Han et al. 2019).

Por otra parte, un estudio mostró que el extracto de polisacáridos de una cepa iraní de la especie *Agaricus subrufescens*, posee actividad anti colinesterasa, alcanzando el IC₅₀ a una concentración de 154.6 μ g/ml. Agregado a lo anterior, en este estudio también se observó actividad antiagregatoria del A β , pues el extracto disminuyó la agregación de este agente en un 14% a una concentración de 50 μ g/ml, resultados similares a los mostrados por el donepezilo (control positivo) a una concentración de 10 μ g/ml; actividad antioxidante (IC₅₀= 330.0 \pm 0.2 μ g/ml); y aumento de la viabilidad celular (+6.5%) en las células sometidas al daño inducido por este mismo agente neurodegenerativo (Asker et al. 2014).

Otros estudios, han evidenciado que los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* (GIPs) son capaces de proteger frente a la apoptosis inducida por el daño oxidativo inducido por H₂O₂. Este agente neurotóxico provocó un incremento de más de un 400% (80% de células apoptóticas) en el ratio apoptótico, luego de 12 horas de incubación. Este incremento fue contrarrestado por el tratamiento con GIPs de manera dosis dependiente, siendo el tratamiento con un 5% de este extracto, el que presentó la mayor inhibición, llevando los niveles apoptóticos hasta rangos similares al control (20% de células apoptóticas) (Sun et al. 2017).

Como estas, existen numerosas investigaciones acerca del uso que tienen los polisacáridos fúngicos en la neuroprotección, lo que evidencia el interés, la necesidad y el potencial de seguir investigando con respecto a esta materia.

El género *Cyttaria* Berk

El género *Cyttaria*, pertenece a la División Ascomycota, clase Leotiomycetes, orden Cyttariales y familia Cyttariaceae. Este género cuenta con un total de 11 especies descritas a nivel mundial, siete de las cuales son procedentes de Sudamérica y cuatro de Oceanía (Schmeda-Hirschmann et al. 1996). En Chile, los integrantes de este género son conocidos comúnmente como digüeñes y se distribuyen desde la zona centro-sur hasta la Patagonia, siendo parásitos exclusivos del género

Nothofagus. Existen 7 especies descritas en el país, *C. exigua* Gamundí, *C. hookeri* Berk, *C. johowii* Espinosa, *C. darwinii* Berk, *C. harioti* E. Fish, *C. espinosae* Lloyd y *C. berteroi* Berk, las que se caracterizan por sus estromas globosos y por ser todas comestibles (Salazar 2020).

Cyttaria espinosae, conocido comúnmente como digüeñe, presenta estromas carnosos, globosos y de coloración anaranjado-ocráceo una vez maduros, que pueden alcanzar un diámetro de 1 a 5 centímetros (Figura 2a y 2b). Al igual que *C. berteroi* se distribuye entre Valparaíso y la región de Los Lagos, estando asociado a *N. glauca*, *N. obliqua*, *N. dombeyi*, *N. macrocarpa* y *N. alpina* (Peterson & Pfister 2010; Salazar 2020).



Figura 1. a) *Cyttaria espinosae* sobre rama de *N.obliqua*. b) Estromas de *C.espinosae* (Salazar 2019).

La mayor parte de las investigaciones relacionadas con el género *Cyttaria*, están referidas a su taxonomía, evolución y ecología. Mientras los pocos estudios existentes con respecto a sus características químicas, se enfocan principalmente en sus parámetros nutricionales, actividad citotóxica y capacidad antioxidante (Salazar 2019), sin considerar las potenciales aplicaciones de las especies de este género frente a las enfermedades neurodegenerativas. Por este motivo, es fundamental comprobar el potencial neuroprotector de estos compuestos frente a las enfermedades neurodegenerativas y caracterizarlos químicamente, esto con la finalidad de relacionar sus características químicas con la bioactividad que presentan. Además, considerando la importancia que tiene este género de hongos

en nuestro país y el amplio abanico de evidencias existente con respecto al potencial farmacológico de los polisacáridos fúngicos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, es que surgen las siguientes preguntas de investigación:

1° ¿Los polisacáridos de *Cyttaria espinosae*, ejercerán actividad neuroprotectora, atenuando la toxicidad inducida por los oligómeros solubles del péptido β -amiloide?

2° ¿Los polisacáridos de *Cyttaria espinosae* presentarán actividad antioxidante?

HIPÓTESIS 1

Los polisacáridos extraídos desde estromas de la especie *C. espinosae* presentan actividad neuroprotectora, atenuando significativamente la toxicidad producida por los oligómeros solubles del péptido β -amiloide de manera dosis dependiente.

HIPÓTESIS 2

Los polisacáridos extraídos desde estromas de la especie *C. espinosae* presentan actividad antioxidante la que está relacionada a sus características químicas.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antioxidante y neuroprotector del extracto de polisacáridos obtenido desde estromas de *Cyttaria espinosae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar químicamente el extracto de polisacáridos purificado obtenido de *C. espinosae*.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto de polisacáridos de *C. espinosae*.
- Determinar el potencial neuroprotector del extracto de polisacáridos obtenido de *C. espinosae* en la línea celular neuronal PC-12.

MATERIALES Y MÉTODOS

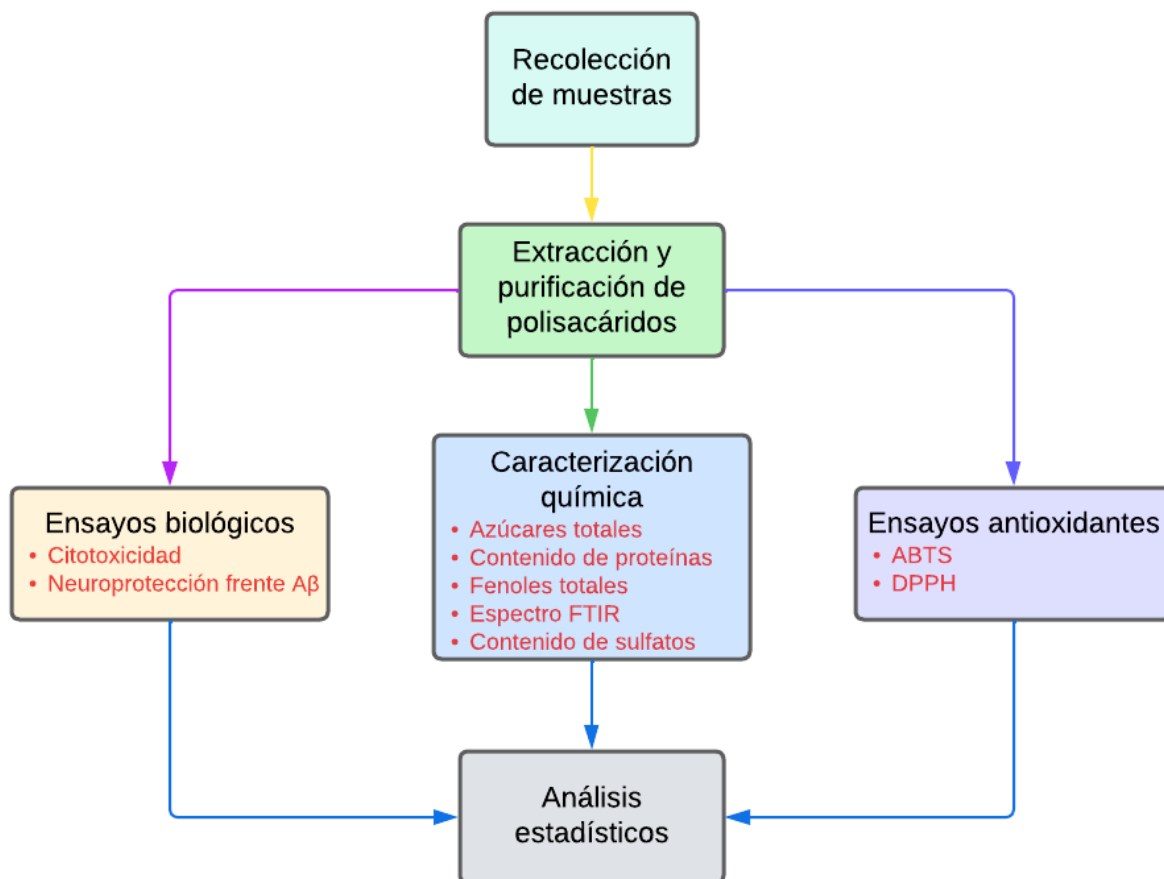


Figura 2. Diagrama de flujo que muestra el proceso seguido en la metodología.

Recolección de muestras

Los estromas de *C. spinosae* fueron recolectados durante la temporada primavera-verano de los años 2017-2018, en la zona de Nahuelbuta (VIII región), específicamente en la localidad de Palos Quemados. Después de ser recolectados, los estromas fueron trasladados a las instalaciones del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción.

Los caracteres macroscópicos de los estromas fueron observados y documentados en campo, mediante la toma de fotografías con una cámara réflex canon modelo T6 en el lugar de recolección, y en el laboratorio, haciendo uso de una lupa estereoscópica. Para realizar la determinación taxonómica de los especímenes recolectados, se observaron los caracteres microscópicos de estas especies,

haciendo uso de un microscopio óptico trinocular AmScope modelo T670B, sobre secciones de material fresco y/o rehidratado montado en una mezcla de agua, KOH al 5%, floxina y reactivo de Melzer (Gamundi 1971).

Luego de la identificación de la especie, los estromas de *Cyttaria espinosae.*, se rotularon y congelaron a -20°C. Posterior a esto, fueron liofilizados durante 48 h en un liofilizador automático modelo CHRIST Alpha 2-4 LO plus y almacenados a -20°C para su posterior utilización.

Extracción y purificación de polisacáridos

Las muestras liofilizadas de *C. espinosae.* fueron trituradas en una picadora Moulinex DP800 y se determinó la masa inicial.

Posteriormente, la extracción de polisacáridos se realizó de acuerdo al método descrito por Figueroa et al. 2020, con algunas modificaciones. Previo a la extracción, los pigmentos, compuestos fenólicos y lípidos de las muestras fueron eliminadas en una solución de EtOH al 70% durante 48 hrs con agitación constante. Luego las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 5 min y se recuperó el residuo sólido resultante, el que fue secado para su posterior utilización.

El material seco fue resuspendido en 500 ml de agua destilada y calentado a 70°C durante 1 hora. Posteriormente, esta solución fue centrifugada a 4500 rpm durante 5 min, recuperándose el sobrenadante. El procedimiento anterior fue repetido en 2 ocasiones. Luego, el sobrenadante obtenido fue concentrado en un rotavapor (IKA HB10 digital, Staufen, Germany) a 90 rpm, presión reducida y 65°C hasta reducir su volumen a 400 ml.

Después, para precipitar los polisacáridos, se agregó EtOH absoluto en una proporción 1:1 a los 400 ml de sobrenadante, y se mantuvo a 4°C durante 24 hrs. Luego, la muestra fue centrifugada a 4500 rpm durante 15 min, recolectándose los polisacáridos crudos (PCCE), los que fueron liofilizados (en un liofilizador automático modelo CHRIST Alpha 2-4 LO plus) y almacenados a -20°C para su posterior uso.

Para purificar los polisacáridos, los PCCE fueron disueltos en una solución 4,0 M de NaCl y calentados durante 1 hora, luego se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos. Seguidamente, al sobrenadante obtenido se agregó etanol frío en una proporción 1:1 y se dejó precipitar durante 24 hrs. Luego, fue centrifugado a 4500 rpm durante 15min. El precipitado obtenido fue introducido en una membrana de diálisis MEMBRA-CEL MD44, la que fue sumergida en una solución 2,0 M de NaCl, y se dejó en agitación constante durante 48 hrs, realizando dos cambios de agua destilada por día. Pasadas las 48 hrs, el contenido de la membrana fue precipitado con etanol absoluto en una proporción 1:1 y fue dejado a 4°C, durante 24hrs. Finalmente, fue centrifugado a 4500 rpm por 15 min y el precipitado fue colectado y liofilizado, obteniendo así el extracto de polisacáridos purificados por diálisis (PsCe).

Caracterización química del extracto

FTIR

Se utilizó el equipo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier marca Shimadzu modelo IRAffinity-1S con accesorio ATR modelo QATR 10. La espectroscopia de absorción infrarroja de los polisacáridos se midió en la región 4000-400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 60 scan. Se graficó el espectro con el software OriginPro 2023 y se utilizó el algoritmo Savitzky-Golay con 30 puntos de suavizado.

Determinación del contenido de azúcares totales

Se utilizó el método de Morris 1948, con modificaciones, en primer lugar, se preparó una solución de antrona a una concentración de 2 mg/ml en H_2SO_4 . Posteriormente, se preparó una solución de PsCe 10 mg/ml en H_2O , la que fue diluida 100 veces. Para la curva de calibrado, se utilizó glucosa como estándar y se realizaron diluciones partiendo desde los 200 $\mu\text{g/ml}$ hasta llegar a 10 $\mu\text{g/ml}$ en H_2O . Luego se tomaron 200 μl de cada muestra, se les agregó 1 ml de la solución de antrona y se hidrolizaron a 100°C durante 15 min. Finalmente, se depositaron 200 μl de cada muestra en una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096 y se midió la absorbancia

a 620 nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación del contenido de sulfatos

Se preparó una solución de polisacárido (2 mg / ml en 0.5 N HCl) en un vial cerrado y se hidrolizó 1ml de esta solución a 100 °C durante 1 h. Después de evaporar el disolvente en el vial, se agregó 0.5 ml de agua, 2 ml de etanol al 95%, 1 ml de solución de BaCl₂ (0,1 mM) y 1,5 ml de solución de rodizonato sódico (50 µg/ml de rodizonato más 1 mg / ml de ácido L-ascórbico). Posteriormente, se mezcló y se almacenó en oscuridad y temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, se depositaron 200 µl de esta mezcla en una microplaca (SPL 96 Well Plate Type 35096) y se midió la absorbancia a 520 nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™. La concentración de sulfato se determinó utilizando una curva estándar derivada de concentraciones conocidas de sulfato de potasio respecto a la metodología de Terho et al. 1971, con pequeñas modificaciones.

Determinación del contenido de fenoles totales

Se utilizó el método colorimétrico de Folin & Ciocalteu 1927. En primer lugar, se preparó una solución de polisacárido 10 mg/ml en H₂O. Posteriormente, se preparó carbonato de calcio a una concentración de 200 mg/ml. Para la curva de calibración, se utilizó ácido gálico en un rango de concentración de 200 µg/ml a 10 µg/ml en H₂O. Una vez preparados los reactivos se mezclaron 400 µl de agua destilada, 20 µl de muestra y 40 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu con la ayuda de un vortex V1 plus (Boeco, Hamburg, Alemania) y se dejó reposar por 5 minutos. Luego, se añadieron 200 µl de carbonato de calcio y se dejó reaccionar por 1 hora en oscuridad. Finalmente, se cargaron 200 µl de cada muestra en microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096 y se midió la absorbancia a 765 nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™.

Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación del contenido de proteínas del extracto se realizó utilizando un lector de microplacas Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan Group Ltd., Männedorf,

Suiza). Para ello se preparó una solución de polisacáridos 10 mg/ml en DMSO, de la que se tomó 1 µl y se depositó en un pocillo de la placa NanoQuant (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Como blanco se utilizó DMSO. Finalmente, el contenido de proteínas se obtuvo utilizando la ecuación de la recta y el valor de absorbancia obtenido.

Actividad antioxidante

Extractos para ensayos antioxidantes

Las soluciones utilizadas en los ensayos antioxidantes, se prepararon 24 hrs antes de la realización de cada ensayo. Para la solución stock de polisacáridos, se tomaron 10 mg de PsCe y se disolvieron en 1 ml de DMSO. Posteriormente, con la finalidad de facilitar la solubilización de los polisacáridos, la solución se sónico durante 40 min a 40°C en un equipo ultrasónico Machtig PS-30A. Posteriormente, a partir de la solución stock se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones que fueron puestas a prueba en los ensayos (5000, 2500, 1250, 625 y 312,5 µg/ml).

Como control se utilizó ácido ascórbico, para preparar el stock se tomaron 10 mg de ácido ascórbico, los que fueron disueltos en 1ml de DMSO. Posteriormente, a partir de este stock se realizaron diluciones seriadas de la misma forma que para los polisacáridos.

Para la realización de las curvas de TEAC, se elaboró un stock de Trolox 1mg/ml en etanol, a partir del cual se prepararon las concentraciones utilizadas para la curva de ABTS (100, 80, 60, 40, 20 µg/ml) y DPPH (10, 8, 6, 4, 2 µg/ml).

Ensayo ABTS⁺

El ensayo ABTS⁺ se realizó mediante el procedimiento descrito por Re et al. 1999, con algunas modificaciones de Crisóstomo-Ayala et al. 2021. En primer lugar, se prepararon 50 ml de ABTS 7mM (2,2-azino-bis-3-etilbenzoazolina-6-sulfonato) y persulfato potásico 2.45mM (K₂S₂O₈). Posteriormente ambos stocks fueron mezclados en partes iguales y la solución resultante fue mantenida en oscuridad por 16 h a temperatura ambiente, obteniéndose así el radical catión ABTS⁺. La

solución concentrada de ABTS⁺ fue diluida en una proporción de 1:14 (ABTS⁺/ agua destilada) con la finalidad de obtener un valor de absorbancia de 0.70 ± 0.01 unidades a 734nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™.

Finalmente, se vertieron 20 µl de muestra y 180 µl de radical ABTS⁺ en una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096, se dejó incubar por 30 min y se midió la absorbancia a 734nm en un lector de microplaca BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad antioxidante fue expresada como % de inhibición, el que fue calculado a partir de la fórmula descrita por Masek et al. 2020 :

$$\text{Inhibición [\%]} = [(Ac - Am) / Ac] \times 100$$

donde Ac es la absorbancia control y Am es la absorbancia de la muestra.

Ensayo DPPH

El ensayo de eliminación de radicales DPPH se realizó mediante el procedimiento descrito por Qian et al. 2020, con algunas modificaciones. En primer lugar, se disolvió el DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) en metanol a una concentración de 0.1 mM. Para la reacción, se mezclaron 100µl de cada una de las muestras y 100µl de la solución de DPPH en una microplaca SPL 96 Well Plate Type 35096 y se dejó incubar por 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 517nm en el lector de microplaca BioTek Epoch™. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado. La actividad de eliminación de radicales fue expresada como % de inhibición, los cuales fueron calculados a partir de la fórmula descrita por Masek et al. 2020.

$$\text{Inhibición [\%]} = [(Ac - Am) / Ac] \times 100$$

donde Ac es la absorbancia control y Am es la absorbancia de la muestra.

Ensayos biológicos

Células PC12

Las células PC-12 se mantuvieron en un medio de cultivo DMEM complementado con suero bovino fetal (5%), suero de caballo (5%), penicilina y estreptomina (1%). Las células se mantuvieron en una incubadora termorregulada a 37°C con 5% de CO₂ y se utilizaron después de alcanzar ~80% de confluencia.

Ensayo de citotoxicidad (MTT)

Las células PC-12 fueron tratadas durante 24 hrs con distintas concentraciones de PsCe (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml), DMSO (1 µl) y FCCP (1 µM), este último fue utilizado como control de toxicidad celular. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo de las células, se agregaron 100 µl por pocillo de una solución de MTT (3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 1 mg/ml en DPBS 1X y se dejó incubar por 40 min a 37°C. Luego, los productos de formazán generados en las células fueron solubilizados agregando 100 µL de isopropanol por pocillo e incubándolos durante 25 min. Finalmente, la absorbancia se midió en el lector de multiplacas NOVOstar (BGM Labtech, Offenburg, Alemania) a una longitud de onda de 570 nm.

Agregación de oligómeros solubles del péptido Aβ₁₋₄₀

El péptido Aβ₁₋₄₀ (GenicBio, Shanghai, China) fue reconstituido en DMSO a una concentración de 2,3 mM. Desde ese stock se tomó una alícuota de 2 µL y se disolvió en PBS estéril (Phosphate-Buffered Saline, Corning, Manassas, VA, USA) hasta alcanzar una concentración de 80 µM. Esta solución fue sometida a agitación vertical (500 rpm, 4h, temperatura ambiente) para la formación de oligómeros.

Ensayo de neuroprotección frente a la toxicidad generada por Aβ (MTT)

Las células PC-12 fueron tratadas durante 24 h con Aβ (1 µM), PsCe (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml), FCCP (1 µM) y Aβ+PsCe (mismas concentraciones usadas con anterioridad). Posteriormente, se utilizó el mismo procedimiento utilizado para el ensayo de citotoxicidad.

Análisis estadísticos

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de tres experimentos (n=3). Previo a los análisis estadísticos se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Para comparar las diferencias entre los grupos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía o su variante no paramétrica Kruskal-Wallis en caso de no cumplir con los supuestos. Cuando existieron diferencias significativas entre los grupos, se realizó una prueba post-hoc HSD de Tukey para comparar las medias de todos ellos, considerando diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism, CA, USA)

RESULTADOS

A partir de 74,41 g de estromas liofilizados de *Cyttaria espinosae*, se obtuvieron 6,48 g de extracto de polisacáridos dializados (PsCe), lo que representa un rendimiento del 8,71%.

Caracterización química del extracto

FTIR

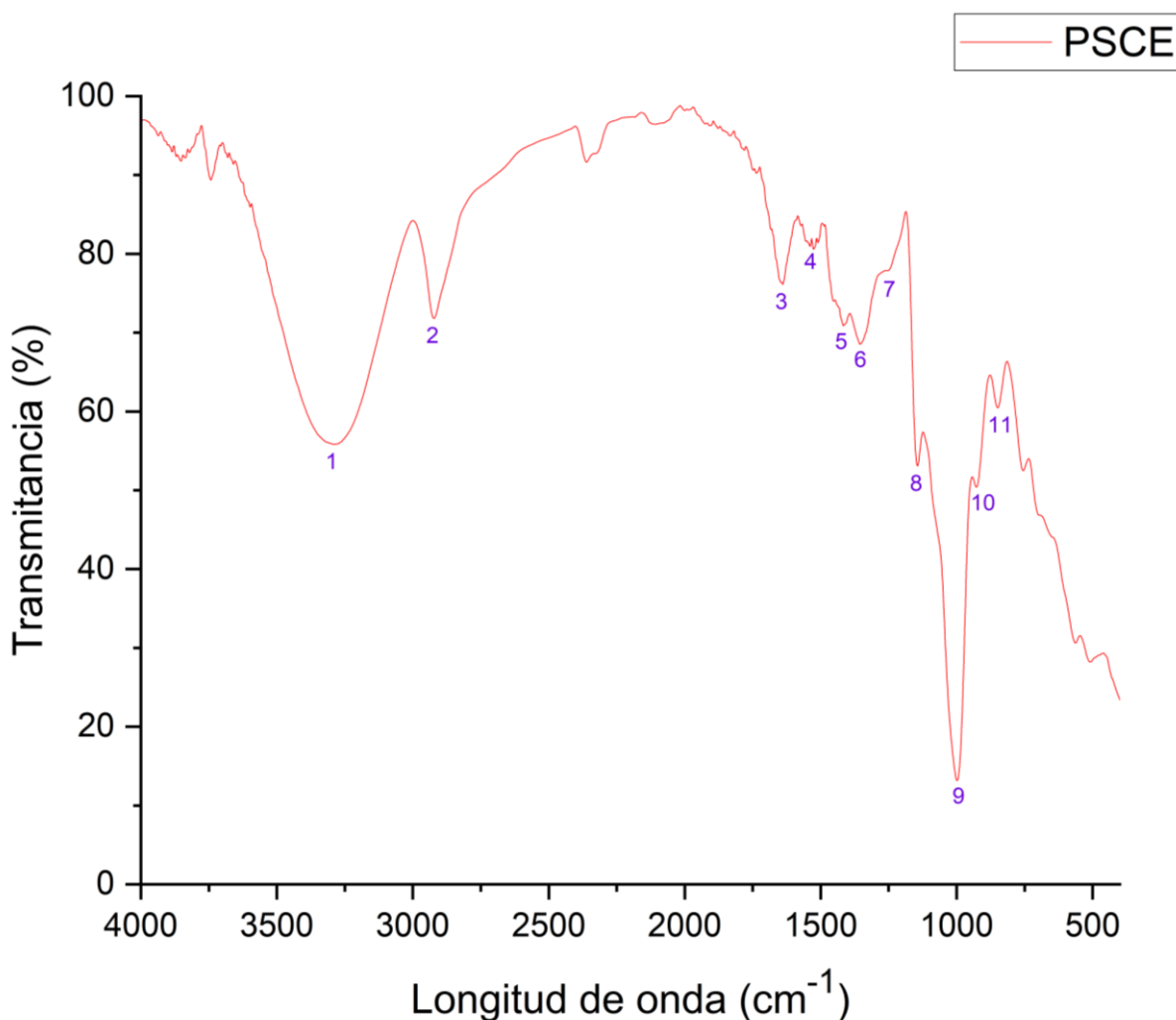


Figura 3. Espectro del extracto de polisacáridos de *Cyttaria espinosae* obtenido mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.

Los datos del espectro FTIR muestran los patrones típicos de los carbohidratos (He et al. 2012). En primer lugar, la banda ancha ubicada en torno a 3290 cm⁻¹

representa una vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (He et al., 2012; Stuart, 2005). Mientras que la banda débil observada en torno a 2926 cm^{-1} se debe al estiramiento C-H (Stuart 2005). Por otra parte, las bandas a 1645 y 1525 cm^{-1} , se deben al estiramiento del enlace C=O (Barth 2007; Stuart 2005). Seguido por las bandas observadas en torno a 1415 y 1357 cm^{-1} que se atribuyen a la flexión de los enlaces O-H (Hong et al., 2021). La presencia de una ligera banda en torno a 1253 cm^{-1} , puede deberse a la presencia de estiramiento S-O (Ptak et al. 2021). Mientras la banda ubicada a 1147 cm^{-1} representa el estiramiento del enlace C-O (Wiercigroch et al. 2017). La banda característica cercana a 997 cm^{-1} se debe a la presencia de enlaces glicosídicos (Hong et al. 2021; Wiercigroch et al. 2017). Finalmente, las bandas a 927 y 848 cm^{-1} indican la presencia de la configuración β y α respectivamente (Wang et al. 2022).

Contenido de azúcares

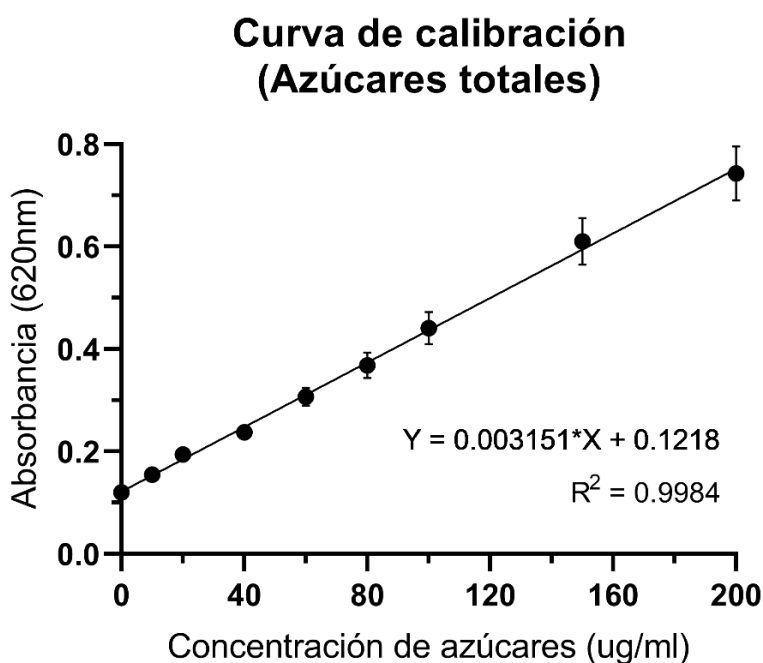


Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de azúcares. Se presenta la media \pm error estándar de 3 experimentos en conjunto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación asociado.

- Absorbancia de la muestra = 0,364

- Contenido de azúcares en 100 µg/ml de muestra = 76,86 µg/ml
- Porcentaje de azúcares en la muestra = 76.86%

Contenido de fenoles

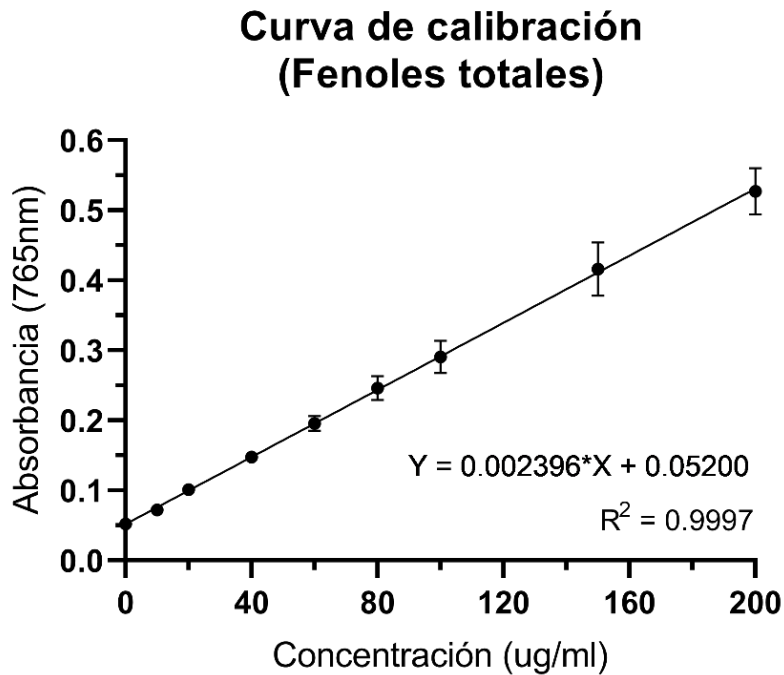


Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación de polifenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se presenta la media \pm error estándar de 3 experimentos en conjunto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación asociado.

- Absorbancia de la muestra = 0,0712
- Contenido de fenoles en 10mg/ml de muestra = 8,01 µg/ml
- Contenido de fenoles de PsCe = 0,801 mg GAE g⁻¹ PS

Contenido de proteínas

- Ecuación de la recta: $Y = 0,0316x - 0,004$
- Valor de absorbancia (muestra – blanco) = 0,039
- Contenido de proteínas en 10mg de muestra = 1,36 mg
- Porcentaje de proteínas en la muestra = 13,6%

Contenido de sulfatos

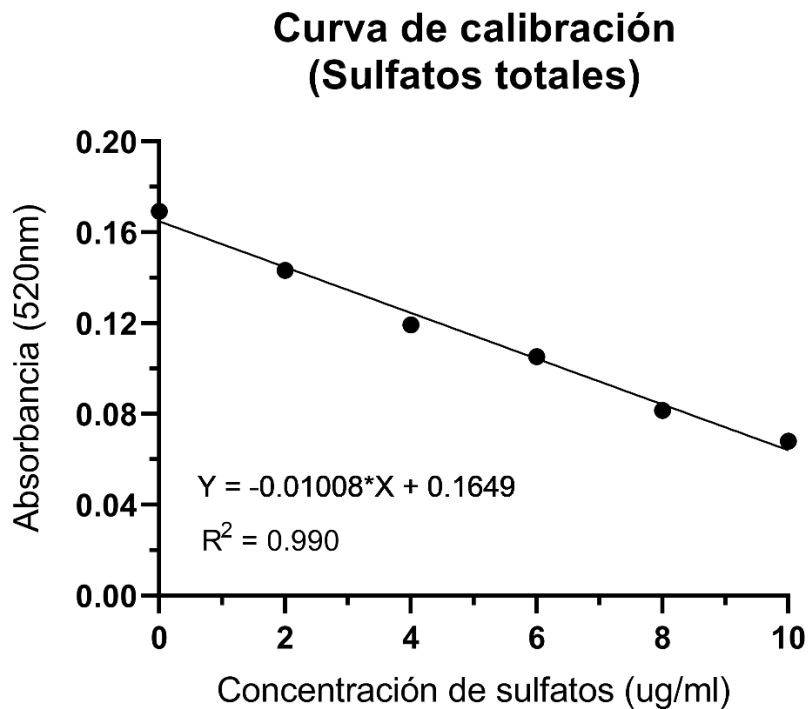


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de sulfatos usando el método de Terho et al. 1971. Se presenta la media \pm error estándar de 3 experimentos en conjunto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación asociado.

- Absorbancia de la muestra = 0,0817
- Contenido de sulfatos en 4000 $\mu\text{g/ml}$ de muestra = 8,25 $\mu\text{g/ml}$
- Porcentaje de sulfatos en la muestra = 0,21%

Ensayos antioxidantes

Ensayo de neutralización del radical (DPPH)

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es un radical libre que al ser disuelto en etanol o metanol da lugar a una solución de color violeta, cuyo rango máximo de absorción se da a los 517 nm. Este ensayo determina la capacidad antioxidante de una molécula, mediante un mecanismo de donación de átomos de hidrógeno. La donación de estos, produce una reducción de la molécula de DPPH, y con ello un cambio de color en la solución (Garcia et al. 2012; Gupta 2015).

El porcentaje de inhibición del radical DPPH exhibido por las distintas concentraciones de PsCe, mostró diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$), alcanzando un valor máximo de $32,14 \pm 1,94\%$ a una concentración de 10 mg/ml. Las concentraciones restantes de PsCe exhibieron un porcentaje de inhibición de: $24,09 \pm 0,81$ (5 mg/ml); $14,56 \pm 1,67$ (2,5 mg/ml); $12,08 \pm 1,18$ (1,25 mg/ml); $7,91 \pm 0,84$ (625 $\mu\text{g/ml}$) y $5,32 \pm 1,54\%$ (312,5 $\mu\text{g/ml}$), lo que devela una clara tendencia dependiente de la concentración (Figura 7). Por otra parte, en comparación con el control utilizado (ácido ascórbico), el porcentaje de inhibición de este radical por parte de PsCe fue considerablemente menor, puesto que el ácido ascórbico mantuvo un porcentaje de $94,77 \pm 0,49\%$ en todas las concentraciones utilizadas. Adicionalmente, para calcular el valor de TEAC, se estimó el IC_{50} de PsCe (16194 $\mu\text{g/ml}$, Figura 8A) y el IC_{50} de Trolox (0,00021 $\mu\text{mol/ml}$, Figura 8B). El valor obtenido fue de 0,0013 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS

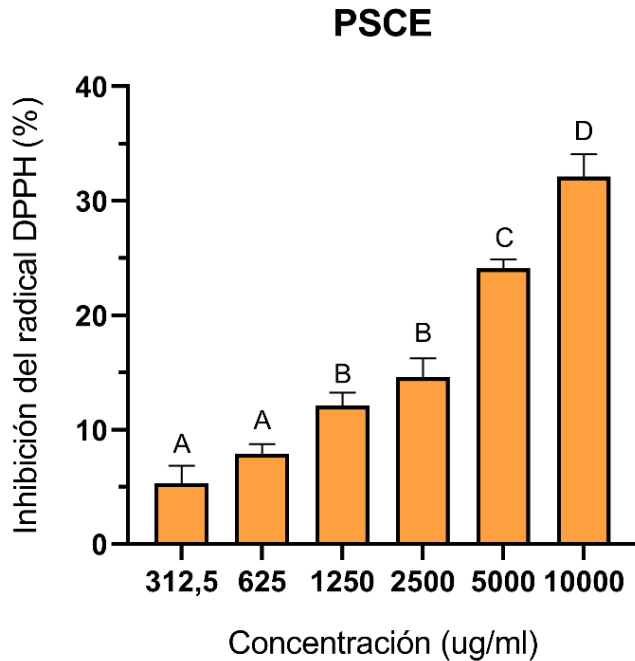
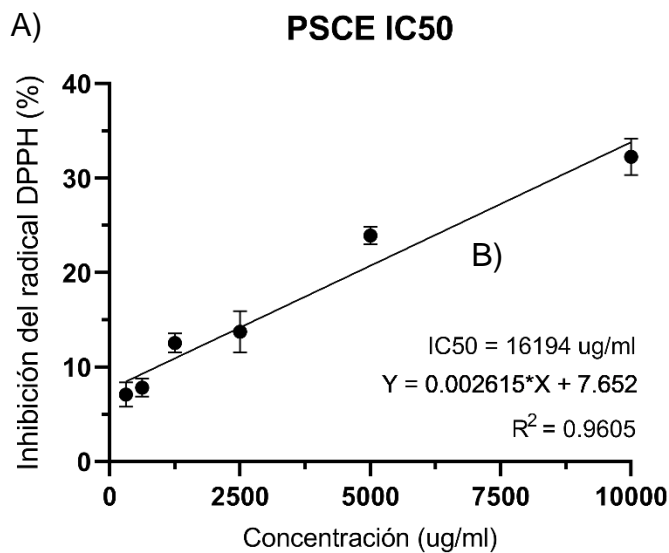


Figura 7. Porcentaje de inhibición del radical DPPH usando distintas concentraciones de PsCe. Se designaron grupos basados en las diferencias estadísticas, los que se representan con diferentes letras. Se presenta la media \pm error estándar de 3 experimentos.

Gráfico de IC₅₀ de *Cyttaria espinosae* y Trolox



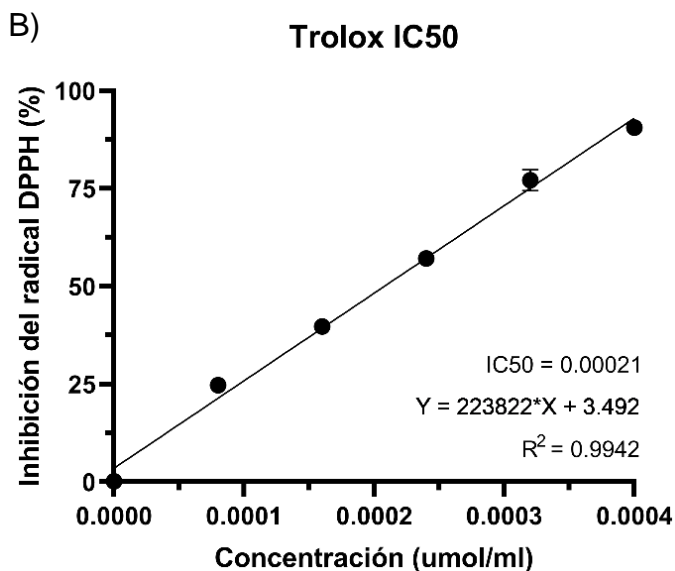


Figura 8. (A) IC_{50} de PsCe, se presenta en conjunto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación asociado. (B) IC_{50} de Trolox, se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación asociados.

Ensayo de neutralización del radical (ABTS⁺)

El ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) es un radical que presenta una coloración azul-verdosa al diluirse en agua. Es producido por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio, y su máxima absorción se da a los 734nm. Este ensayo permite determinar la capacidad antioxidante, mediante un mecanismo de transferencia de electrones, pues, los electrones donados por el agente antioxidante, reducen el radical de ABTS^{•+} a ABTS, provocando una decoloración de la solución (Munteanu & Apetrei 2021; Opitz et al. 2014; Re et al. 1999).

El porcentaje de inhibición de este radical por parte de PsCe, al igual que en el ensayo del DPPH, mostró una tendencia dependiente de la concentración, existiendo diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas ($p < 0.05$). El máximo valor de inhibición fue de $19,10 \pm 1,00\%$ y se alcanzó a una concentración de 10mg/ml. Los valores restantes fueron $10,61 \pm 0,26$ (5 mg/ml); $6,19 \pm 0,26$ (2,5 mg/ml); $4,59 \pm 0,38$ (1,25 mg/ml); $2,40 \pm 0,46$ (625 μ g/ml) y $1,80 \pm 0,33$ (312,5 μ g/ml) (Figura 9). Al igual que en el ensayo anterior, el ácido ascórbico presentó un

porcentaje de inhibición mucho mayor que PsCe, manteniéndose alrededor $100,1 \pm 0,19\%$ en todas las concentraciones utilizadas. En este ensayo también se calculó TEAC, por ello, se determinó el IC_{50} de PsCe ($26762 \mu\text{g/ml}$, Figura 10A) y el del Trolox ($0,0024 \text{ umol/ml}$, Figura 10B), obteniéndose un valor de $0,090 \text{ umol TEAC g}^{-1} \text{ PS}$.

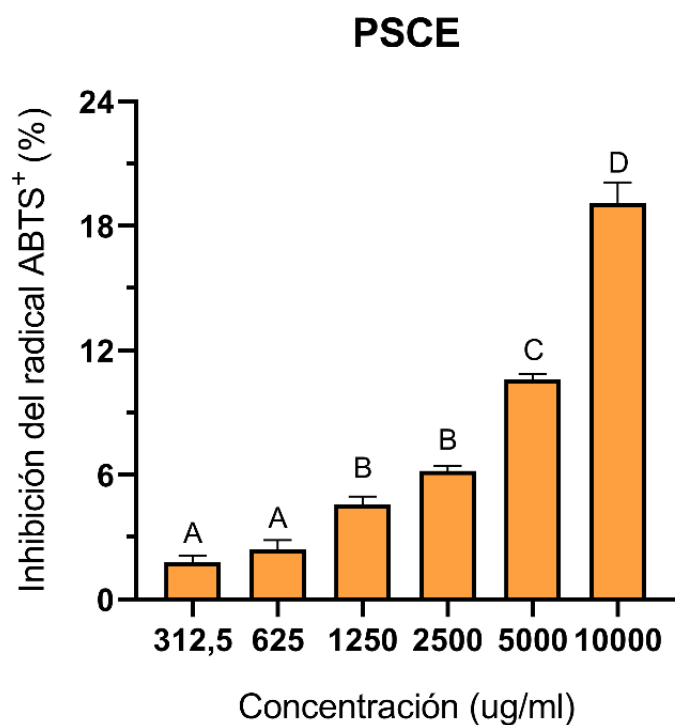


Figura 9. Porcentaje de inhibición del radical $ABTS^+$ usando distintas concentraciones de PsCe. Se designaron grupos basados en las diferencias estadísticas, los que se representan con diferentes letras. Se presenta el presenta la media \pm error estándar de 3 experimentos.

Gráfico de IC₅₀ de *Cyttaria espinosae* y Trolox

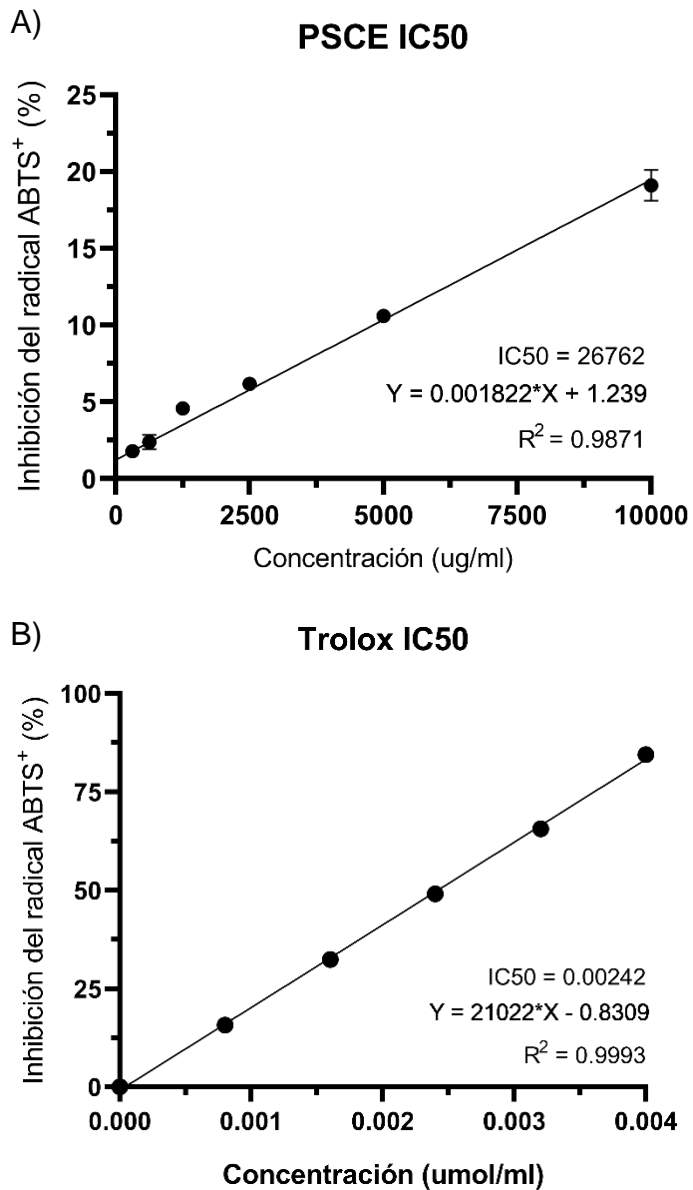


Figura 10. (A) IC₅₀ de PsCe, se presenta en conjunto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación asociado. (B) IC₅₀ de Trolox, se presenta tanto, la ecuación de la recta, como el coeficiente de determinación asociados.

Ensayos en neuroprotección

Ensayo de Viabilidad celular

En primer lugar, fue necesario determinar si las concentraciones a utilizar de PsCe, eran citotóxicas en línea celular PC-12. Para ello, se evaluó la viabilidad celular utilizando la técnica MTT. Esta técnica mide la capacidad reductora del complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena transportadora de electrones, mediante la conversión del compuesto MTT de color amarillo, en cristales de formazán color violeta (van Tonder et al. 2015).

En este ensayo, se utilizó como control positivo de toxicidad celular el compuesto FCCP (Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona), un desacoplante de la cadena de electrones, que provocó una reducción en la viabilidad celular de un $41,32 \pm 13,36\%$. Además, también se evaluó el potencial citotóxico del solvente utilizado para disolver los polisacáridos, es decir, DMSO, el que produjo una leve reducción en la viabilidad celular de un $6,22 \pm 4,39\%$ (Figura 11). Finalmente, las células PC-12 incubadas con distintas concentraciones de PsCe, mostraron valores de viabilidad celular muy similares al control, siendo de: $103,0 \pm 10,03$ (0.1 $\mu\text{g/ml}$); $109,0 \pm 8,49$ (1 $\mu\text{g/ml}$); $123,9 \pm 13,25$ (10 $\mu\text{g/ml}$) y $90,04 \pm 10,94\%$ (100 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 10).

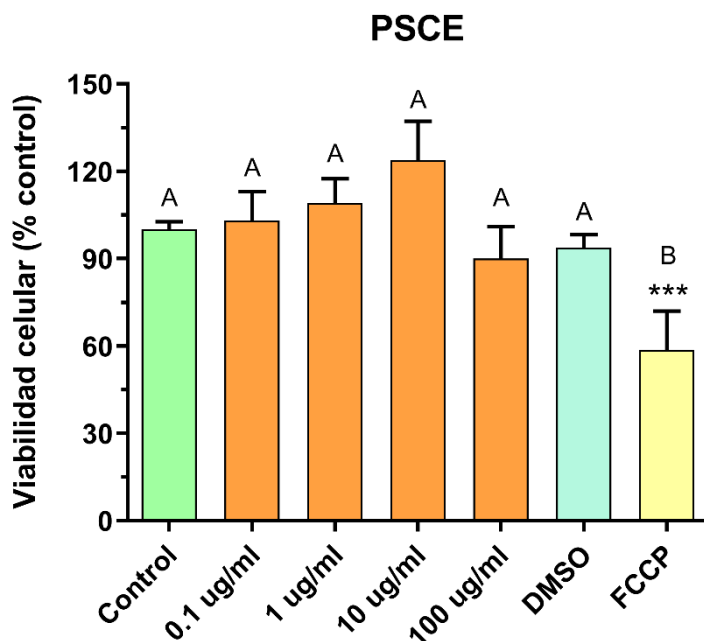


Figura 11. Viabilidad de células PC-12 incubadas con DMSO (1µl), FCCP (1µM) y distintas concentraciones de PsCe (0,1-100 µg/ml). Se designaron grupos basados en las diferencias estadísticas, los que se representan con diferentes letras. Se presenta la media ± error estándar de 3 experimentos. El número de * presentes, señala el nivel de significancia de las diferencias con respecto al control * (p<0,05) ** (p<0,01) *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Posteriormente, para determinar el potencial neuroprotector de este extracto, se utilizaron células PC-12 coincubadas con el péptido β-Amiloide (1uM) y las mismas concentraciones de PsCe. El Aβ redujo la viabilidad de las células hasta alcanzar un valor de 84,5 ± 1,76%, mientras que el control de toxicidad celular (FCCP) redujo la viabilidad hasta un 57,1 ± 2,70%. Por otra parte, las células incubadas con Aβ y las distintas concentraciones de PsCe, mostraron valores muy similares a las células que sólo fueron sometidas a Aβ, alcanzando una viabilidad de 86,9 ± 2,09 (100 µg/ml); 87,3 ± 2,34 (10 µg/ml); 86,1 ± 2,07 (1 µg/ml) y 90,0 ± 2,29% (0.1 µg/ml). Sin embargo, el análisis estadístico reveló la no existencia de diferencias significativas entre sí (Figura 12).

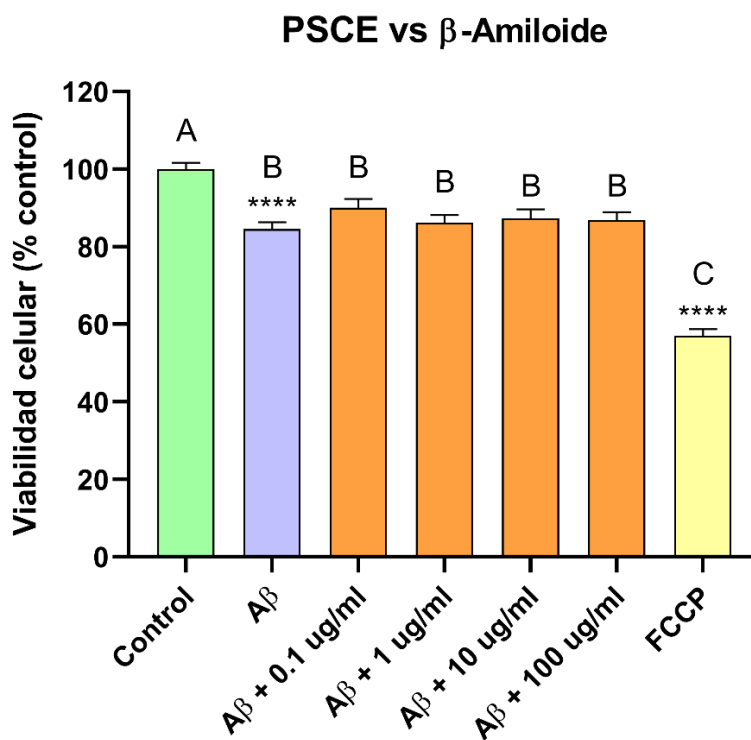


Figura 12. Viabilidad de las células PC-12 incubadas con distintas concentraciones de PsCe (0,1-100 $\mu\text{g/ml}$) y $\text{A}\beta$ (1 μM). Se designaron grupos basados en las diferencias estadísticas, los que se representan con diferentes letras. Se presenta la media \pm error estándar de 3 experimentos. El número de * presentes, señala el nivel de significancia de las diferencias con respecto al control * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

DISCUSIÓN

Según lo reportado en Jacinto-Azevedo et al. 2021, la mayor parte de la biomasa fúngica de *Cyttaria espinosae* está conformada por carbohidratos, los que constituyen el 71,6% aproximadamente. El resto de la biomasa, la componen proteínas (17,5%), fibra (8,1%), lípidos (6,1%) y materia inorgánica (4,9%). De acuerdo con esto, era esperable que los polisacáridos también estuvieran presentes en una alta proporción. Luego de realizados los procesos de extracción y purificación del extracto, el rendimiento fue de un 8,71% con respecto a la biomasa seca total, lo que ratifica la presunción realizada con anterioridad.

El alto contenido de polisacáridos presentes en los hongos, se debe a la presencia de estos compuestos en la pared celular fúngica, donde desempeñan labores estructurales y señalizadoras (Pizarro et al. 2014; Pontón 2008). Los polisacáridos predominantes en las paredes celulares fúngicas son del tipo α y β glucanos (Pontón 2008). Los α -glucanos presentes en las células fúngicas son amorfos y solubles en agua, siendo los más comunes el glucógeno, que cumple una función de reserva energética; y los glucanos que se encuentran unidos mediante enlaces α -1,3 y α -1,4 que cumplen funciones estructurales (Grün et al. 2005; Hochstenbach et al. 1998; Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos 2019). Por otra parte, los β -glucanos son más abundantes y su estructura más variable, llegando a identificarse hasta siete tipos diferentes en las células fúngicas (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos 2019). La principal propiedad atribuida a estos azúcares (principalmente a los β -glucanos), es su efecto inmunomodulador, pues estas moléculas son reconocidas por animales y plantas, siendo capaces de inducir la activación del sistema inmune, activación que depende en gran medida de la naturaleza y tamaño molecular del polisacárido (Fujikawa et al. 2012; Rappleye et al. 2004; Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos 2019).

Características químicas del extracto

El espectro FTIR de PsCe, denota una alta presencia de azúcares, pues el espectro típico de los carbohidratos, muestra una intensa señal entorno a los 3600-3000 cm^{-1} la que se debe a la vibración de los enlaces puentes de hidrógeno del polisacárido. Además, se observa una banda más débil a 3000-2800 cm^{-1} , la que

está asociada al estiramiento de los esqueletos C-H (Hong et al. 2021). En adición a lo anterior, las bandas 5, 6, 8, 9, 10 y 11 también se asocian a los carbohidratos. En primer lugar, las señales 5 y 6 se deben a la flexión de los enlaces C-H y O-H, que se encuentran en una alta proporción en estas moléculas (Hong et al. 2021; Stuart 2005). Por otra parte, las señales en torno a 1400 y 800 cm^{-1} se deben a la presencia de enlaces glicosídicos (Hong et al. 2021; Stuart 2005; Wiercigroch et al. 2017). Finalmente, las bandas 10 y 11, se deben a la presencia de las estructuras α y β de los polisacáridos, pues estas estructuras muestran una señal típica entorno a los 900 cm^{-1} para los β -glucanos y alrededor de los 850 cm^{-1} para los α -glucanos (Wang et al. 2022).

El espectro FT-IR, también confirma la presencia de proteínas en el extracto, pues el espectro típico de estas moléculas, muestra una señal alrededor de los 1700-1600 cm^{-1} asociado a la presencia de amidas primarias y otra entorno a los 1565-1520 cm^{-1} atribuido a las secundarias (Barth 2007; Stuart 2005).

Los análisis químicos realizados confirman lo mostrado por el espectro FTIR, pues aproximadamente un 76,9% del extracto está conformado por carbohidratos, según el contenido de azúcares totales. Además, las proteínas conforman una parte importante de este extracto, representando un 13,9%. Finalmente, el porcentaje restante del extracto está conformado por agua y otro tipo de moléculas. De estos constituyentes minoritarios se cuantificaron únicamente el contenido de fenoles y sulfatos, obteniéndose un valor de 0,801 mg GAE g^{-1} PS para los fenoles y de 8,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los sulfatos (lo que representa un 0,41% del extracto).

La composición química del extracto de polisacáridos, concuerda con lo esperado según los métodos de extracción y purificación utilizados. El método de extracción utilizado, fue el del agua caliente, debido a su bajo costo y complejidad (Leong et al. 2021). Este método se basa en que los polisacáridos tienen una mayor solubilidad y permanecen estables en el agua caliente, sin embargo, no es capaz de recoger algunas fracciones para las que se requieren procesos adicionales y el uso de otros insumos como enzimas, solventes orgánicos o soluciones alcalinas (Shi 2016). El extracto crudo obtenido a partir de este método, contiene numerosas

impurezas, como sales inorgánicas, sustancias no polares de bajo peso molecular e impurezas de alto peso molecular como proteínas y lípidos (Shi 2016). Para la purificación del extracto, se utilizó el método de diálisis, debido a que elimina sales inorgánicas, monosacáridos, oligosacáridos e impurezas no polares de bajo peso molecular (Leong et al. 2021). Sin embargo, este método es incapaz de eliminar sustancias complejas de alto peso molecular como las proteínas, para ello, existen otros métodos que utilizan otros agentes, por ejemplo, el método enzimático, Sevag, triclorotrifluoroetano y ácido clorhídrico (Leong et al. 2021; Shi 2016).

Actividad antioxidante

En este estudio, se evaluó la actividad antioxidante del extracto de polisacáridos obtenido de *Cyttaria espinosae* mediante los ensayos DPPH y ABTS. Los resultados mostraron que PsCe tiene una actividad antioxidante moderada, pues es mayor a lo que se reportado en otros estudios como en el de Albornoz et al. 2022, donde los polisacáridos ácidos provenientes de la especie *Nothophellinus andinopatagonicus*, mostraron porcentajes de inhibición significativos sólo a la mayor concentración (40mg/ml), siendo de un 6,24% para DPPH y 4,63% para ABTS. Sin embargo, otros estudios como el realizado por Hu et al. 2019, en la especie *Flammulina velutipes*, muestran porcentajes de inhibición mayores a los obtenidos en este estudio, siendo de 29.39%, 33.26% y 73.43% en el ensayo ABTS y de 49,61%, 45,24% y 67,46% en el DPPH para las fracciones FVY-40, FVY-60 y FVY-80 respectivamente, a una concentración de 3 mg/ml. Las diferencias en los niveles de inhibición mostrados en estos estudios pueden explicarse por diversos factores como el peso molecular, la composición de monosacáridos, y el contenido de sulfatos, fenoles y ácidos urónicos (Wang et al. 2016). En el caso de los grupos sulfatos y ácidos urónicos, bastantes estudios muestran que los polisacáridos con un alto contenido de estas moléculas, poseen una mayor actividad antioxidante en diversos ensayos (Chen et al. 2015; Mateos-Aparicio et al. 2010; Sun et al. 2009; Wang et al. 2013; Xie et al. 2016; Yin et al. 2021). En el caso de los grupos sulfatos, se plantea que la presencia de estos átomos, activa el hidrógeno del carbono anomérico, aumentando así la capacidad de suministrar hidrógeno por parte del polisacárido. En segundo lugar, la

presencia de sulfatos en la estructura de los polisacáridos puede mejorar la solubilidad en agua y las características fisicoquímicas de estos compuestos (Xie et al. 2016). Además, la posición de los grupos sulfato, también es un factor determinante para la actividad antioxidante, pues se ha observado que la derivatización de estos grupos, en las posiciones C-4 y C-6 pueden aumentar su actividad antioxidante, mientras la derivatización en la posición C-2 puede reducir su actividad (Zhong et al. 2019). En el caso de los ácidos urónicos se propone que la presencia de grupos electrófilos como ceto o aldehído en el polisacárido facilita la liberación de hidrógeno del enlace O-H (Wang et al. 2016). Finalmente, también es ampliamente reconocido que la cantidad de fenoles presentes en una muestra es una característica reveladora de la capacidad antioxidante de un compuesto, puesto que este tipo de metabolitos secundarios, son extremadamente eficientes secuestrando radicales libres (Rice-Evans et al. 1997). En este estudio, tanto el contenido de fenoles como el de sulfatos fue bastante bajo. Además, en el espectro FTIR no se observó la presencia de ácidos urónicos, por lo que, de estar presentes estarían en una baja proporción. Por lo tanto, la actividad antioxidante observada en esta investigación no puede atribuirse a estos factores.

Otro factor importante a considerar es el contenido de proteínas, pues en ausencia de otros interferentes como fenoles, flavonas o terpenos, son las proteínas y los aminoácidos asociados a los polisacáridos, los que les brindan propiedades antioxidantes, lo que se debe a la capacidad que tienen algunos aminoácidos para donar protones a los radicales deficientes en electrones (Liu et al. 2013; Wang et al. 2016; Zhong et al. 2019). En este estudio, el contenido de proteínas fue de alrededor del 13%, por lo que gran parte de la actividad antioxidante puede deberse a la acción del complejo polisacárido-proteína.

Además, es necesario considerar que, tanto la especie utilizada como el hábitat en el que esta se desarrolla, cumplen un rol fundamental en la síntesis y conformación de los metabolitos secundarios. Esto se debe a que estas moléculas orgánicas tienen una distribución filogenética sesgada, como consecuencia de múltiples factores que han impulsado la diversificación de los genes implicados en su síntesis

a lo largo de la evolución. Además, la esencialidad de estas moléculas es de carácter contextual, es decir, depende en gran medida del ambiente en el que se encuentre un organismo. Por lo tanto, es el ambiente el que determina la importancia que tienen los metabolitos secundarios para la supervivencia o reproducción de los seres vivos y, por ello condicionan su cantidad y estructura (Bills & Gloer 2016).

Por otra parte, los porcentajes de inhibición de ambos ensayos, es decir, DPPH y ABTS, no son comparables entre sí, puesto que las metodologías utilizadas en ambos varían considerablemente. Sin embargo, para poder compararlos, se utilizó el valor TEAC, es decir, la actividad equivalente a Trolox, realizando una curva de referencia con este análogo de la vitamina E. El valor de PsCe en ABTS fue de 0,090 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS, lo que es considerablemente mayor al TEAC obtenido en DPPH, que fue de 0,0013 $\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$ PS. Una posible explicación a esta diferencia radica en las características propias de los radicales, pues el DPPH presenta impedimento estérico, lo que provoca que las moléculas pequeñas que tienen buen acceso al radical tengan un efecto antioxidante mayor, mientras los compuestos antioxidantes grandes como los polisacáridos, reaccionen de manera mucho más lenta, lo que reduce su efecto antioxidante (Magalhães et al. 2008).

Finalmente, los mecanismos de acción antioxidante de los polisacáridos, aún no son totalmente conocidos, sin embargo, existen algunos propuestos, entre ellos, la eliminación de ROS, la regulación del sistema antioxidante y la regulación de las vías de señalización mediadas por el estrés oxidativo (Zhong et al. 2019). En este estudio, se evaluó únicamente la capacidad de eliminación de radicales libres, bioactividad que está relacionada con la eliminación de ROS en el organismo. Sin embargo, también es importante realizar ensayos que nos permitan dilucidar el potencial antioxidante mediado por el mecanismo de regulación del sistema antioxidante y de las vías de señalización mediadas por el estrés oxidativo, para lo cual es fundamental realizar estudios enzimáticos que permitan dilucidar este potencial.

Actividad neuroprotectora

El potencial de los polisacáridos para hacer frente a la toxicidad inducida por el péptido β -amiloide está ampliamente documentado, ejemplos de ello, son los estudios realizados por Bravo et al. 2008, Zhang et al. 2015, Habaike et al. 2020, Li et al. 2019, Hu et al. 2021 y He et al. 2020, en los cuales el uso de polisacáridos de distintos organismos, aminoró en gran medida la reducción en la viabilidad de distintas líneas celulares provocada por la incubación con diferentes variantes del péptido A β . Para explicar, este efecto neuroprotector, se han propuesto diferentes mecanismos mediante los cuales, los polisacáridos son capaces de interferir con la toxicidad inducida por A β . El primero es disminuyendo la producción de A β mediante la regulación de los niveles de proteína APP y reduciendo los niveles de β -secretasa. El segundo, es aumentando la degradación A β , promoviendo el aumento de las enzimas ligadas a la degradación de este péptido (IDE y NEP). Finalmente, el tercer mecanismo se basa en la disminución de la agregación de este péptido y con ello, la inhibición de la formación de los agregados tóxicos de A β (Zhang et al. 2022). Además, también se ha descrito que los polisacáridos pueden desempeñar un papel anti-apoptosis, mediante la reducción de la liberación de Cyt-C, lo que a su vez reduce la apoptosis ejecutada por la Caspasa-3. Y también activando la vía PI3K-Akt y así elevando Bcl-2/Bax, manteniendo así la supervivencia de las células neuronales (Zhang et al. 2022).

En este estudio, se evaluó el potencial neuroprotector del extracto de polisacáridos obtenido de *Cyttaria espinosae* frente a la toxicidad inducida por A β , mediante un ensayo de viabilidad en células PC-12. PsCe mostró no poseer propiedades citotóxicas frente a esta línea celular, pues la viabilidad celular se mantuvo cercana al control e incluso aumento en ciertas concentraciones (0.1, 1 y 10 μ g/ml). Por otra parte, A β redujo la viabilidad de las células PC-12 en un $15,5 \pm 1,76\%$, lo que representa un porcentaje relativamente bajo con respecto al control, lo que probablemente se debe a la concentración y la variante del péptido utilizada (A β ₁₋₄₀), pues esta variante, es menos tóxica que otras isoformas como la A β ₁₋₄₂ (Yan & Wang 2006). A pesar de lo anterior, la reducción en la viabilidad celular provocada

por A β fue estadísticamente significativa. Al utilizar PsCe en conjunto con A β , se evidenció un moderado incremento en la viabilidad de las células PC-12, el que no fue significativo con respecto a las células incubadas sólo con A β . Por lo tanto, PsCe no presenta actividad neuroprotectora en las condiciones en las que se realizó este estudio.

La falta de actividad de este extracto, puede deberse a distintos factores relacionados a su composición química. En especial, el grado de pureza y la composición de monosacáridos parecen ser atributos muy relevantes para la actividad de estos compuestos frente a A β . En el caso del grado de pureza, los polisacáridos usados en los estudios anteriormente mencionados (Habaike et al. 2020; He et al. 2020; Li et al. 2019; Zhang et al. 2015), fueron sometidos a diversas etapas de purificación, logrando obtener fracciones con un contenido de azúcares mayor al 95%, lo que devela un alto grado de pureza que probablemente esté relacionado con su bioactividad. En este estudio, el extracto de polisacáridos obtenido, contiene pocas impurezas de bajo peso molecular, sin embargo, tiene un contenido de proteínas nada despreciable, lo que podría estar mermando su bioactividad. Además, la composición de monosacáridos es un aspecto muy relevante para la bioactividad de estas moléculas, pues se ha reportado que la mayoría de los polisacáridos con efectos sobre A β , presentaban Glc en su estructura, mientras los polisacáridos con efectos anti-EA contienen mayoritariamente Glc, Man, Gal y Ara, lo que se especula está relacionado con la formación de estructuras activas (Zhang et al. 2022). Por lo tanto, es indispensable realizar análisis de este tipo en futuras investigaciones de carácter similar.

CONCLUSIONES

El potencial de los polisacáridos fúngicos en neuroprotección está bastante documentado, sin embargo, en este estudio el extracto de polisacáridos de *Cyttaria espinosae* no fue capaz de atenuar la toxicidad inducida por el péptido A β , por lo que la hipótesis 1 se rechaza. La explicación a este resultado probablemente se encuentre en la composición química de este extracto. Sin embargo, los mecanismos y factores que afectan la bioactividad de estos compuestos en neuroprotección aún son bastante desconocidos, por lo que, se requiere continuar realizando investigaciones relacionadas a este ámbito.

Por otra parte, PsCe presentó una moderada actividad antioxidante que se atribuye principalmente a su contenido de proteínas, por lo tanto, la hipótesis 2 se acepta, puesto que se evidenció actividad antioxidante la que está relacionada a las propiedades químicas de este extracto. Además, es necesario agregar que, aunque el resultado es positivo, es indispensable realizar ensayos que verifiquen la actividad de este extracto siguiendo otros mecanismos antioxidantes conocidos de los polisacáridos.

Finalmente, es importante mencionar que futuros estudios acerca de los polisacáridos fúngicos, deben centrarse en ayudar a dilucidar los mecanismos asociados a la bioactividad de estas moléculas y también, cómo las propiedades químicas de estas, interfieren en su bioactividad.

BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, A., Das, I., Chandhok, D. & Saha, T. 2010. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative medicine and cellular longevity* 3(1): 23-34.
- Aguayo, L., Parodi, J., Sepulveda, F. & Opazo, C. 2009. Pore-forming neurotoxin-like mechanism for A β oligomer-induced synaptic failure. In *current hypotheses and research milestones in Alzheimer's disease* (Eds Maccioni, R.B. & Perry, G.), pp. 13-21. Springer, New York.
- Akiba, M., Kinoshita, K., Kino, Y., Sato, J.-I. & Koyama, K. 2020. Isolation of three new meroterpenoids and seven known compounds from *Albatrellus yasudae* and their A β -aggregation inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 30(2): 126808.
- Albornoz, V., Casas-Arrojo, V., Figueroa, F., Hernández, V., Pérez, C., Rajchenberg, M., Smith, C. T., Becerra, J., Cabrera-Pardo, J. R., Campos, V. L. & Abdala-Díaz, R. T. 2022. Evaluation of cytotoxic effect against tumour cells of the acidic polysaccharides of the fungus *Nothophellinus andinopatagonicus*. *Journal of the chilean chemical society* 67: 5418-5424.
- Arnolds, E. 1992. The analysis and classification of fungal communities with special reference to macrofungi. In *Fungi in vegetation science; handbook of vegetation science* (Ed Wulfard Winterhoff), pp. 7-47. Springer, Dordrecht.
- Asker, M., Manal, M., Abeer, I. & Osama, E. S. 2014. Therapeutic potential and structural elucidation of a water-soluble polysaccharide of a wild edible mushroom *Agaricus bisporus* against neurodegenerative disease, Alzheimer. *World journal pharmaceutical science* 2: 1136–1145.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., Orhan, I. E., Banach, M., Rollinger, J. M., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Bayer, E. A., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G. K., Braid, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., . . . The international natural product sciences. 2021. *Natural products in drug*

- discovery: advances and opportunities. *Nature reviews: drug discovery* 20(3): 200-216.
- Barth, A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et biophysica acta (BBA) – Bioenergetics* 1767(9): 1073-1101.
- Beutler, J. A. 2019. Natural products as a foundation for drug discovery. *Current protocols in pharmacology* 86(1): e67.
- Bills, G. F. & Gloer, J. B. 2016. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology spectrum* 4(6).
- Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S. & Rios, C. 2008. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochemical research* 33(9): 1717-1723.
- Bravo, R., Arimon, M., Valle-Delgado, J. J., García, R., Durany, N., Castel, S., Cruz, M., Ventura, S. & Fernández-Busquets, X. 2008. Sulfated polysaccharides promote the assembly of amyloid beta (1-42) peptide into stable fibrils of reduced cytotoxicity. *Journal of biological chemistry* 283(47): 32471-32483.
- Cepero, M., Restrepo, S. & Franco, A. 2012. *Biología de hongos*. Universidad de los Andes, Bogotá. 497pp.
- Chang, W.-H., Chen, M. C. & Cheng, I. H. 2015. Anthraquinone lowers brain amyloid- β levels and improves spatial learning and memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific reports* 5(1): 15067.
- Chaplin, M. F. & Kennedy, J. F. 1994. *Carbohydrate analysis: A practical approach*. Oxford, New York. 324pp.
- Chen, Y., Zhang, H., Wang, Y., Nie, S., Li, C. & Xie, M. 2015. Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. *Food chemistry* 186: 231-238.

- Cheng, J. H., Tsai, C. L., Lien, Y. Y., Lee, M. S. & Sheu, S. C. 2016. High molecular weight of polysaccharides from *Hericium erinaceus* against amyloid beta-induced neurotoxicity. BMC complementary and alternative medicine 16: 170.
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure and applied chemistry 77(1): 7-24.
- Crisóstomo-Ayala, K., Hernández, M., Pedreño, M., Hernández, J., Pérez, C., Bustos, E., Sánchez-Olate, M. & Ríos, D. 2021. Seasonal changes in photosynthesis, phenolic content, antioxidant activity, and anatomy of apical and basal leaves of *Aristotelia chilensis*. Biologia plantarum 65: 342-350.
- David, B., Wolfender, J. L. & Dias, D. A. 2014. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. Phytochemistry reviews 14: 299-315.
- Días, D. A., Urban, S. & Roessner, U. 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. Metabolites 2(2): 303-336.
- Dighton, J. 2003. Fungi in ecosystem processes. CRC press, Florida. 424 pp.
- Edwards, F. A. 2019. A unifying hypothesis for Alzheimer's disease: From plaques to neurodegeneration. Trends in neurosciences 42(5): 310-322.
- Elsayed, E. A., El Enshasy, H., Wadaan, M. A. M. & Aziz, R. 2014. Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. Mediators of inflammation 2014: 805841.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., Sczufca, M. & Alzheimer's disease international. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. The Lancet 366(9503): 2112-2117.
- Figuroa, F., Abdala Díaz, R., Hernandez, V., Pedreros, P., Aranda, M., Cabrera-Pardo, J., Perez, C., Jose, B. & Urrutia, R. 2020. Invasive diatom *Didymosphenia geminata* as a source of polysaccharides with antioxidant and immunomodulatory effects on macrophage cell lines. Journal of applied phycology 32(1).

- Folin O. & Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry* 73: 627–650.
- Fuentealba, J., Dibarrart, A. J., Fuentes-Fuentes, M. C., Sáez-Orellana, F., Quiñones, K., Guzmán, L., Pérez, C., Becerra, J., & Aguayo, L. G. 2011. Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid- β aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. *Journal of neuroscience research* 89(9): 1499-1508.
- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T. & Nishimura, M. 2012. Surface α -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *Plos pathogens* 8(8): e1002882.
- Gamundi, I. J. 1971. Las Cyttariales sudamericanas (Fungi-Ascomycetes). *Darwiniana* 16(3/4): 461-510
- Gao, Q.H., Fu, X., Zhang, R., Wang, Z. & Guo, M. 2018. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms. *International journal of biological macromolecules* 106: 749-754.
- Garcia, E. J., Oldoni, T. L., Alencar, S. M., Reis, A., Loguercio, A. D. & Grande, R. H. 2012. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian dental journal* 23(1): 22-27.
- Glabe, C. G. 2008. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *Journal of biological chemistry* 283(44): 29639-29643.
- Glazer, A. N. & Nikaido, H. 2007. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press, New York. 577pp.
- González-Ramírez, M., Gavilán, J., Silva-Grecchi, T., Cajas-Madriaga, D., Triviño, S., Becerra, J., Saez-Orellana, F., Pérez, C. & Fuentealba, J. 2018. A natural benzofuran from the patagonic *Aleurodiscus vitellinus* fungus has potent neuroprotective properties on a cellular model of amyloid- β peptide toxicity. *Journal of Alzheimer's disease* 61(4): 1463-1475.

- Gra, S., Padrón, N., & Llibre, J. 2002. Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista cubana de investigaciones biomédicas* 21: 253-261.
- Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P. & Vliegthart, J. F. 2005. The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology* 15(3): 245-257.
- Gupta, D. 2015. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International journal of pharmaceutical sciences and research* 6: 546-566.
- Habaïke, A., Yakufu, M., Cong, Y., Gahafu, Y., Li, Z. & Abulizi, P. 2020. Neuroprotective effects of *Fomes officinalis* Ames polysaccharides on A β (25-35)-induced cytotoxicity in PC12 cells through suppression of mitochondria-mediated apoptotic pathway. *Cytotechnology* 72(4): 539-549.
- Hampel, H., Prvulovic, D., Teipel, S., Jessen, F., Luckhaus, C., Frölich, L., Riepe, M. W., Dodel, R., Leyhe, T., Bertram, L., Hoffmann, W. & Faltraco, F. 2011. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Progress in neurobiology* 95(4): 718-728.
- Han, Y., Nan, S., Fan, J., Chen, Q. & Zhang, Y. 2019. *Inonotus obliquus* polysaccharides protect against Alzheimer's disease by regulating Nrf2 signaling and exerting antioxidative and antiapoptotic effects. *International journal of biological macromolecules* 131: 769-778.
- Hawksworth, David & Lücking, Robert. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum* 5(4).
- He, J. Z., Ru, Q. M., Dong, D. D. & Sun, P. L. 2012. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules* 17(4): 4373-4387.
- He, Y., Xu, W. & Qin, Y. 2020. Structural characterization and neuroprotective effect of a polysaccharide from *Corydalis yanhusuo*. *International journal of biological macromolecules* 157: 759-768.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. & Klausner, R. D. 1998. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for

cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proceedings of the national academy of sciences* 95(16): 9161-9166.

Hojman, D. A., Duarte, F., Ruiz-Tagle, J., Budnich, M., Delgado, C., & Slachevsky, A. 2017. The cost of dementia in an unequal country: The case of Chile. *Plos one* 12(3): 172-204.

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J. & Stevens, B. 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352(6286): 712-716.

Hong, T., Yin, J.-Y., Nie, S.-P. & Xie, M.-Y. 2021. Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food chemistry: X* 12: 100168.

Hu, Y. N., Sung, T. J., Chou, C. H., Liu, K. L., Hsieh, L. P. & Hsieh, C. W. 2019. Characterization and antioxidant activities of yellow strain *Flammulina velutipes* (Jinhua mushroom) polysaccharides and their effects on ROS content in L929 cell. *Antioxidants (Basel)* 8(8).

Hu, Y. R., Xing, S. L., Chen, C., Shen, D. Z. & Chen, J. L. 2021. *Codonopsis pilosula* polysaccharides alleviate A β (1-40)-induced PC12 cells energy dysmetabolism via CD38/NAD⁺ signaling pathway. *Current Alzheimer research* 18(3): 208-221.

Huang, L., Shen, M., Morris, G. A. & Xie, J. 2019. Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms. *Trends in food science & technology* 92: 1-11.

Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfling, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E. & Götz, J. 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142(3): 387–397.

- Jacinto-Azevedo, B., Valderrama, N., Henríquez, K., Aranda, M. & Aqueveque, P. 2021. Nutritional value and biological properties of Chilean wild and commercial edible mushrooms. *Food chemistry* 356: 129651.
- Karran, E., & De Strooper, B. 2016. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of neurochemistry* 139(2): 237–252.
- Khan, M. A., Tania, M., Liu, R. & Rahman, M. M. 2013. *Hericium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values. *Journal of complementary and integrative medicine* 10.
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Van Griensven, L., Vrvic, M. & Jakovljevic, D. 2014. Polysaccharides of higher fungi: Biological role, structure and antioxidative activity. *Hemijska industrija* 68: 305-320.
- Lahlou, M. 2013. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology & pharmacy* 4: 17-31.
- Lam, K. S. 2007. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in microbiology* 15(6): 279-289.
- Lee, K. H., Cha, M. & Lee, B. H. 2020. Neuroprotective effect of antioxidants in the brain. *International journal of molecular sciences* 21(19): 7152.
- Lee, S. J., Nam, E., Lee, H. J., Savelieff, M. G. & Lim, M. H. 2017. Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chemical society reviews* 46(2): 310-323.
- Leong, Y. K., Yang, F.-C. & Chang, J.-S. 2021. Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. *Carbohydrate polymers* 251: 117006.
- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M. & Ashe, K. H. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440(7082): 352-357.

- Li, I.-C., Lin, S., Tsai, Y.-T., Hsu, J.-H., Chen, Y.-L., Lin, W.-H. & Chen, C.-C. 2019. *Cordyceps cicadae* mycelia and its active compound HEA exert beneficial effects on blood glucose in type 2 diabetic db/db mice. *Journal of the science of food and agriculture* 99(2): 606-612.
- Li, Y., Wang, B., Liu, C., Zhu, X., Zhang, P., Yu, H., Li, Y., Li, Z. & Li, M. 2019. Inhibiting c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated apoptotic signaling pathway in PC12 cells by a polysaccharide (CCP) from *Coptis chinensis* against amyloid- β (A β)-induced neurotoxicity. *International journal of biological macromolecules* 134: 565-574.
- Liu, D., Sheng, J., Li, Z., Qi, H., Sun, Y., Duan, Y. & Zhang, W. 2013. Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. *International journal of biological macromolecules* 56: 1-5
- Liu, J., Willför, S. & Xu, C. 2015. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre* 5(1): 31-61.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., . . . Murray, C. J. L. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet* 380(9859): 2095-2128.
- Lu, H., Lou, H., Hu, J., Liu, Z. & Chen, Q. 2020. Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 19(5): 2333-2356.
- Ma, G., Yang, W., Zhao, L., Pei, F., Fang, D. & Hu, Q. 2018. A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food science and human wellness* 7(2): 125-133.
- Ma, X., Yang, M., He, Y., Zhai, C. & Li, C. 2021. A review on the production, structure, bioactivities and applications of *Tremella* polysaccharides. *International journal of immunopathology and pharmacology* 35: 20587384211000541.

- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L. F. C. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta* 613(1): 1-19.
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Kałużna-Czaplińska, J., Rosiak, A. & Chrzescijanska, E. 2020. Antioxidant properties of green coffee extract. *Forests* 11: 557.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A. & Cummings, J. L. 2015. Alzheimer's disease. *Nature reviews: disease primers* 1: 150-156.
- Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C., Jiménez-Escrig, A. & Rupérez, P. 2010. Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. *Carbohydrate polymers* 82(2): 245-250.
- Mérillon, J.-M. & Ramawat, K. G. 2015. *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology*. Springer, New York. 2241pp.
- Mizrahy, S. & Peer, D. 2012. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chemical society reviews* 41(7): 2623-2640.
- Montine, T. J., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V. & Hyman, B. T. 2012. National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta neuropathologica* 123(1): 1-11.
- Morris, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone reagent. *Science* 107(2775): 254-255.
- Munteanu, I. G. & Apetrei, C. 2021. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International journal of molecular sciences* 22(7).
- Murray, C. J. L. & Lopez, A. D. 2013. Measuring the global burden of disease. *New England journal of medicine* 369(5): 448-457.

- Niego, A. G., Rapior, S., Thongklang, N., Raspé, O., Jaidee, W., Lumyong, S. & Hyde, K. D. 2021. Macrofungi as a nutraceutical source: Promising bioactive compounds and market value. *Journal of fungi* 7(5): 397.
- Pandya, U., Dhuldhaj, U. & Sahay, N. S. 2019. Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. *Natural product research* 33(18): 2668-2680.
- Peterson, K. R. & Pfister, D. H. 2010. Phylogeny of *Cyttaria* inferred from nuclear and mitochondrial sequence and morphological data. *Mycologia* 102(6): 1398-1416.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J. & Desmazeaud, M. 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus grown in a chemically defined medium. *Applied and environmental microbiology* 66(8): 3427-3431.
- Phan, C.W., David, P., Naidu, M., Wong, K.H. & Sabaratnam, V. 2015. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. *Critical reviews in biotechnology* 35(3): 355-368.
- Pizarro C, S., Ronco M, A. M. & Gotteland R, M. 2014. β -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición* 41: 439-446.
- Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013: 956792.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista iberoamericana de micología* 25(2): 78-82.
- Price, B. H., Gurvit, H., Weintraub, S., Geula, C., Leimkuhler, E. & Mesulam, M. 1993. Neuropsychological patterns and language deficits in 20 consecutive cases of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Archives of neurology* 50(9): 931-937.
- Prince, M., Karagiannidou, M., Guerchet, M., Comas-Herrera, A. & Knapp, M. 2016. World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia:

coverage, quality and costs now and in the future. Alzheimer's disease international, Londres. 131pp.

Ptak, S. H., Sanchez, L., Fretté, X. & Kurouski, D. 2021. Complementarity of Raman and infrared spectroscopy for rapid characterization of fucoidan extracts. *Plant methods*, 17(1): 130.

Qian, L., Liu, H., Li, T., Liu, Y., Zhang, Z. & Zhang, Y. 2020. Purification, characterization and in vitro antioxidant activity of a polysaccharide AAP-3-1 from *Auricularia auricula*. *International journal of biological macromolecules* 162: 1453-1464.

Raghukumar, S. 2017. *Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems*. Springer, New York. 378pp.

Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S. & Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international* 2014: 761264.

Rappleye, C. A., Engle, J. T. & Goldman, W. E. 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Molecular microbiology* 53(1): 153-165.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 26(9-10): 1231-1237.

Ribeiro, F., Ruthes, A. & Lacomini, M. 2015. Natural Polysaccharides from mushrooms: Antinociceptive and anti-inflammatory properties. In *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology* (Eds. Gopal K. & Mérillon J.-M.), pp. 2151-2178. Springer, New York.

Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2(4): 152-159.

Roberson, E. D., Searce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q. & Mucke, L. 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid

beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316(5825): 750–754.

Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. 2019. Cell wall glucans of fungi. A review. *The cell surface* 5: 100022.

Salazar, V. 2019. Comparación de parámetros químico-nutricionales de las especies del género *Cyttaria* más consumidas en Chile. Tesis de Magíster. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

Salazar, V. 2020. Actualización del conocimiento del género *Cyttaria* Berk. (Cyttariales, Ascomycota) en Chile. *Boletín micológico* 35(1).

Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J., Razmilic, I. & Reyes, S. 1996. 'Los "digüeños" o "quireños" (*Cyttaria* spp., discomycetes) un recurso alimenticio nativo del centro y sur de Chile'. *Universum*: 1-17.

Schwarzinger, M., Pollock, B. G., Hasan, O. S. M., Dufouil, C. & Rehm, J. 2018. Contribution of alcohol use disorders to the burden of dementia in France 2008-13: a nationwide retrospective cohort study. *Lancet public health* 3(3): 124-132.

Shi, L. 2016. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International journal of biological macromolecules* 92: 37-48.

Smelcerovic, A., Knežević-Jugović, Z. & Petronijevic, Z. 2008. Microbial polysaccharides and their derivatives as current and prospective pharmaceuticals. *Current pharmaceutical design* 14: 3168-3195.

Solecki, R. S. 1975. Shanidar IV, a neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 190: 880-881.

Sosa, A. L., Acosta, I. & Prince, M. J. 2012. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Archives of medical research* 43(8): 600-608.

Stuart, B. 2005. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley & Sons Ltd., New York. 224pp.

- Sun, H.-H., Mao, W.-J., Chen, Y., Guo, S.-D., Li, H.-Y., Qi, X.-H., Chen, Y.-L. & Xu, J. 2009. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydrate polymers* 78: 117-124.
- Sun, Y., Huang, W.-m., Tang, P.-c., Zhang, X., Zhang, X.-y., Yu, B.-c., Fan, Y.-Y., Ge, X.-q. & Zhang, X.-L. 2020. Neuroprotective effects of natural cordycepin on LPS-induced Parkinson's disease through suppressing TLR4/NF- κ B/NLRP3-mediated pyroptosis. *Journal of functional foods* 75: 104274.
- Sun, X. Z., Liao, Y., Li, W. & Guo, L. M. 2017. Neuroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *Neural regeneration research* 12(6): 953-958.
- Terho, T. & Hartiala, K. 1971. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans. *Analytical biochemistry* 41(2): 471-476.
- van Tonder, A., Joubert, A. M. & Cromarty, A. D. 2015. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes* 8: 47.
- Wang, D., Wang, J., Wang, D., Yu, X., Olatunji, O. J., Ouyang, Z. & Wei, Y. 2018. Neuroprotective effects of butanol fraction of *Cordyceps cicadae* on glutamate-induced damage in PC12 cells involving oxidative toxicity. *Chemistry & biodiversity* 15(1).
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q. & Xie, M. 2016. Reviews on mechanisms of In vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016: 5692852.
- Wang, T., McFarlane, H. E. & Persson, S. 2016. The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. *Journal of experimental botany* 67(2): 543-552
- Wang, X.-M., Zhang, J., Wu, L.-H., Zhao, Y.-L., Li, T., Li, J.-Q., Wang, Y.-Z. & Liu, H.-G. 2014. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food chemistry* 151: 279-285.

- Wang, X., Zhang, Z., Yao, Z., Zhao, M. & Qi, H. 2013. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. *International journal of biological macromolecules* 58: 225-230.
- Wang, Y.-X., Xin, Y., Yin, J.-Y., Huang, X.-J., Wang, J.-Q., Hu, J.-L., Geng, F. & Nie, S.-P. 2022. Revealing the architecture and solution properties of polysaccharide fractions from *Macrolepiota albuminosa* (Berk.) Pegler. *Food chemistry* 368: 130772.
- Wasser, S. P. & Weis, A. L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical reviews in immunology* 19(1): 65-96.
- Wasser, S. P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology* 89(5): 1323-1332.
- Wei, Y.-M., Yang, L., Mei, W.-L., Chen, H.-Q., Cai, C.-H., Li, W., Dong, W.-H., Chen, Z.-B. & Dai, H.-F. 2022. Phenolic compounds from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Natural product research* 36(9): 2413-2417.
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M. & Malek, K. 2017. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica acta part a: Molecular and biomolecular spectroscopy* 185: 317-335.
- Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M. & Winblad, B. 2013. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers dement* 9(1): 1-11.
- World health organization. 2006. *Neurological disorders: public health challenges*. World health organization, Ginebra. 218pp.
- Wu, H. Y., Hudry, E., Hashimoto, T., Kuchibhotla, K., Rozkalne, A., Fan, Z., Spires-Jones, T., Xie, H., Arbel-Ornath, M., Grosskreutz, C. L., Bacskai, B. J. & Hyman, B. T. 2010. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *The journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience* 30(7): 2636–2649.

- Xie, J.-H., Wang, Z.-J., Shen, M.-Y., Nie, S.-P., Gong, B., Li, H.-S., Zhao, Q., Li, W.-J. & Xie, M.-Y. 2016. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. *Food hydrocolloids* 53: 7-15.
- Xiong, C., Li, Q., Chen, C., Chen, Z. & Huang, W. 2016. Neuroprotective effect of crude polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella importuna* against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy* 83: 569-576.
- Yadav, S. K., Ir, R., Jeewon, R., Doble, M., Hyde, K. D., Kaliappan, I., Jeyaraman, R., Reddi, R. N., Krishnan, J., Li, M. & Durairajan, S. S. K. 2020. A mechanistic review on medicinal mushrooms-derived bioactive compounds: Potential mycotherapy candidates for alleviating neurological disorders. *Planta medica* 86(16): 1161-1175.
- Yan, Y. & Wang, C. 2006. A β 42 is more rigid than A β 40 at the C terminus: Implications for A β aggregation and toxicity. *Journal of molecular biology* 364(5): 853-862.
- Yang, Z. & Kong, F. 2013. Abiotic factors in colony formation: effects of nutrition and light on extracellular polysaccharide production and cell aggregates of *Microcystis aeruginosa*. *Chinese journal of oceanology and limnology* 31(4): 796-802.
- Yin, D., Sun, X., Li, N., Guo, Y., Tian, Y. & Wang, L. 2021. Structural properties and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using various methods. *Process biochemistry* 111: 201-209.
- Yuan, P., Condello, C., Keene, C. D., Wang, Y., Bird, T. D., Paul, S. M., Luo, W., Colonna, M., Baddeley, D. & Grutzendler, J. 2016. TREM2 haploinsufficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. *Neuron* 90(4): 724-739.
- Zhang, H., Cao, Y., Chen, L., Wang, J., Tian, Q., Wang, N., Liu, Z., Li, J., Wang, N., Wang, X., Sun, P. & Wang, L. 2015. A polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* attenuates amyloid- β -induced neurotoxicity in PC12 cells. *Carbohydrate polymers* 117: 879-886.

- Zhang, J., An, S., Hu, W., Teng, M., Wang, X., Qu, Y., Liu, Y., Yuan, Y. & Wang, D. 2016. The neuroprotective properties of *Hericium erinaceus* in glutamate-damaged differentiated PC12 cells and an Alzheimer's disease mouse model. *International journal of molecular sciences* 17(11): 1810.
- Zhang, Z., Wang, S., Tan, H., Yang, P., Li, Y., Xu, L., Duan, B. & Liu, Y. 2022. Advances in polysaccharides of natural source of the anti-Alzheimer's disease effect and mechanism. *Carbohydrate polymers* 296: 119961.
- Zhong, Q., Wei, B., Wang, S., Ke, S., Chen, J., Zhang, H. & Wang, H. 2019. The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. *Marine drugs* 17(12).
- Zou, C.-X., Dong, S.-H., Hou, Z.-L., Yao, G.-D., Lin, B., Huang, X.-X. & Song, S.-J. 2020. Modified lanostane-type triterpenoids with neuroprotective effects from the fungus *Inonotus obliquus*. *Bioorganic chemistry* 105: 104438.
- Zou, C. X., Wang, X. B., Lv, T. M., Hou, Z. L., Lin, B., Huang, X. X. & Song, S. J. 2020. Flavan derivative enantiomers and drimane sesquiterpene lactones from the *Inonotus obliquus* with neuroprotective effects. *Bioorganic chemistry* 96: 103588.