

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



TESIS DOCTORAL

**Nuevas formulaciones orales de un compuesto correlacionado
de hexosa activa (AHCC) y su actividad en un modelo
experimental parasitario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Liliana Bautista Chávez

Directores

Juan José Torrado Durán
Hajime Fujii
Juan José García Rodríguez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**Nuevas formulaciones orales de un
Compuesto Correlacionado de Hexosa
Activa (AHCC) y su actividad en un
modelo experimental parasitario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Liliana Bautista Chávez

Directores:

Dr. Juan José Torrado Durán
Dr. Hajime Fujii
Dr. Juan José García Rodríguez

MADRID, 2015

Tesis Doctoral

Nuevas formulaciones orales de un Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa (AHCC) y su actividad en un modelo experimental parasitario

Liliana Bautista Chávez



Directores:

Dr. Juan José Torrado Durán

Dr. Hajime Fujii

Dr. Juan José García Rodríguez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Madrid, 2015

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han prestado su apoyo, tanto a nivel profesional como personal, durante todos estos años de doctorado, sin las cuáles no hubiera sido posible cumplir con esta meta.

Particularmente dar las gracias a mi familia por todo su apoyo durante estos años, gracias padres por ayudarme a cumplir este sueño, aún recuerdo todos aquellos trámites que me ayudaron a realizar para obtener el visado de estudios, con el cuál pude viajar a España y empezar con mis estudios de doctorado. Darles inmensamente las gracias por ayudarme siempre, a pesar de la distancia, siempre los he llevado conmigo en los buenos y no tan buenos momentos.

Quiero también dar las gracias al Dr. Juan José Torrado Durán por sus enseñanzas, orientación, apoyo, confianza y paciencia durante todos estos años, he aprendido mucho de ti. Hago extensivo mi agradecimiento al Dr. Hajime, director de la empresa japonesa Amino Up Chemical por toda su colaboración y ayuda, esta tesis es el resultado de un trabajo de colaboración entre esta empresa y la facultad de Farmacia de la universidad Complutense de Madrid. Y también agradecer al Dr. Juan José García por guiarme con los experimentos de parasitología.

Asimismo, agradecer a todos los profesores del Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, que me han acompañado durante todos estos años, en especial a Susana Torrado, Paloma Ballesteros, Paloma de la Torre, Covadonga, Ana, Santiago Torrado.

No puedo olvidarme de dar las gracias a mis compañeros del departamento con los que he compartido tantos momentos a lo largo de estos años de tesis. Gracias por su amistad y cariño, por haber hecho que me sintiera como en casa. Mi estancia en el laboratorio ha finalizado pero durante esta etapa he conocido a grandes personas, que ya no están pero de las cuáles conservo su amistad, gracias

Helga y Loly por su ayuda y consejos durante el tiempo que coincidimos en el laboratorio.

A todas las personas que aún siguen en el laboratorio, en especial a Carmencita, gracias querida rubia por todos los momentos compartidos. También a Claudia y Anita, gracias chicas por su amistad, por los coffees y por regalarme una sonrisa. No podía olvidarme de mi gran amiga griega, Ioanna, gracias guapísima por todo.

A Ingrita, gracias peque por ser la mejor hermana que puedo tener, hemos compartido tantas experiencias juntas en Madrid, siempre has estado cerca en los buenos y no tan buenos momentos.

No podía dejar de dar las gracias a mi querida abuela Leoncia, aunque físicamente ya no estes aquí, tú siempre estas presente en mis pensamientos y en mi corazón. Sé que siempre guías mis pasos.

Gracias tía Lulú por acordarte siempre de tu sobri durante todos estos años aquí en Madrid.

A Jose:

Eres el mejor novio, compañero y amigo que la vida ha puesto en mi camino.

Muchísimas gracias por apoyarme siempre en todo.

***Cuando quieres algo,
todo el universo conspira
para que realices tu
deseo.***

Paulo Coelho

El Alquimista

Índice

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abreviaturas..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO..... | 11 |
| 1. PARTE TEÓRICA..... | 17 |
| 1.1. AHCC..... | 20 |
| 1.1.1. Composición química del AHCC..... | 20 |
| 1.1.2. Componentes activos del AHCC..... | 22 |
| 1.1.3. Proceso de fabricación del AHCC..... | 23 |
| 1.1.3.1. Cultivo líquido empleado en el proceso de fabricación del AHCC..... | 25 |
| 1.1.4. Aspecto y propiedades fisicoquímicas del AHCC..... | 25 |
| 1.1.5. Formas sólidas de AHCC..... | 25 |
| 1.1.6. Seguridad del AHCC..... | 26 |
| 1.1.7. Relevancia clínica..... | 29 |
| 1.1.7.1. Cáncer..... | 30 |
| 1.1.7.2. Enfermedades virales..... | 45 |
| 1.1.7.3. Infecciones bacterianas y fúngicas..... | 49 |
| 1.1.7.4. Inflamación intestinal..... | 52 |
| 1.1.7.4.1. Flora intestinal..... | 52 |
| 1.1.7.4.2. Enfermedad inflamatoria intestinal..... | 54 |
| 1.1.7.5. Patologías hepáticas..... | 57 |
| 1.1.7.6. Sistema inmune..... | 59 |

| | |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.2. <i>Trichinella spiralis</i> | 60 |
| 1.2.1. Ciclo biológico de <i>Trichinella spp.</i> | 62 |
| 1.2.1.1. Fase intestinal..... | 64 |
| 1.2.1.2. Fase migratoria..... | 65 |
| 1.2.1.3. Fase muscular..... | 66 |
| 1.2.2. <i>Trichinella</i> en ratón como modelo experimental...68 | |
| 2. PARTE EXPERIMENTAL..... | 69 |
| 2.1. Caracterización del AHCC..... | 71 |
| 2.1.1. Análisis organoléptico..... | 72 |
| 2.1.2. Cuantificación del AHCC por espectrofotometría..... | 72 |
| 2.1.2.1. Validación del método espectrofotométrico..... | 72 |
| 2.2. Desarrollo de formulaciones orales de AHCC..... | 78 |
| 2.2.1. Cápsulas con AHCC..... | 78 |
| 2.2.1.1. Mezcla directa de componentes..... | 79 |
| 2.2.1.2. Granulación con etanol..... | 81 |
| 2.2.1.3. Estudios de estabilidad..... | 83 |
| 2.2.2. Comprimidos con AHCC..... | 87 |
| 2.2.2.1. Primera fórmula..... | 88 |
| 2.2.2.2. Segunda fórmula..... | 90 |
| 2.2.2.3. Tercera fórmula..... | 91 |
| 2.2.3. Sobres con AHCC..... | 93 |
| 2.2.3.1. Primeros estudios de estabilidad..... | 98 |
| 2.2.3.2. Efecto del diluyente y de la dosis de AHCC..... | 100 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.3.3. Elaboración de lotes piloto..... | 104 |
| 2.2.3.4. Efecto del diluyente en la estabilidad..... | 108 |
| 2.2.3.5. Estudios de estabilidad lotes piloto..... | 111 |
| 2.2.3.6. Desarrollo método HPLC G1..... | 114 |
| 2.2.3.7. Estudio de estabilidad comparativo..... | 118 |
| 2.3. Estudios <i>in vitro</i> de velocidad de disolución..... | 118 |
| 2.3.1. Características del ensayo..... | 120 |
| 2.4. Caracterización <i>in vivo</i> del AHCC..... | 124 |
| 2.4.1. Estudio químico de biodisponibilidad..... | 124 |
| 2.4.1.1. Glucemia..... | 124 |
| 2.4.1.2. Análisis químico de G1, isomaltol y adenosina... | 125 |
| 2.4.2. Actividad antiparasitaria en <i>T. spiralis</i> | 138 |
| 2.4.2.1. Descripción y optimización..... | 139 |
| 2.4.2.2. Efecto de diferentes dosis y bioequivalencia farmacodinámica..... | 140 |
| 2.4.2.3. Efecto inmunológico..... | 142 |
| 3. RESULTADOS..... | 145 |
| 3.1. Caracterización del AHCC..... | 147 |
| 3.1.1. Análisis organoléptico..... | 147 |
| 3.1.2. Cuantificación del AHCC por espectrofotometría... | 147 |
| 3.1.2.1. Validación del método espectrofotométrico.. | 147 |

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2. Desarrollo de formulaciones orales de AHCC..... | 156 |
| 3.2.1. Cápsulas con AHCC..... | 156 |
| 3.2.1.1. Mezcla directa de componentes..... | 156 |
| 3.2.1.2. Granulación con etanol..... | 159 |
| 3.2.1.3. Estudios de estabilidad..... | 160 |
| 3.2.2. Comprimidos con AHCC..... | 170 |
| 3.2.2.1. Primera fórmula..... | 170 |
| 3.2.2.2. Segunda fórmula..... | 171 |
| 3.2.2.3. Tercera fórmula..... | 172 |
| 3.2.3. Sobres con AHCC..... | 173 |
| 3.2.3.1. Primeros estudios de estabilidad..... | 175 |
| 3.2.3.2. Efecto del diluyente y de la dosis de AHCC..... | 178 |
| 3.2.3.3. Elaboración de tres lotes de sobres..... | 178 |
| 3.2.3.4. Efecto del diluyente en la estabilidad..... | 182 |
| 3.2.3.5. Estudios de estabilidad lotes piloto..... | 184 |
| 3.2.3.6. Estudio de estabilidad comparativo..... | 196 |
| 3.3. Estudios <i>in vitro</i> de velocidad de disolución..... | 201 |
| 3.4. Características <i>in vivo</i> | 204 |
| 3.4.1. Estudio químico de biodisponibilidad..... | 204 |
| 3.4.1.1. Glucemia..... | 204 |
| 3.4.1.2. Análisis químico de G1, isomaltol y adenosina... .. | 206 |
| 3.4.2. Actividad antiparasitaria en <i>T. spiralis</i> | 207 |

| | | |
|----|---------------------------------|-----|
| 4. | DISCUSIÓN FINAL | 219 |
| 5. | CONCLUSIONES | 231 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 235 |
| 7. | RESUMEN EN ESPAÑOL | 269 |
| 8. | RESUMEN EN INGLÉS | 277 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ACN | Acetonitrilo |
| AHCC | Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa |
| AHCC-FD | Polvo liofilizado |
| AHCC-FG | Gránulos finos |
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| ALP | Fosfatasa alcalina |
| Ara-C | Arabinósido de citosina |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| BALB/c | Cepa ratón albino |
| BoHV-1 | Herpesvirus Bovino 1 |
| CDDP | Cis-diaminodicloroplatino |
| DL50 | Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población |
| DL100 | Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 100% de la población |
| DLP | Doxorrubicina liposomal pegilada |
| EDTA | Ácido etildiaminotetraacético |
| EII | Enfermedad inflamatoria intestinal |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FDA | Agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos |
| G₁ | Glucósido soluble conteniendo isomaltol |
| G-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos |

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GLP | Buenas prácticas de laboratorio |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos |
| GMPs | Buenas prácticas de fabricación (aplicables a medicamentos, cosméticos y alimentos) |
| H1N1 | Virus de la influenza |
| H5N1 | Virus de la influenza avian |
| HA | Hembra adulta |
| HACCP | Análisis de riesgos y de puntos críticos de control |
| HED | Dosis equivalente en humanos |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| HPMC | Hidroxipropil metil celulosa |
| HR | Humedad relativa |
| ICH | Conferencia internacional sobre armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano |
| IFN-γ | Interferón gamma |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa inducible |
| IR | Infrarrojo |
| ISO | Organización internacional de estandarización |
| L1 | Larva infestante 1 |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| LNH | Linfoma no hodgkin |
| LRN | Larva recién nacida |
| MA | Macho adulto |

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------|
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilcilina |
| MTX | Metotrexato |
| NK | Célula asesina natural |
| NOAEL | Nivel sin efecto adverso observable |
| ON | Óxido nítrico |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PSA | Antígeno prostático específico |
| PV-1 | Polivirus tipo 1 |
| RP-HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa |
| RSD | Desviación estándar relativa |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SLS | Lauril sulfato sódico |
| Th | Células T helper |
| TNBS | Trinitrobenceno sulfónico |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| USP | Farmacopea de los Estados Unidos |
| UV | Ultravioleta |
| VHC | Virus de la hepatitis C |
| VNO | Virus del Nilo Occidental |

Introducción

En el año 2015 se oferta por primera vez en la Universidad Complutense un doble grado en Farmacia y Nutrición. Sirva este dato como un buen ejemplo de hasta qué punto se extiende la relación entre lo que comemos y cómo comemos en nuestra salud. Si siempre ha estado claro que una buena salud comienza con la alimentación, hoy hay un gran interés en el respaldo científico que avale esa relación. Intentar aprovechar qué tipo de alimentos pueden beneficiar nuestra salud tiene repercusiones importantes en la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades.

Por otro lado, en los últimos años han aparecido intereses industriales y económicos en la comercialización de complementos alimenticios y alimentos funcionales. Ambos productos exceden el campo de la alimentación y entran muy claramente en el terreno de la Salud. Otro ejemplo son muchos productos de vitaminas que han salido del ámbito de los medicamentos y que actualmente se comercializan como complementos alimenticios. Podríamos plantearnos la duda de si han dejado de ser medicamentos y qué garantías de calidad respaldan estos nuevos productos. Esta es una cuestión que los inspectores de alimentos dependientes de las Comunidades Autónomas se plantean con relación a algunos de estos productos y que tiene una regulación cada vez más estricta (Real Decreto 1487/2009).

Las razones por las que la administración y las industrias alimentaria y farmacéutica están siguiendo esta estrategia es en nuestra opinión y en un primer lugar económica. Al salir de la lista de medicamentos, al menos de los financiados, muchos preparados de vitaminas y complementos nutricionales permiten a los sistemas públicos sanitarios ahorrar dinero. Por otra parte, el registro, la comercialización y el precio de los complementos alimentarios y alimentos funcionales es mucho más fácil, rápido y rentable que los medicamentos convencionales. La posible sensación de indefensión e incluso abusos que podría haber entre los consumidores con algunos de estos nuevos productos se intenta restringir con la aparición de una nueva normativa legal y controles que garanticen la seguridad y controlen la publicidad de estos productos. Por ejemplo, los alimentos funcionales deben tener pruebas científicas que avalen la eficacia de los mismos.

En la medicina tradicional China la salud del organismo se relaciona con la digestión y se da una gran importancia a esta función del organismo. En nuestra medicina occidental actual uno de los avances más importantes que se han producido se basa en la importancia de los microorganismos del tracto digestivo en nuestra salud general. Aparecen así los términos de probióticos y prebióticos y su relación con la salud no sólo del tracto digestivo sino de todo el organismo. Esa relación tiene una importante base inmunológica ya que en nuestro tracto digestivo tenemos aproximadamente el 60% de nuestra actividad inmunológica. La estimulación del sistema inmunológico del tracto digestivo repercute en nuestra salud general. De esta forma el digestivo no es un mero lugar de absorción de nutrientes sino también un lugar de estimulación del sistema inmunológico. Más aún en los últimos años aparece un nuevo concepto, el de inmunomodulador. Los inmunomoduladores son capaces de equilibrar el sistema inmunológico cuando éste se encuentra sobreactuando (por ejemplo en enfermedades inflamatorias autoinmunes del tracto digestivo) o activar su acción para tratar infecciones o la lucha contra células malignas (cáncer). Un reciente ejemplo de uso de algunos de estos agentes como terapia complementaria en el tratamiento del cáncer se ha publicado en la revista *Correo Farmacéutico* (Guillen, 2015).

Entre los productos con actividad inmunomoduladora se encuentran varios hongos. Uno de los más activos es el Shiitake y precisamente un extracto de este hongo es el comercializado como AHCC, siglas en inglés de Active Hexose Correlative Compound traducido como Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa. El producto AHCC está registrado y comercializado en el mundo por la empresa japonesa Amino Up Chemical con base en Sapporo donde tiene unas modernas instalaciones industriales que permiten la producción bajo estrictas normas y siguiendo unos procesos muy estandarizados. A pesar de ser un producto de origen natural el riguroso control de las condiciones de cultivo dan lugar a un producto muy homogéneo y con poca variabilidad entre lotes. El producto final se obtiene tras un proceso de liofilización y este compuesto se protege del ambiente acuoso con la incorporación de excipientes grasos. La comercialización final es en forma de sobres o en cápsulas. Es importante dejar claro que precisamente es en Japón donde en los años 80 del siglo pasado aparece el concepto de alimento funcional (Goldberg, 1994)

En el año 2009 la empresa Amino Up Chemical nos propuso desarrollar formulaciones hidrófilas como alternativa a sus clásicas formulaciones lipídicas e intentar evaluar la estabilidad y biodisponibilidad de estas nuevas formulaciones. Comenzamos así este trabajo de colaboración entre la empresa japonesa Amino Up Chemical y la Universidad Complutense que ha culminado en esta tesis. Es un trabajo muy amplio que abarca la caracterización fisicoquímica de la materia prima inicial, desarrollo de formulaciones orales de cápsulas, comprimidos y sobres. Un aspecto clave al que hemos dado una gran importancia dentro del desarrollo de formulaciones es el estudio de su estabilidad y por último de biodisponibilidad. Parte de este trabajo se ha restringido para salvaguardar los intereses de la empresa y por esta razón no se dan las composiciones detalladas de las mejores formulaciones.

Entre los problemas típicos de los productos naturales y presentes en el AHCC uno de los más importantes, en nuestra opinión el aspecto clave, es el desconocimiento de cuál es el componente activo del producto. Posiblemente varios, por ejemplo en el caso del AHCC su actividad se relaciona con sus polisacáridos entre los que están β -glucanos y α -glucanos, éstos últimos parcialmente acetilados. Normalmente son los α -glucanos parcialmente acetilados y de bajo peso molecular los que se relacionan con su actividad. Este tema se suele tratar en los congresos sobre Nutrición y Medicina (International Congress on Nutrition and Integrative Medicine) que auspicia la empresa Amino Up Chemical en Sapporo. En dichos congresos el profesor Kenji Sato y su grupo de la Graduate School of Life and Environmental Sciences de Kyoto ha presentado varias comunicaciones en 2010 (Suppression of NO and iNOS production in primary cultured hepatocytes by mono-saccharide fraction of AHCC) y 2012 (Adenosine, a hepato-protective compound in AHCC) donde intenta aclarar que fracciones extraídas de AHCC son las activas y su relación con otras sustancias por ejemplo adenosina. Desde el punto de vista de formulación el desconocimiento exacto del compuesto activo dificulta su cuantificación directa y el análisis de su estabilidad química y por lo tanto también de los estudios convencionales de biodisponibilidad química. Esto obliga a hacer estudios indirectos de caracterización química, por ejemplo en base a la cantidad de isomaltol presente en AHCC.

Otro importante problema del compuesto AHCC es cómo medir su actividad en un organismo para poder hacer un estudio de biodisponibilidad farmacodinámica lo que nos condujo a estudiar en un modelo animal su actividad. Estas son las principales cuestiones que se han tratado en este trabajo y que han dado lugar a esta tesis que se presenta.

Aunque esta tesis doctoral está finalizada la línea de investigación del AHCC continúa desarrollando experimentos encaminados a aclarar la acción inmunológica de AHCC.

Objetivos y **Planteamiento**

El AHCC es un complemento alimenticio comercializado en todo el mundo por la compañía japonesa Amino Up Chemical, en forma de sobres y cápsulas. Para algunos consumidores la hidrofobicidad de estas formulaciones puede ser un problema ya que cuando se quiere facilitar su ingesta por dispersión en medio acuoso queda en la superficie del agua sin dispersarse. Incluso pueden formarse agregados, con el potencial problema de comprometer su biodisponibilidad oral, incluso quizás limitando su eficacia. Por esta razón, el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas más hidrófilas permitirían una mejor dispersión del producto en medio acuoso mejorando sus propiedades fisicoquímicas y en última instancia su eficacia.

Los **objetivos principales** del trabajo de investigación desarrollado en esta tesis doctoral han estado dirigidos a:

- Desarrollar y caracterizar nuevas formulaciones hidrófilas de cápsulas, comprimidos y sobres conteniendo AHCC.
- Estudiar la estabilidad de las formulaciones desarrolladas según las directrices ICH.
- Estudiar la biodisponibilidad *in vivo* de las formulaciones orales de AHCC desarrolladas.

Para cumplir con estos objetivos principales hemos planteado el trabajo experimental para conseguir cumplir los siguientes objetivos secundarios:

- Diseñar, desarrollar y validar un método sencillo de análisis espectrofotométrico para cuantificar AHCC.
- Optimizar un método de análisis del AHCC mediante cromatografía líquida.

- Evaluar la biodisponibilidad *in vitro* de formulaciones de AHCC, empleando la Celda de Flujo Continuo (método 4 de Farmacopea Europea).
- Estudiar de forma preliminar la biodisponibilidad *in vivo* del AHCC realizando experimentos en voluntarios sanos y analizando sus correspondientes muestras biológicas por cromatografía líquida.
- Investigar la farmacocinética del AHCC realizando varios experimentos *in vivo* en un modelo de ratón con el fin de obtener un perfil farmacocinético del AHCC.
- Estudiar la eficacia del AHCC en un modelo parasitario de ratón, basado en los mecanismos de sinergia entre un fármaco antihelmíntico y un complemento alimenticio.

El planteamiento del trabajo experimental de esta tesis doctoral se ha desarrollado de la siguiente manera:

- **Validación de un método analítico por espectrofotometría del AHCC.** Para ello, se diseñó un método sencillo de análisis que nos permitía cuantificar el AHCC por espectrofotometría UV-Visible.
- **Desarrollo de formulaciones hidrófilas de AHCC que tengan buenas propiedades organolépticas, de estabilidad y farmacotécnicas.** Se desarrollan formulaciones de cápsulas, comprimidos y sobres (granulado para reconstituir) con AHCC.
- **Elaboración de lotes piloto de sobres de AHCC, protocolos de fabricación y su correspondiente estudio de estabilidad según las directrices ICH.** Se elaboran formulaciones con distintas dosis y se evalúan sus características farmacotécnicas.

- **Estudio de la biodisponibilidad *in vitro* de formulaciones orales de AHCC** empleando la Celda de Flujo Continuo (método 4 de la Farmacopea Europea) y comparación de dos tipos de AHCC uno hidrófobo y otro hidrófilo.
- **Desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida que nos permita una determinación cualitativa y cuantitativa del AHCC.** Se desarrollaron y validaron distintos métodos dependiendo de los compuestos a analizar.
- **Estudio de la biodisponibilidad *in vivo* de formulaciones hidrófilas de AHCC.** Nos centramos en estudiar el perfil farmacocinético del AHCC a través de varios experimentos realizados en voluntarios sanos y en roedores, evaluando parámetros como la dosis, vía e intervalo de administración.
- **Evaluación de la eficacia del AHCC en un modelo experimental de ratón infectado con *Trichinella spiralis*,** hemos estudiado el efecto dosis - respuesta a nivel intestinal de diferentes formulaciones de AHCC.
- **Efecto inmunológico del AHCC en el modelo experimental de ratón con *T. spiralis*,** desarrollamos este estudio con la finalidad de estudiar la eficacia del AHCC en el modelo de infección con *T. spiralis*.

1. Parte teórica

1. PARTE TEÓRICA

AHCC, son las siglas en inglés, para denominar a un “Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa”. El AHCC, es un suplemento nutricional usado para reforzar el sistema inmune en Japón (donde es ampliamente conocido y se lleva usando desde hace muchos años), y también es consumido en otros países asiáticos tales como: China, Corea, Tailandia. En Estados Unidos se comercializa como suplemento dietético y es utilizado por centros médicos importantes. Parte de esta gran aceptabilidad, se debe a la numerosa investigación científica dedicada al AHCC en todo el mundo.

El AHCC, fue desarrollado en Septiembre de 1987, mediante una investigación básica realizada por el profesor honorario Dr. Toshihiko Okamoto de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Tokio y Amino Up Chemical Co. Ltd. (Pescatore, 2010). Este compuesto, es una marca registrada de Amino Up Chemical Co. Ltd., como un alimento funcional a base de hongos (Milner, 2000; Roberfroid, 2000; Matsui y cols., 2002) que podría ser utilizado como una ayuda terapéutica para las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, incluidas las enfermedades del hígado, la diabetes; y en particular su uso como soporte en la inmunidad en pacientes con cáncer (Pescatore, 2010).

Los consumidores a menudo utilizan el AHCC como una terapia complementaria para el tratamiento del cáncer, y en algunos casos, como una alternativa al tratamiento convencional del cáncer (de Vere White y cols., 2002; de Vere White y cols., 2004).

En una encuesta realizada por un grupo de investigación del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón, el AHCC aparece como un alimento saludable comúnmente utilizado en pacientes japoneses con cáncer (Hyodo y cols., 2005).

Estudios recientes han demostrado la eficacia del AHCC en el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas, así como también en el tratamiento del

cáncer, utilizado como terapia complementaria en instituciones médicas importantes (Miura y cols., 2010).

1.1. AHCC

Es un derivado natural obtenido de un micelio de setas comestibles, cultivado en un medio líquido. Es un extracto de Shiitake (*Lentinus edodes*) de la familia de los hongos Basidiomicetos. El cultivo de estos micelios a gran escala se utiliza como una de las materias primas para la elaboración del AHCC (Pescatore, 2010). Este Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa, contiene una mezcla de polisacáridos, aminoácidos, lípidos y minerales (Ritz, 2008; Kidd, 2000). Siendo los oligosacáridos, el componente más abundante de su estructura, aproximadamente el 74% del peso en seco. De estos oligosacáridos, casi el 20% son parcialmente acetilados (α -1,4-glucanos), de bajo peso molecular, aproximadamente 5000 Da; este es el principal componente activo del AHCC (Matsushita y cols., 1998; Burikhanov y cols., 2000). Existen numerosos estudios experimentales que describen la actividad biológica aunque gran parte de sus mecanismos de acción están por aclarar.

1.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AHCC

El AHCC, es un polvo liofilizado que contiene abundantes hidratos de carbono (mayoritariamente polisacáridos) en comparación con otros hongos: agaricus (*Agaricus blazei Murill*) y shiitake seco (*Lentinus edodes*); como muestra la Tabla 1 (Hosokawa y cols., 2003).

El β -glucano, sustancia derivada de los hongos Basidiomicetos, es conocido como el ingrediente fisiológicamente activo (Furukawa, 1992). Sin embargo, el AHCC difiere sustancialmente de otros hongos y productos alimenticios derivados de hongos en que solo contiene 2% de β -glucanos pero una gran cantidad de α -glucanos. En particular el α -1,4-glucano que se encuentra parcialmente acetilado (Hosokawa y cols., 2003). El AHCC es un glucósido, compuesto por una serie de

cadena de azúcares (polisacáridos) unidos a un furano natural llamado Isomaltol (Amino Up Chemical Co. Ltd., 2009).

Tabla 1. Comparación nutricional del AHCC con otros hongos (Hosokawa y cols., 2003).

| Análisis general de ingredientes nutricionales y contenido de Glucano | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------|
| | AHCC Polvo Liofilizado (%) | Agaricus Agaricus Blazei Murill (%) | Shiitake seco Lentinus edodes (%) | Método de análisis |
| Proteínas | 13,1 | 40-45 | 19,3 | Kjeldahl |
| Grasas | 2,2 | 3-4 | 3,7 | Descomposición de ácido |
| Carbohidratos | 71,2 | 38-45 | 59,2 | Según balance |
| Fibra dietética | 2,1 | 6-8 | 10,0 | Enzimático-Gravimétrico |
| Contenido de cenizas | 8,9 | 5-7 | 3,9 | Incineración directa |
| β-glucanos | 0,2 | 11,4 | 3,5 | Enzimático, ELISA |

EL AHCC polvo liofilizado o llamado también AHCC-FD, se utiliza en la obtención de los gránulos de AHCC-FG. La Tabla 2, muestra los componentes del fino granulado de AHCC-FG. Cabe mencionar que los carbohidratos que contiene, forman la mayor parte de su estructura. Estos carbohidratos, en su mayoría son polisacáridos, conteniendo β -glucanos y α -glucanos. La actividad del AHCC se atribuye a la presencia de estos α -glucanos de bajo peso molecular en su estructura (Pescatore, 2010).

Tabla 2. Componentes del granulado de AHCC, analizado por Hokkaido Pharmaceutical Association's Public Health Inspection Center (Pescatore, 2010).

| COMPONENTES DE LOS GRÁNULOS DE AHCC | |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Componentes | Análisis componencial por 100 g |
| Descripción | Gránulos muy finos, de color marrón claro, con olor y sabor. |
| Hidratos de carbono | 44, 0 g |
| Grasas | 37, 3 g |
| Proteínas | 7, 2 g |
| Vitamina B ₁ | 0, 3 g |
| Vitamina B ₂ | 0, 3 g |
| Niacina | 0, 3 g |
| Fibra dietética | 5, 7 g |
| Minerales | 4, 5 g |
| Sodio | 550 mg |
| Potasio | 1, 200 mg |
| Contenido de agua | 1, 3 g |

1.1.2. COMPONENTES ACTIVOS DEL AHCC

El AHCC, tiene como ingredientes principales en su estructura, α -glucanos (α -1,4-glucanos) y β -glucanos (β -1,3-glucanos). Cuya diferencia entre ambos es el tipo de enlace que une a sus moléculas de glucosa. Nuestro organismo no contiene enzimas para digerir los β -glucanos, pero sí segrega la enzima α -amilasa, que digiere los α -glucanos. Los α -glucanos (α -1,4-glucanos), que forman parte del AHCC (Figura 1), están parcialmente acetilados y constituyen un elemento específico para el AHCC. Estos α -1,4-glucanos acetilados de bajo peso molecular

(alrededor de 5000 Da), muestran una directa acción sistémica inmunopotenciadora después de ser digeridos y absorbidos (Pescatore, 2010).

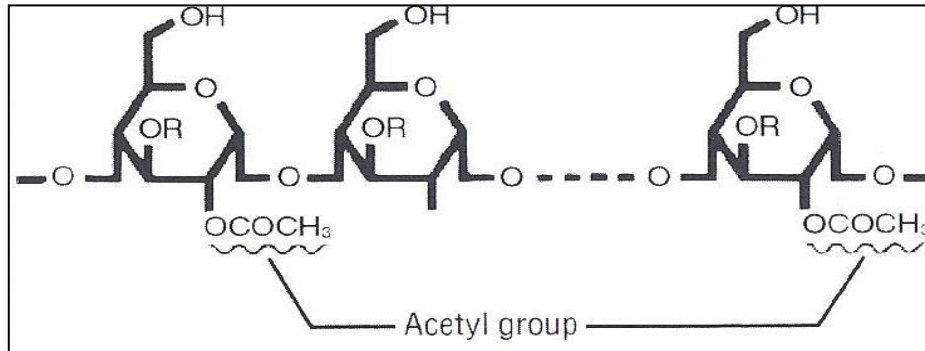


Figura 1. Componente activo del AHCC, α -1,4-glucano acetilado (adaptado de Pescatore, 2010).

1.1.3. PROCESO DE FABRICACIÓN DEL AHCC

El AHCC se obtiene mediante un proceso de cultivo, extracción y purificación desarrollado y patentado por la empresa japonesa Amino Up Chemical Co. Ltd. El AHCC es un complemento dietético que se fabrica siguiendo el mismo nivel de control de calidad que un producto farmacéutico. El fabricante utiliza las Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practice, GMP's) en el proceso de fabricación y control de calidad del AHCC. También se adhieren a los estándares internacionales de calidad y seguridad incluyendo el sistema HACCP, sistema que garantiza la inocuidad de los alimentos mediante un Análisis de Riesgos y de Puntos Críticos de Control (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP) y Certificaciones de la Organización Internacional de Estandarización (International Standardization Organization, ISO). El cumplimiento de todos estos procedimientos garantiza la calidad del producto final.

El proceso de fabricación del AHCC, se basa en un cultivo de *Lentinus edodes*, hongo de la familia de los basidiomicetos, en un medio líquido a largo plazo. Esta primera etapa es la fermentación, durante la cuál se produce una reacción enzimática debido a las enzimas que genera este hongo en el medio de cultivo.

Después se procede a separar el líquido del tanque de fermentación, el cuál se concentra, esteriliza y finalmente se liofiliza. En la figura 2, se detalla el proceso de fabricación de este Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa.

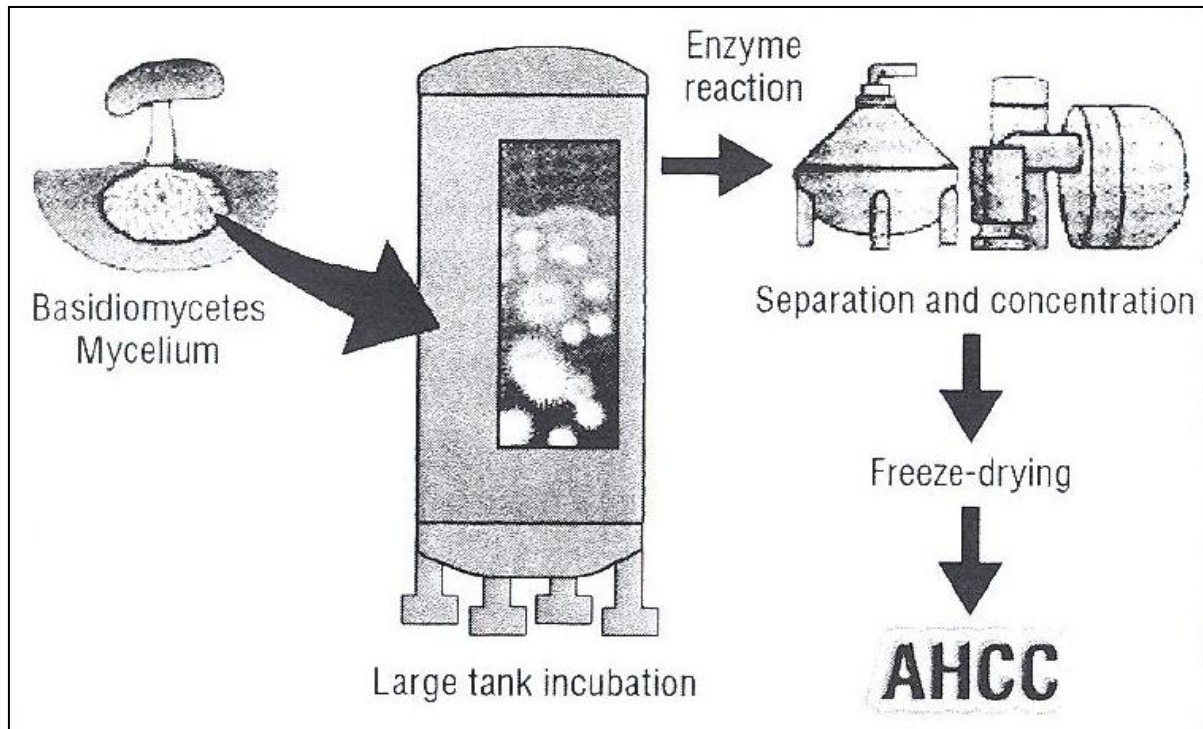


Figura 2. Esquema de fabricación del AHCC, desde el cultivo (micelio de basidiomicetos) hasta la liofilización (adaptado de Pescatore, 2010).

El **AHCC líquido**, obtenido en estos tanques de fermentación mediante un cultivo de hongos, representa un 46% del total. A este líquido se le incorpora α -ciclodextrina (11,2%), más maltodextrina (2,8%) y luego se liofiliza. El polvo liofilizado es el **AHCC-FD** (60%), al cuál se le añade una celulosa (5%) y un lubricante (35%); así obtenemos los gránulos de **AHCC-FG**. Por lo tanto la formulación final **AHCC-FG**, contiene un 54% de excipientes y 46% de AHCC líquido. El **AHCC-FG** representa el 60% de **AHCC-FD** polvo liofilizado y 40% de excipientes.

El **AHCC-FD** (polvo liofilizado, de color marrón) y el **AHCC-FG** (finos gránulos de color marrón claro), son formulaciones producidas por Amino Up Chemical Co. Ltd.

La formulación **AHCC-FG**, se reformula a partir de **AHCC-FD** polvo liofilizado más la incorporación de excipientes, obteniéndose un producto insoluble en agua, cuyos excipientes no plantean preocupaciones toxicológicas (Fujii y cols., 2011).

1.1.3.1. Cultivo líquido empleado en el proceso de fabricación del AHCC

Este medio de cultivo líquido es un extracto de *Lentinus edodes* de la familia de los hongos Basidiomicetos. Se empleó un medio de cultivo líquido adecuado para su crecimiento, utilizando fuentes de carbono y nitrógeno. Este cultivo se realiza de acuerdo a cultivos de aireación para microorganismos en medios de temperatura ordinaria, en un rango de pHs comprendido entre 2 y 6; a una temperatura de 10 a 45°C, siendo preferible una temperatura de 15 a 30°C. Después del cultivo, se procede a separar el líquido del sólido, este líquido se utiliza en el siguiente paso de la fabricación del AHCC (Pescatore, 2010).

1.1.4. ASPECTO Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL AHCC

El AHCC es un polvo liofilizado (AHCC-FD), de color marrón, que presenta un olor y sabor característico, higroscópico (con un contenido de humedad no mayor del 5%). Insoluble en etanol, acetona, hexano, benceno, cloroformo y éter. Muy soluble en agua, en solución acuosa tiene un pH de 3,7-4,5 (Fujii y cols., 2011).

1.1.5. FORMAS SÓLIDAS CON AHCC

Actualmente existen comercializados, cápsulas y sobres de AHCC, utilizados como complementos alimenticios. Este alimento funcional a base de hongos, posee propiedades inmunomoduladoras, demostradas por extensa investigación experimental y clínica. Debido a estas propiedades, se utiliza como coadyuvante en la terapia de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, enfermedades del hígado y tiene particular interés como ayuda al sistema inmunitario de pacientes con

cáncer. La figura 3, muestra las diferentes formas de administración oral del AHCC, algunas de estas formas farmacéuticas se encuentran en fase de desarrollo.



Figura 3. Formas sólidas de administración oral del AHCC.

1.1.6. SEGURIDAD DEL AHCC

El AHCC es un producto seguro. La materia prima utilizada en su fabricación es el Shiitake (*Lentinus edodes*), hongo basidiomiceto comestible, que lleva consumiéndose durante varios años (Miura y cols., 2010). En su investigación se siguen las Buenas Prácticas de Laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP) para las pruebas de toxicidad en los ensayos con animales de experimentación.

Además de las pruebas de toxicidad general, utiliza las normas aplicadas para las pruebas de toxicidad especiales tales como: pruebas de reproducción, pruebas de carcinogénesis, pruebas de dependencia. Los estudios de seguridad que se han

llevado a cabo desde el inicio del desarrollo de AHCC muestran que no hay toxicidad en el AHCC. Aunque la ingesta normal de AHCC es 1 g/día (dosis preventiva), 1-3 g/día (dosis de mantenimiento) y 3-6 g/día (dosis en pacientes con cáncer). En ensayos realizados en ratas se administraron dosis de 600 g/día y no se observaron efectos tóxicos (Pescadore, 2010).

En la práctica clínica, el AHCC-FG es usado con una dosis diaria típica recomendada de 3 g (equivalente a 1,8 g de AHCC-FD polvo liofilizado) aunque algunos médicos recomiendan hasta 6 g de AHCC-FG. Todos los estudios clínicos realizados hasta la fecha en AHCC han utilizado la formulación AHCC-FG, con excepción del estudio en fase I sobre la seguridad del suplemento alimenticio, AHCC, en voluntarios sanos (Spiering y cols., 2007), donde utilizaron la forma líquida del AHCC (Fujii y cols., 2011).

Estudios de genotoxicidad realizados con el AHCC-FD (AHCC polvo liofilizado) utilizando la prueba de Ames, ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos, demostraron que el AHCC-FD en 6 concentraciones ensayadas (5000, 2500, 1250, 625, 313 y 156 $\mu\text{g/placa}$) no aumentó el número de reversiones por placas en ninguna de las cepas de *S. typhimurium* a prueba, en presencia o ausencia de activación metabólica. El AHCC-FD en concentraciones que van de 156 a 5000 $\mu\text{g/placa}$ no fue mutagénico para las cepas del ensayo bajo las condiciones de esta prueba (Fujii y cols., 2011).

Pruebas de toxicidad oral de dosis individual realizadas en ratas (de ambos sexos) determinaron la dosis letal 50 (DL_{50}) para el AHCC-FD mayor de 12,500 mg/Kg de peso corporal de los roedores (Hosokawa y cols., 2003; Fujii y cols., 2011). El producto fue disuelto en agua purificada y administrado por sonda gástrica a los animales. El grupo control solo recibió agua purificada, esta dosis fue seleccionada en base a un estudio preliminar que realizaron con 6 animales (3 ratas de cada sexo). El volumen de dosificación fue (2,5 ml/Kg), y el volumen de dosificación individual se calculó en base a la medida del peso corporal obtenido en el día de administración. No hubo mortalidad en ninguno de los animales, todas las ratas tratadas con esta dosis de prueba mostraron una disminución de su actividad

espontánea poco después de la administración, que fue acompañada de un incremento en la actividad de tomar agua y diarreas; en un caso en particular la orina fue de color marrón (debido al color característico del AHCC-FD polvo liofilizado). En muchos de estos animales los síntomas desaparecieron con el transcurso de las horas en el día de administración (Fujii y cols., 2011).

La investigación de la toxicidad de dosis repetidas durante 90 días, con 3 dosis de prueba (1000 mg, 3000 mg y 6000 mg)/ Kg de peso corporal/ día de AHCC-FD en ratas (de ambos sexos) no produjo cambios notables en el estado general de los animales (peso corporal o el consumo de alimentos en comparación con el grupo control), (Fujii y cols., 2011). Los resultados de esta investigación evidenciaron una disminución en el pH y un incremento de las proteínas en la orina de las ratas. Esta variación del pH en la orina dependiente de la dosis, está relacionada con un efecto fisiológico de la administración dada la naturaleza ácida del AHCC, la reducción del pH de la orina es un fenómeno que se describe después de la administración de sustancias ácidas (Lina y Kuijpers, 2004; Reisinger y cols., 2009). A su vez el incremento de las proteínas en la orina está relacionado con el porcentaje de proteínas presente en el AHCC, entre un 11-14%. Dietas de contenido proteico cercano al 50% aumentan las proteínas en la orina de ratas normales y sanas (Rumsfeld, 1956). La revisión de la histopatología renal de estos ensayos realizada por el Laboratorio General de Patología de Sapporo, Co., de Japón no encontró evidencia de efectos toxicológicos en el riñón relacionados con el tratamiento de AHCC-FD en el riñón, en dosis de hasta 3000 mg/ kg peso corporal/ día. Los resultados hematológicos y oftalmológicos no presentaron complicaciones. Sin embargo, se produce un aumento, leve, pero estadísticamente significativo en los niveles séricos de gammaglobulinas y creatinina en ratas hembras y machos del grupo al que se le administró la máxima dosis de prueba, respectivamente. Además en este grupo se observó una leve hiperplasia de células escamosas del límite de la cresta del estómago acompañada por una ligera hiperqueratosis, en parte pueden estar relacionados con la inflamación gástrica causada por el bajo pH del AHCC. Basándose en los resultados anteriormente mencionados, el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) fue de 3000 mg/ kg de peso corporal/ día de AHCC-FD, para ratas hembras y machos (Fujii y cols., 2011).

La seguridad y tolerabilidad del AHCC en los seres humanos fueron evaluadas en un grupo de 26 adultos sanos (hombres y mujeres), de edades comprendidas entre 18 y 61 años. Los investigadores diseñaron un ensayo clínico de intervención con inclusión y exclusión de criterios, abierto, siguiendo las directrices de la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA), para los ensayos de Fase I. Los voluntarios ingirieron 50 ml de AHCC líquido (equivalente a 3 g de AHCC polvo liofilizado), 3 veces al día durante 14 días. Esta dosis de 150 ml de AHCC líquido, 3 veces al día, es aproximadamente el triple de la dosis estándar utilizada por los pacientes en la práctica clínica. De todos los participantes del ensayo, 2 personas (7%) abandonaron debido a las náuseas y a la intolerancia del líquido, 6 personas (20%) presentaron náuseas, diarrea, distensión abdominal, dolor de cabeza, fatiga, calambres en los pies. A pesar de utilizar esta dosis alta de AHCC, los pacientes no presentaron anomalías significativas en los parámetros de laboratorio, los efectos adversos son mínimos y fue tolerada por un 85% de los sujetos participantes de este ensayo clínico (Spiering y cols., 2007).

1.1.7. RELEVANCIA CLÍNICA DEL AHCC

Estudios experimentales con AHCC en modelos animales y en ensayos clínicos han demostrado que su administración oral tiene una amplia variedad de efectos terapéuticos beneficiosos (debido a sus propiedades inmunomoduladoras). Como agente terapéutico, el AHCC es bien tolerado y en gran parte libre de efectos adversos (Ghoneum y cols., 1995; Kidd, 2000).

Entre los efectos terapéuticos que produce este Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa tenemos: aumento de las enzimas de desintoxicación en el hígado y actividad hepatoprotectora en modelo de ratón con lesión hepática inducida por tetracloruro de carbono (Sun y cols., 1997); prevenir la aparición de diabetes inducida por estreptozotocina en modelos animales (Wakame, 1999), suprimir la apoptosis tímica inducida por dexametasona (Burikhanov y cols., 2000), y actuar como antioxidante para mejorar trastornos endocrinos (Ye y cols., 2004).

1.1.7.1. Cáncer

La quimioterapia sigue siendo un eficaz modo de tratamiento del cáncer, pero suele conllevar muchos efectos secundarios incluyendo toxicidades leves o limitantes de la dosis, tales como alopecia (caída del cabello), mielosupresión, disfunciones gastrointestinales, toxicidades neurológicas, supresión del sistema inmune que a su vez resulta en infecciones y en la proliferación de células cancerígenas (Viale, 2006; Symonds y Foweraker, 2006). Los regímenes de agentes quimioterapéuticos que se utilizan actualmente son citotóxicos y afectan tanto a las células normales como las malignas, la quimioterapia puede ser también administrada conjuntamente con radioterapia para mejorar el efecto terapéutico (Symonds y Foweraker, 2006).

La potencia intrínseca de los agentes citotóxicos y su uso en máxima dosis tolerada hacen de un tratamiento quimioterapéutico un procedimiento de alto riesgo para estos pacientes (Innocenti y Ratain, 2002). Los beneficios de la inclusión del AHCC como coadyuvante en la estrategia de la quimioterapia puede permitir el ajuste de la dosis efectiva de fármacos citotóxicos en la práctica clínica (Aviles y cols., 2003).

Este complemento dietético se utiliza junto con la terapia convencional de fármacos contra el cáncer para reducir los efectos secundarios de los citostáticos, aunque su mecanismo de acción no está claramente definido, atenúa la pérdida de cabello, las náuseas, anorexia y la supresión de la medula ósea, hechos probados en numerosos estudios con animales (Miura y cols., 2010).

Una investigación sobre la compatibilidad de usar AHCC con quimioterapia (Mach y cols., 2008), analizó el metabolismo hepático del AHCC de acuerdo a la inhibición del metabolismo de alto rendimiento del citocromo P450 (*in vitro*) y al potencial de inducción (*in vivo*). Específicamente las isoenzimas del citocromo P450 (CYP3A4, CYP2CB, CYP2C9, CYP2D6), fueron analizadas para determinar la posibilidad de interacciones con otros medicamentos. Los resultados indicaron que el AHCC indujo la formación de CYP450 2D6 lo que sugiere una posible interacción

entre medicamentos del tipo: doxorrubicina, ondansetrón, tamoxifeno, Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina y AHCC. Esta investigación confirma que el AHCC se considera seguro para administrar con la mayoría de agentes quimioterapéuticos que no son metabolizados por la vía del CYP450 2D6 (Ritz, 2011).

Las nuevas tendencias en la terapia del cáncer se basan en tratamientos no tóxicos que ayuden al sistema inmune. Esta inmunoterapia usa “Modificadores de Respuesta Biológica (BRMs)” (Matsui y cols., 2002; Stuelp-Campelo y cols., 2002; Chen y Chang, 2004; Zheng y cols., 2005) y está ganando rápidamente credibilidad en círculos médicos convencionales, especialmente en Japón donde el AHCC a menudo acompaña a los tratamientos principales de cáncer y está considerado ampliamente como el potenciador más fuerte conocido para el sistema inmune como principal modificador de respuesta biológica (Kenner, 2001). La actividad anticancerígena del AHCC se ha atribuido a sus propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes (Ye y cols., 2003; Gao y cols., 2006 y Ye y cols., 2004).

A partir de 1992, Kamiyama realizó ensayos en Japón con la finalidad de evaluar el efecto preventivo del AHCC contra la recurrencia del carcinoma hepatocelular tras una resección quirúrgica (Kamiyama, 1999). Después de la cirugía, 126 pacientes fueron separados en dos grupos: a un grupo de 44 pacientes se les administró 3 gramos por día de AHCC por vía oral, mientras que el otro grupo de 82 pacientes sirvió como grupo control. Desafortunadamente los resultados de este ensayo clínico hasta la fecha sólo han sido publicados en forma de resumen, los investigadores informaron que después de 1 año de tratamiento, el grupo al cuál se le había administrado AHCC mostró una tasa de supervivencia significativamente mayor que el grupo control, así como disminución significativa de ciertos marcadores tumorales en el suero (Kidd, 2000). En otro resumen publicado basado en este mismo estudio, los investigadores afirman que la recurrencia del tumor de hígado no fue menor en el grupo tratado con AHCC, aunque su tasa de supervivencia fue mayor (Kamiyama y cols., 1999). Ellos informaron que los pacientes tratados con AHCC también tenían disminuido significativamente los niveles de marcadores de daño hepático. Entre estos pacientes, se observaron

mejoras significativas en linfocitos, glóbulos rojos, en el apetito y anemia. En cuatro casos de pacientes que desarrollaron ascitis a causa de la cirrosis que presentaban, fueron tratados exitosamente con dosis de 3 - 6 gramos por día de AHCC (Kidd, 2000).

El tratamiento con AHCC mejora el pronóstico del carcinoma hepatocelular en los pacientes después de la intervención quirúrgica (Matsui y cols., 2002), prolonga la supervivencia y mejora el pronóstico de los pacientes que padecen cáncer hepático avanzado (Cowawintaweewat y cols., 2006). El cáncer de hígado es el sexto cáncer más común en todo el mundo con diversas incidencias en diferentes áreas geográficas. Siendo éste la tercera causa más común de mortalidad por cáncer (Parkin, 2001; Srivatanakul y cols., 2004; Parkin y cols., 2005). Hay 2 principales tipos histológicos de cáncer primario de hígado: el carcinoma hepatocelular (HCC), un tumor que ocurre con una frecuencia que representa el 75-90% de los cánceres de hígado (Okuda y cols., 2002) y el colangiocarcinoma (CCA), un tipo menos común que comprende el 10-25% de todos los cánceres de hígado, a excepción de algunas regiones que incluyen zonas endémicas de enfermedades de hígado por ejemplo: Tailandia (Nakanuma y cols., 1999; Srivatanakul y cols., 2004; Parkin y cols., 2005). Muchos de los pacientes con cáncer de hígado son diagnosticados en un estado avanzado de la enfermedad (Goldberg, 2004; Sangro, 2005). A una proporción significativa de pacientes no se ofrece ninguna otra terapia que el mejor tratamiento de soporte posible. Además muchos otros tratamientos que se dan no pueden ser considerados óptimos ya que apenas mejoran la tasa de supervivencia (Llovet y cols., 2003; Sangro, 2005). Ha habido muchos intentos de tratamiento contra el cáncer. Uno de estos enfoques de tratamiento tiene como objetivo estimular el sistema inmune de los pacientes mediante el uso de modificadores de respuesta biológica, BRMs (Matsui y cols., 2002; Stuelp-Campelo y cols., 2002; Chen y Chang, 2004; Zheng y cols., 2005). Varios investigadores han aislado y purificado polisacáridos inmunomoduladores como BRMs de hongos por su importancia como alimento y fuente de material para el desarrollo de fármacos (Mizuno y cols., 2000). Varios investigadores han aislado y purificado polisacáridos inmunomoduladores como BRMs de hongos por su importancia como alimento y fuente de material para el desarrollo de fármacos (Mizuno y cols., 2000).

El AHCC está considerado como un potente BRMs, del cuál se ha investigado una amplia gama de factores biológicos, farmacológicos y clínicos. Aumenta la actividad de las células NK (Ghoneum y cols., 1992), así como las respuestas inmunes en pacientes con cáncer, mejorando la producción de interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN γ), además de actuar como un potente antioxidante que protege contra los trastornos inducidos por estrés oxidativo (Ye y cols., 2003). El tratamiento con AHCC mejoró el pronóstico de pacientes que padecen cáncer de hígado avanzado (Cowawintaweewat y cols., 2006). Los investigadores realizaron un estudio cohorte prospectivo aleatorio con 44 pacientes (34 recibieron tratamiento y los 10 restantes formaron el grupo control), considerando los siguientes criterios: prueba histológica de cáncer de hígado avanzado, tumor inoperable e inadecuado con la quimioembolización, sin metástasis cerebral ni enfermedades psiquiátricas, un mes libre de tratamiento después de la última terapia convencional. Los pacientes recibieron una dosis de 6 g/ día de AHCC previa firma del consentimiento informado. Los parámetros clínicos evaluados incluyen: calidad de vida, parámetros hematológicos en ácido etildiaminotetraacético (EDTA); tales como: hemoglobina, linfocitos, recuento de células sanguíneas blancas, recuento de plaquetas. Además de los parámetros bioquímicos en el suero como: albumina, bilirrubina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP). También se evaluaron parámetros inmunológicos: citosinas tipo Th1 como por ejemplo, IFN γ , IL-12 y un marcador de la activación de macrófagos (Neopterina). A los pacientes que sobrevivieron durante más de 1 año se les realizaron imágenes por resonancia magnética. Los resultados de este estudio mostraron que la administración oral del AHCC no produce efectos secundarios, ninguno de los pacientes abandonó el tratamiento con este suplemento, la tasa de supervivencia fue significativamente mayor en el grupo de pacientes tratados con AHCC en comparación con el grupo control. Este estudio nos sugiere que la suplementación con AHCC ayuda a prolongar la supervivencia de pacientes con cáncer de hígado avanzado, retrasando el declive gradual del estado fisiológico (Cowawintaweewat y cols., 2006).

Sin embargo, no hay un informe concluyente sobre el efecto funcional del AHCC sobre la respuesta inmune en los seres humanos. Las células dendríticas son

las células más potentes presentadoras de antígenos (Banchereau y Steinman, 1998), capaces de iniciar la activación de los linfocitos T necesarios para dar inicio a la inmunidad celular contra un agente patógeno. El uso de las células dendríticas en la inmunoterapia del cáncer parece ser un mecanismo prometedor en la obtención de respuestas inmunitarias antitumorales (Nestle y cols., 1998; Schuler-Thurner y cols., 2002). Con el objetivo de evaluar los efectos de la ingesta de AHCC sobre la respuesta inmune se desarrolló un estudio doble ciego (Terakawa y cols., 2008). En este estudio, se investigó el papel del AHCC como modificador de respuesta biológica, los resultados muestran que el tratamiento con AHCC aumentó el número total de células dendríticas en comparación con el grupo control.

Las células T (Linfocito T) y el interferón gamma (IFN- γ) son elementos críticos del sistema inmune frente a células tumorales demostrado experimentalmente utilizando el modelo animal de trasplante de tumor (Shankaran y cols., 2001; Gao y cols., 2003). Utilizar células tumorales en modelos animales puede proporcionar buenos indicadores para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de pacientes con cáncer. Numerosas investigaciones sugieren que el AHCC puede modular la respuesta inmune frente a tumores cancerígenos pero el mecanismo preciso por el cuál regula la respuesta inmune no se ha estudiado sistemáticamente.

Teniendo como referencia estudios previos donde se demuestra que el AHCC reduce la metástasis de adenocarcinomas mamarios de rata y su capacidad para modular las funciones inmunitarias (Matsushita y cols., 1998; Aviles y cols., 2004); un grupo de investigadores realiza una serie de experimentos y como resultado de su investigación concluyen que: el AHCC mejora la vigilancia tumoral a través de la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Gao y cols., 2006). En este estudio los investigadores han demostrado que el AHCC mejora la vigilancia inmune frente a tumores cancerígenos (melanoma y linfoma), mediante la regulación de la formación de la respuesta inmune tanto innata y adaptativa. Los experimentos se desarrollaron en un modelo de ratón, mediante la administración oral de una vez al día de AHCC disuelto en agua con una concentración de 60 mg/ml (200 μ l/ratón) durante dos semanas. Para inducir a la formación del tumor

inyectaron a los ratones por vía subcutánea líneas celulares de melanoma, el crecimiento tumoral se registró y monitorizó diariamente durante más de 3 semanas, en algunos experimentos se utilizó puntualmente la vía peritoneal. Experimentalmente los resultados muestran que la administración oral del AHCC antes de la inoculación de las células tumorales retrasa significativamente la formación de melanoma y reduce el tamaño del tumor, el efecto antitumoral del AHCC no solo se reduce a melanoma sino también para líneas celulares de linfoma, con resultados aún más impresionantes donde el 20% de los ratones que fueron tratados con AHCC quedaron libres de tumor, mientras que el grupo control desarrolló grandes tumores y murieron dentro de las 2 semanas. Estos resultados establecen firmemente un papel protector del AHCC frente a la formación de tumores cancerígenos. Además el tratamiento con AHCC aumenta la activación específica de las células T CD4⁺ y CD8⁺, las cuáles desempeñan un papel clave en la respuesta inmune adaptativa antitumoral. Asimismo, demostraron que el AHCC promueve la producción de IFN- γ en las células T CD8⁺. El IFN- γ , es una citocina crítica en la inmunovigilancia tumoral (Ikeda y cols., 2002). Los investigadores sugieren que el AHCC puede ser un complemento útil en la terapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer y señalan que se necesitan estudios futuros para definir mejor los mecanismos moleculares que median el efecto del AHCC en la erradicación de los tumores formados. En la figura 4 (adaptado de Gao y cols., 2006); se muestran los resultados obtenidos por este grupo de investigadores.

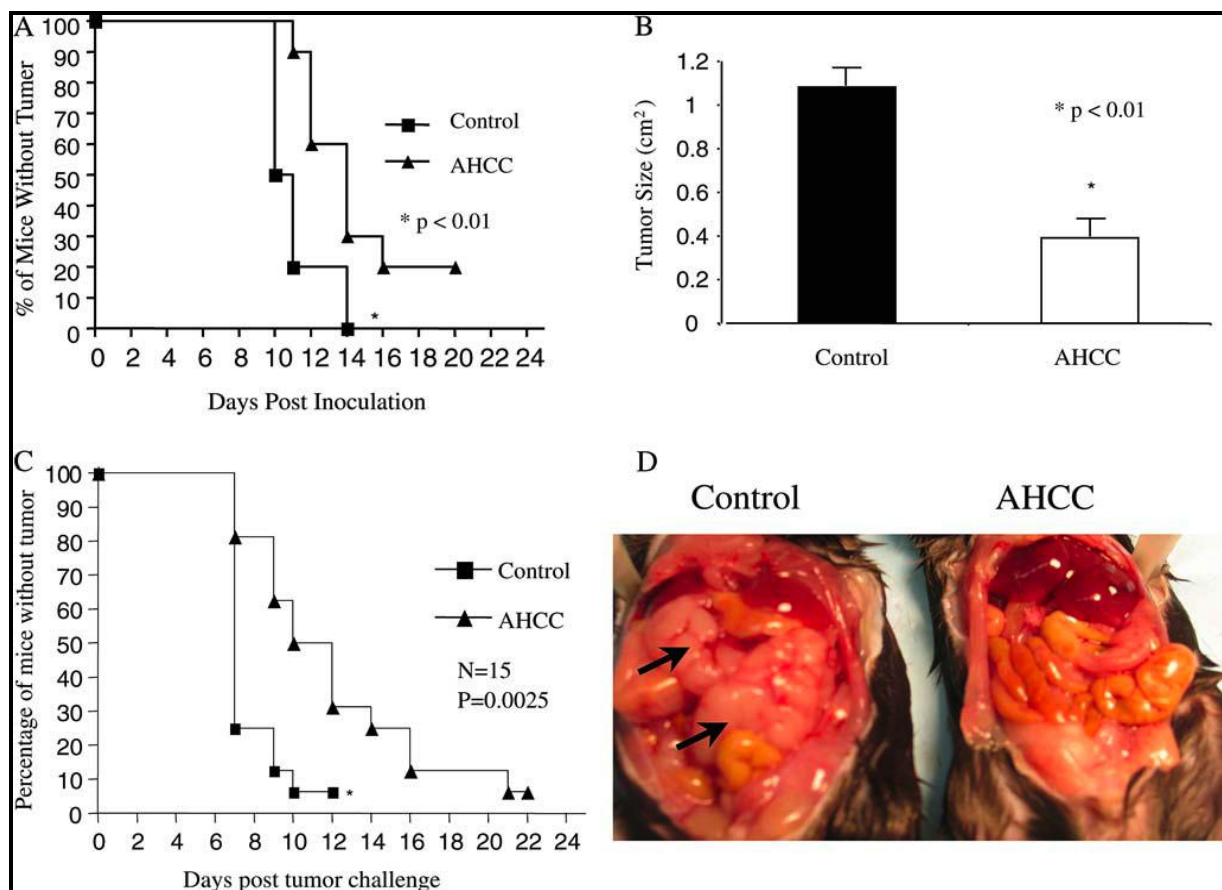


Figura 4. Se observan gráficos de porcentajes de ratones sin tumor vs los días post-inoculación y el efecto del tratamiento con AHCC. La reducción significativa del tamaño de las células tumorales y las flechas indican el desarrollo de un tumor intraperitoneal en el grupo control (adaptado de Gao y cols., 2006).

El AHCC también se ha utilizado para evaluar la mejora de alopecia (pérdida de cabello) causada por arabinósido de citosina (Ara-C), agente de quimioterapia utilizado principalmente en el tratamiento de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y Linfoma no Hodgkin (LNH), y estudiar la modulación de la lesión hepática causada por dosis únicas de 6-mercaptopurina (6-MP), además de metotrexato (MTX) en roedores (Sun y cols., 2009). En dicho estudio, la integridad folicular y el crecimiento del cabello se evaluó en roedores de ambos sexos recién nacidos (8 días de edad); tratados con una sola dosis de Ara-C (30 mg/kg /día) por vía intraperitoneal y AHCC (500 mg/kg/día) por 3 vías distintas (oral, intraperitoneal y tópica) durante 7 días consecutivos. La solución de Ara-C se administró 1 hora después de administrarse el AHCC. Los efectos secundarios de una dosis oral única de 6-MP (2,5 mg/kg de peso corporal) más MTX (30 mg/kg de peso corporal) y su efecto de mejora mediante el tratamiento con AHCC (1.000 mg/kg de peso corporal) durante 28 días

se evaluaron en ratones machos (8 semanas de edad). Los resultados de la biopsia de piel evidencian que todos los grupos tratados con AHCC por diferentes vías presentan protección frente a la alopecia, especialmente el grupo que recibió el tratamiento por vía oral siendo el que mostró la protección más eficaz. Asimismo, el tratamiento con AHCC mejora la pérdida de peso corporal causado por el tratamiento con Ara-C en los roedores. Estos resultados muestran la bioeficacia del AHCC en la modulación de los efectos tóxicos del tratamiento con fármacos citostáticos (Sun y cols., 2009). Además los investigadores señalan que una suplementación con AHCC fortalece, optimiza la capacidad del sistema inmune y tiene el potencial de reducir los efectos secundarios de la radioterapia y quimioterapia, contribuyendo así a mejorar la calidad de vida de los pacientes (por ejemplo: la reducción de las náuseas, aumento de apetito y disminución de la ansiedad).

El AHCC se ha asociado también al tratamiento del cáncer de mama. Este tipo de cáncer es la primera causa de muerte en la mujer entre los 35 y 54 años y la segunda tras las enfermedades cardiovasculares por encima de los 54 años (Alvarez y cols., 1996). Se trata de la primera causa de muerte por cáncer no prevenible entre las mujeres. Se realizó un ensayo clínico en pacientes con cáncer de mama avanzado suplementados con AHCC (Matsui y Kawaguchi, 2009). Fue un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de mama durante 6 años (1996-2002) y todos los pacientes recibieron la administración del AHCC. La suplementación con AHCC mejoró el pronóstico de la enfermedad en la etapa IV, en comparación con el recuento nacional. Los resultados de este estudio sugieren que el AHCC podría contribuir a mejorar la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama en el estadio IV de la enfermedad, pero queda por determinar que ocurre en los estadios I, II y III de esta patología.

Asimismo, el efecto del AHCC se ha estudiado en cáncer del sistema digestivo, este Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa mejoraría la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico o cáncer de colon (Kawaguchi, 2009). El cáncer gástrico es la segunda causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo (700.000 muertes en 2002) y el cáncer colorrectal es la tercera causa

comúnmente diagnosticada en todo el mundo (1 millón diagnosticado en 2002) (Parkin y cols., 2005). La disminución de la incidencia y mortalidad tanto para el cáncer gástrico y cáncer de colon se han logrado con la detección temprana de la enfermedad, el desarrollo de las técnicas quirúrgicas y la investigación de nuevos quimioterapéuticos (Erlichman y cols., 1988; Ohtsu y cols., 1991; Shirao y cols., 1997; Wolpin y cols., 2008; Jemal y cols., 2009). Sin embargo, a pesar de los avances el cáncer gástrico y cáncer de colon siguen incurriendo en la mortalidad de los pacientes. La inmunoterapia tumoral es una opción de tratamiento, el uso de modificadores de respuesta biológica para provocar una respuesta inmune antitumoral en el huésped se está empleando actualmente en la investigación oncológica. Kawaguchi investigó los efectos del AHCC en la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer gástrico o de colon. Diseñó un estudio de cohorte prospectivo con 245 pacientes diagnosticados histopatológicamente de cáncer gástrico o de colon desde abril de 1995 hasta abril de 2002 y se compararon los resultados obtenidos con otras instituciones japonesas. Estos pacientes recibieron por vía oral el AHCC como terapia adyuvante postoperatoria en combinación con la quimioterapia estándar. Los pacientes diagnosticados con cáncer gástrico o de colon en estadios I, II o III fueron tratados con dosis de 3 g/día de AHCC repartidos en 1 g de AHCC tres veces al día y los pacientes con cáncer gástrico o de colon en estadio IV recibieron dosis de 6 g/día de AHCC repartidos en 2 g de AHCC tres veces al día. Las tasas de supervivencia acumulada fueron analizadas por el método de Kaplan-Meier. En esta investigación el AHCC (como terapia adyuvante postoperatoria), mejoró las tasas de supervivencia acumulada postoperatoria de 5 años en pacientes con cáncer gástrico y cáncer de colon. Estos resultados muestran al AHCC como un potente modificador de la respuesta biológica que podría utilizarse como adyuvante en la inmunoterapia tumoral en el tratamiento del cáncer gástrico y de colon (Kawaguchi, 2009).

Este alimento funcional también se ha ensayado en el tratamiento del cáncer de próstata, utilizando la reducción del antígeno prostático específico (PSA), como el punto final primario para indicar la eficacia del AHCC en el tratamiento del cáncer de próstata (Sumiyoshi y cols., 2010). Numerosos casos clínicos han demostrado al AHCC como una opción de tratamiento eficaz contra el cáncer de próstata, este suplemento nutricional reduce considerablemente los niveles de PSA en 1 o 2

meses, alcanzando los niveles normales al cabo de 4 meses (Ghoneum y cols., 1995). En un estudio (De Vere White y cols., 2002), también evaluaron el efecto del AHCC en el tratamiento del cáncer de próstata. Realizando un estudio en ratones y en humanos, el estudio en ratones sin pelo duró 50 días, todos los animales estaban vivos al término del estudio, produciéndose una disminución significativa del tamaño del tumor a partir del día 33 al 50, después de la reintroducción de la terapia. El estudio en humanos fue llevado a cabo en 62 hombres, de los cuáles 61 fueron evaluables a los 6 meses, un paciente se retiró por una operación. Los niveles basales de PSA variaron significativamente, disminuyendo los niveles en los pacientes al cabo de 6 meses, con excepción de aquellos que habían hecho metástasis (De Vere White y cols., 2002).

El AHCC se ha comparado con otros 3 suplementos dietéticos en un ensayo clínico abierto, no aleatorio en 34 pacientes con diferentes tipos de cáncer, de diferentes fases de la enfermedad, con edades comprendidas entre 2 y 72 años, en el centro de Salud Natural Lexington, Massachusetts, EE.UU., con el propósito de determinar si estos complementos dietéticos afectan de manera consistente y significativamente la actividad de las células asesinas naturales (células NK) en pacientes con cáncer (Belanger, 2005). En este ensayo clínico se evaluó la actividad de las células NK, antes y después de una media de 16 semanas de tratamiento. La actividad de las células NK se midió con un ensayo estándar de liberación de Cr51 de 4 horas y se expresó en unidades líticas (UL). Ninguno de los 34 pacientes (26 mujeres y 8 hombres) estaba tomando algún complemento alimenticio considerado activador inmune antes de iniciar el estudio. Recibían tratamiento de quimioterapia y los mismos suplementos vitamínicos (científicamente demostrado que no aumentan la actividad de las células NK). Los participantes de este ensayo se distribuyeron en 4 grupos (A, B, C y D) con 15, 8, 3 y 8 pacientes respectivamente. Los 8 pacientes del grupo D recibieron el tratamiento por vía oral de AHCC (2 g/cada 8 h, 6 g/día). Dosis utilizada en base a un estudio previo (Ghoneum y cols., 1995). El tratamiento coadyuvante con AHCC fue el único que aumentó consistente y significativamente los niveles de la actividad de las células NK en todos los pacientes y no se describieron efectos secundarios en ningún paciente durante el tratamiento. Este estudio demuestra la eficacia del AHCC como activador de células NK incluso en

medio de otras terapias. Por lo tanto, el uso del AHCC resulta eficaz como tratamiento coadyuvante en una terapia combinada contra el cáncer. La figura 5 (adaptado de Belanger, 2005) muestra un gráfico de los 4 tratamientos que se utilizaron en el ensayo clínico, donde se puede apreciar que todos los grupos antes del ensayo presentan la actividad de las células NK, expresadas en unidades líticas, menor de 20, similares a las obtenidas al finalizar el mismo, con excepción del grupo de AHCC que es el único que aumenta de forma significativa la actividad de las células NK, cuyos niveles, generalmente, se encuentran disminuidos en los pacientes con cáncer.

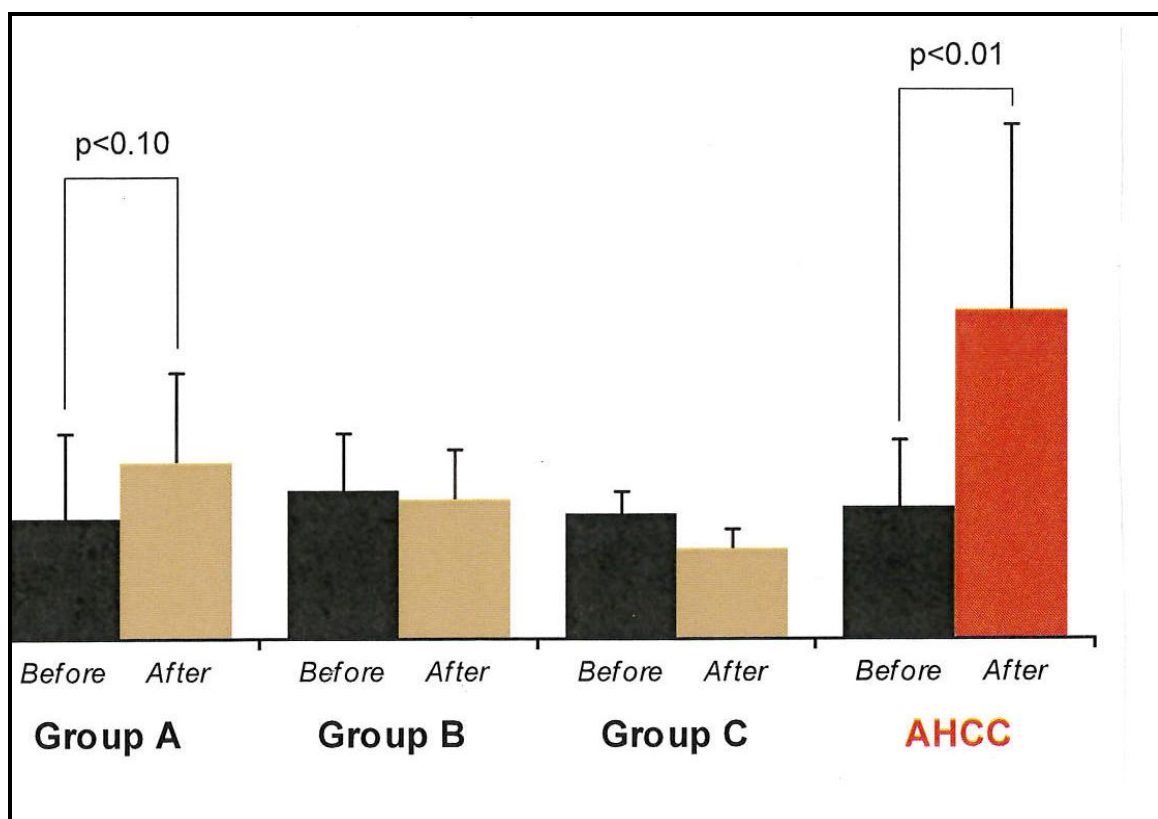


Figura 5. Gráfico de los 4 tratamientos usados en el ensayo clínico (adaptado de Belanger, 2005).

El AHCC se ha utilizado en la terapia combinada contra el cáncer de ovario. El cáncer de ovario ocupa el quinto lugar como causa de fallecimientos por cáncer entre las mujeres y es el responsable de más fallecimientos que cualquier otro cáncer del sistema reproductor femenino. El riesgo de una mujer de padecer cáncer ovárico durante el transcurso de su vida es de aproximadamente el 1,25%. La

probabilidad de morir de cáncer ovárico en el transcurso de su vida es de aproximadamente el 1%. Estas estadísticas no incluyen los tumores ováricos de bajo potencial maligno. En el año 2015, se estima que alrededor de 21,000 mujeres recibirán un diagnóstico de cáncer de ovario y alrededor de 14,000 mujeres morirán por esta patología (Sociedad Americana del Cáncer, 2015). El cáncer de ovario es difícil de diagnosticar a tiempo y los pacientes a menudo acuden al médico en estadios avanzados de la enfermedad, con un mal pronóstico (Barnes y cols., 2002). El tratamiento de primera línea estándar incluye cirugía y quimioterapia, con un 70% de pacientes que lograron una respuesta clínica inicial completa (Partridge y Barnes, 1999). Sin embargo, más del 50% de los pacientes tendrán recurrencia dentro de los 2 primeros años después de recibir quimioterapia de primera línea con base en platino y taxano (Partridge y Barnes, 1999; Barnhill y Kurman, 1995; Martin, 2002). Las tasas de respuesta con agentes de segunda línea de tratamiento como topotecan, gemcitabina o doxorubicina liposomal pegilada (DLP) no han conseguido alcanzar respuestas clínicas satisfactorias, con valores que oscilan entre el 15 y el 30% de recuperación en cáncer de ovario resistente al platino (Barnhill y Kurman, 1995; Martin, 2002). La DLP (Doxil®, Ortho Biotech, L.P., Bridgewater, Nueva Jersey) fue formulada en un intento de reducir la toxicidad cardíaca asociada al tratamiento con doxorubicina, sin embargo sigue presentando una significativa toxicidad hematológica y dermatológica. La DLP ha demostrado actividad clínica en el tratamiento de pacientes recurrentes con cáncer de ovario resistentes a platino con tasas de respuestas de 17-26%, con un valor medio en supervivencia libre de progresión de 5-6 meses (Muggia y cols., 1997; Thigpen y cols., 2005). Sin embargo, el tratamiento con DLP en pacientes de edad avanzada, que pueden presentar otras condiciones patológicas, son a menudo un reto debido a su toxicidad (Thigpen y cols., 2005). La integración de suplementos nutricionales y productos naturales con tratamientos quimioterapéuticos tradicionales ha incrementado el interés por una práctica clínica basada en las preferencias de los pacientes (Navo y cols., 2004). Un tratamiento contra el cáncer de ovario que combina AHCC con DLP ha sido evaluado por (Hunter y cols., 2011). Este estudio preclínico fue diseñado para evaluar la inhibición del crecimiento celular *in vitro* y confirmar la actividad *in vivo* del AHCC solo y cuando se administra en combinación con DLP. El AHCC, en los resultados de los estudios *in vitro*, no demostró, ni como

tratamiento único ni en combinación, ninguna actividad citotóxica. El AHCC más DLP demostró actividad potencialmente sinérgica en las líneas celulares de cáncer ensayadas. Los resultados *in vivo* (modelo de xenoinjerto en ratón), han demostrado una mayor eficacia tanto en la mejora de la actividad antitumoral como en la disminución de efectos adversos, en el tratamiento combinado de DLP más AHCC en comparación con el tratamiento solo con DLP (Hunter y cols., 2011).

El efecto hematoinmunológico del AHCC en varios tipos de cáncer se ha estudiado en un ensayo clínico realizado con 12 pacientes coreanos de ambos sexos, de edades comprendidas entre 49 y 60 años, a los que se les administró dosis de AHCC de 3 g a 6 g/día por vía oral, combinado con otras quimioterapias durante 9 meses (Won, 2002). Los resultados de este estudio demuestran cambios a nivel hematológico beneficiosos, tales como: una reducción del número de leucocitos, un incremento de la hemoglobina, una reducción del número de hematocritos, un aumento del número de plaquetas, incremento del número de células NK, aumento de linfocitos.

El AHCC mejora el pronóstico y la calidad de vida en una variedad de tipos de cáncer, la aplicación de la suplementación con AHCC debe ser considerado en el contexto del tratamiento médico estándar (Ritz, 2011).

Además, el AHCC alivia los efectos secundarios inducidos por fármacos contra el cáncer en un modelo experimental de ratón no portador de tumor (Shigama y cols., 2009). El tratamiento del cáncer incluyendo la monoterapia y la combinación de quimioterapias fiables mejora el pronóstico de quedar libre de enfermedad y la supervivencia global en pacientes con cáncer, pero su utilización en la práctica clínica está limitada por los efectos secundarios que producen los fármacos citostáticos. En este estudio se exploró el papel del AHCC en el alivio de los efectos secundarios inducidos por los fármacos anticancerosos, en modelos animales. Ensayaron con 5 fármacos contra el cáncer (paclitaxel, doxorubicina, cisplatino, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo e irinotecán). El paclitaxel fue utilizado tanto en monoterapia como en combinación, mientras que los demás fármacos fueron usados en combinación de quimioterapias. En los seres humanos la monoterapia con paclitaxel produce neuropatía periférica, mielotoxicidad, granulocitopenia,

bradicardia, hipotensión, artralgia, mialgia e hipersensibilidad (Sekine y cols., 1996; Furuse y cols., 1997). En el experimento con los ratones que recibieron solo el paclitaxel, estos efectos no fueron reproducidos, pero se observó disquemia, hepatotoxicidad, mielotoxicidad. La suplementación con AHCC fue evaluada en la monoterapia con paclitaxel y en 4 tratamientos combinados de quimioterapias, estos tratamientos combinados se han seleccionado en base a estudios previos en distintos tipos de cáncer (A'Hern y cols., 1993; Rougier y cols., 1994; Kaern y cols., 1996; Bunn, 1996; Cunningham, 1996; Sandercock y cols., 1998; Itamoto y cols., 2002; Chen y cols., 2005). El tratamiento con AHCC en la monoterapia con paclitaxel ha aliviado significativamente la hepatotoxicidad, mielotoxicidad y disminución de la disquemia. En la quimioterapia combinada el tratamiento con AHCC, mejoró los niveles de leucocitos y la viabilidad celular de la médula ósea. Además la suplementación con AHCC disminuyó notablemente la tasa mortalidad en todos los grupos (tanto en los tratados con monoterapia como en los de quimioterapia combinada). Los resultados de este estudio sugieren que el AHCC tiene potencial para aliviar la mielosupresión, la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad, y podría ser útil para complementar las propiedades del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF), glicoproteínas que modulan la hematopoyesis. Además demuestra su seguridad al ser usado como tratamiento con quimioterapias combinadas de fármacos citostáticos (Shigama y cols., 2009).

La influencia del AHCC en los efectos secundarios y quimioterapéuticos del cisplatino en ratones portadores de tumores también se ha estudiado (Hirose y cols., 2007). El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino (II) o CDDP), es un fármaco citostático que contiene platino ampliamente utilizado en una gran variedad de tumores malignos sólidos, tumores de cuello, testículos, pulmones, ovarios, vejiga (Pectasides y cols., 2007; Ali y Al Moundhri, 2006; Van den Berg y cols., 2006; Pectasides y cols., 2005; Taguchi y cols., 2005; Rybak y Whitworth, 2005; Chester y cols., 2004; Kollmannsberger y cols., 2001; Jordan y Carmo-Fonseca, 2000; Lebwohl y Canetta, 1998; Benedetti Panici y cols., 1993). Aunque el tratamiento con este agente citotóxico es eficaz, presenta efectos secundarios graves como: nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad y náuseas (Higa y cols., 1995). Estos

efectos secundarios interfieren con el tratamiento y a menudo obligan a una reducción de la dosis, la frecuencia y la duración del tratamiento con cisplatino dando lugar a la búsqueda de alternativas terapéuticas con menos toxicidad. El cisplatino causa daño celular mitocondrial, inhibe la actividad de la enzima ATPasa (produce la hidrólisis del adenosín trifosfato), altera el sistema de transporte celular y, finalmente, provoca la apoptosis, inflamación, necrosis y muerte en las células (Ali y Al Moundhri, 2006; Taguchi y cols., 2005). La posibilidad de que una suplementación con AHCC pueda reducir los efectos secundarios de CDDP se evaluó en el estudio anterior (Hirose y cols., 2007). Se investigó el efecto sobre el cuerpo inducido por CDDP (pérdida de peso, anorexia, nefrotoxicidad, toxicidad hematopoyética) mediante el uso de ratones portadores de tumores, se trabajó con 3 grupos (grupo control, grupo solo tratado con cisplatino y grupo tratado con cisplatino más AHCC), dosis de 8 mg/ Kg de cisplatino y dosis de 100 mg/ Kg de AHCC. La terapia combinada del cisplatino más AHCC, resultó significativamente en una mayor reducción en tamaño y peso de los tumores sólidos. Asimismo, la suplementación con AHCC, aumentó la ingesta de comida en los ratones, mejorando la anorexia y el peso corporal de los ratones. El nivel de creatinina fue mejorado significativamente con la combinación de AHCC con cisplatino, reduciendo la nefrotoxicidad del cisplatino. Además el AHCC fue capaz de mejorar significativamente la supresión de la médula ósea efecto secundario del tratamiento con cisplatino. Por lo tanto, una suplementación con AHCC sería una estrategia para mitigar los efectos secundarios de la terapia con cisplatino (Hirose y cols., 2007). La figura 6 (adaptado de Hirose y cols., 2007), muestra el efecto antitumoral (en tamaño y peso) del tratamiento solo con cisplatino y la combinación de AHCC más cisplatino frente al grupo control.

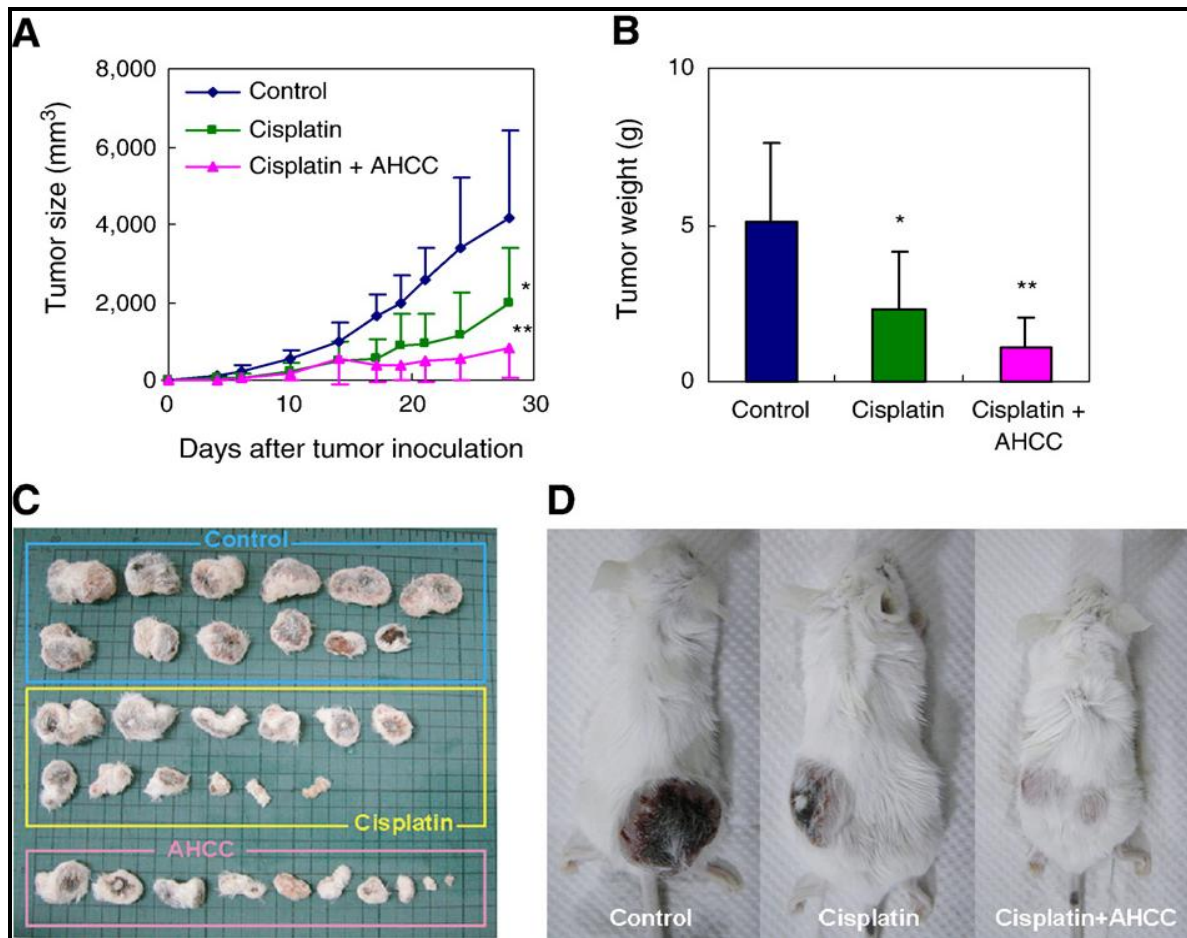


Figura 6. Efecto antitumoral del cisplatino, solo o cisplatino más AHCC (adaptado de Hirose y cols., 2007).

1.1.7.2. Enfermedades virales

La actividad antiviral de este basidiomiceto ha sido poco estudiada (Kaneko y Chihara, 1992; Sasaki y cols., 2001; Wans y cols., 2003). Algunas de las características más importantes de los productos naturales con propiedades terapéuticas son su amplia diversidad estructural y variadas propiedades farmacológicas (Strohl, 2000), entre las fuentes de compuestos naturales, algunos de los que resultan más interesantes en los últimos años son los hongos, especialmente los basidiomicetos, entre los que destaca el Shiitake (*Lentinus edodes*). En un estudio se evaluó la actividad antiviral del AHCC frente al Poliovirus tipo 1 (PV-1), causante de la poliomielititis en humanos, y al herpesvirus Bovino (Rincão y cols., 2012). El poliovirus presenta una cápside simétrica icosaédrica sin envoltura, pertenece a la familia Picornaviridae, género Enterovirus, su genoma

consta de un corto ARN monocatenario (Racaniello, 2006). El herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1), es un importante patógeno para la industria ganadera. Pertenece a la subfamilia Alphaherpesviridae, familia Herpesviridae (Jones y cols., 2006). Con el fin de reducir las pérdidas causadas por el BoHV-1 se están utilizando vacunas que contienen el virus atenuado con resultados positivos, sin embargo, el control de las infecciones es todavía difícil debido al tiempo de latencia del virus después de la infección primaria (Hurk y cols., 2001). La actividad antiviral de extractos aislados de hongos basidiomicetos se atribuye a la presencia de polisacáridos. La característica aniónica de esta molécula puede interferir con las etapas iniciales de la replicación viral (Eo y cols., 2001; Kabanov y cols., 2010). En este estudio, se determinó la actividad antiviral de dos extractos obtenidos a partir de *Lentinus edodes* (uno acuoso y otro en etanol) y de polisacáridos del mismo, en la replicación del PV-1 y el BoHV-1. Los resultados demostraron que ambos extractos, así como, los polisacáridos, inhiben los procesos iniciales de la replicación del PV-1 y el BoHV-1 (Rincão y cols., 2012).

La administración oral del AHCC mejora la resistencia del huésped a encefalitis del Nilo Occidental en ratones (Wang y cols., 2009). Esta enfermedad causada por el virus del Nilo Occidental (VNO) puede ocasionar un deterioro mortal del sistema nervioso en los seres humanos, el virus se transmite a las personas principalmente por la picadura de mosquitos infectados. El VNO supone una gran amenaza para la salud pública, especialmente para los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos, ya que no existe una vacuna disponible. La gravedad y síntomas observados en los ratones son similares a los casos graves en los seres humanos (Beasley y cols., 2002; Diamond y cols., 2003). Se evaluó el efecto del AHCC en la susceptibilidad del huésped experimentalmente en el modelo murino de infección (Wang y cols., 2009), en este estudio se utilizaron ratones jóvenes (6 a 8 semanas de edad) y ratones viejos (21 a 22 meses de edad); los ratones fueron agrupados por edad y sexo en condiciones idénticas para cada experimento. Para la infección de los ratones con el VNO se siguió estudios previos realizados por el mismo grupo de investigación (Wang y cols., 2003; Welte y cols., 2008), se inyectaron por vía intraperitoneal a los ratones dosis cercanas a la dosis letal de 100% (DL 100), los ratones fueron monitorizados 2 veces al día hasta 28 días después de la infección. El AHCC fue disuelto en agua purificada y administrado por

vía oral a los ratones (600 mg/Kg) cada 2 días durante 1 semana antes de la infección y en el día 1 y 3 post-infección, una cantidad de 200 μ L/día frente al grupo control que recibió 200 μ L/día de agua destilada, teniendo como referencia investigaciones previas donde se han utilizado dosis similares de AHCC sin ocasionar efectos tóxicos en los ratones (Gao y cols., 2006; Ritz y cols., 2006; Daddaoua y cols., 2007). En los resultados de este estudio se demuestra que la susceptibilidad a la infección de los ratones jóvenes tratados con AHCC (54% de supervivencia) al VNO es menor que la de los ratones control (21% de supervivencia) dentro de un intervalo de 4 semanas, la medida de la carga viral utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real nos muestra que la viremia en los ratones tratados con AHCC disminuyó un 19% de los niveles del grupo control. Estos datos sugieren que el tratamiento con AHCC atenúa la replicación del virus en la periferia durante la infección por VNO. En los ratones jóvenes el tratamiento con AHCC aumentó la expansión de las células T $\gamma\delta$ (linfocitos T gamma/delta), 3 días después de la infección en comparación con el grupo control. En cuanto a los ratones de edad avanzada, más susceptibles a la infección por VNO que los ratones jóvenes (Welte y cols., 2008) los resultados muestran que el tratamiento con AHCC también produce una mayor expansión de las células T $\gamma\delta$ a los 3 días post-infección en comparación con el grupo control y además produce un aumento de las respuestas protectoras de células T V δ 1. Este estudio demuestra que una suplementación con AHCC puede mejorar la respuesta inmune protectora durante una infección por VNO en hospedadores susceptibles (Wang y cols., 2009). Se desconoce el mecanismo por el cuál el AHCC modula la respuesta inmune protectora en los ratones jóvenes y en edad avanzada infectados por VNO, estudios previos señalan que los α -glucanos aislados a partir de plantas u hongos podrían activar el sistema inmune a través de la señalización del receptor de tipo Toll (Nair y cols., 2006; Bittencourt y cols., 2006). Es probable que el AHCC que contiene un alto contenido α -glucanos actúe a través de estos receptores de inmunidad innata y esté implicado directa o indirectamente en la activación de las células T $\gamma\delta$ (Wang y cols., 2009).

La suplementación con AHCC protege contra el virus de la influenza (H1N1),

virus de la influenza avian (H5N1) (Ritz, 2008). El virus de la influenza o también conocido como virus de la gripe, es una importante amenaza para la salud pública a nivel mundial, siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad de enfermedades infecciosas, especialmente entre los ancianos, niños pequeños y pacientes inmunocomprometidos (MMWR, 2004; Thompson y cols., 2003). Este virus infecta las células epiteliales del tracto respiratorio, lo que resulta en una infección respiratoria aguda conocida como gripe, pertenece a la familia orthomyxoviridae y presenta tres tipos: influenza A, B y C (Lamb y Krug, 2001). La suplementación con AHCC aumenta la respuesta inmune innata de ratones jóvenes con infección de influenza primaria (Ritz y cols., 2006). En este estudio se investigó los posibles efectos de la suplementación con AHCC sobre la respuesta inmune frente al virus H1N1 en ratones machos jóvenes que recibieron por vía oral 1 g/ Kg de AHCC, 7 días antes y a lo largo de la infección. Esta suplementación con AHCC dió lugar a una mayor actividad de las células NK en los pulmones y el bazo, y un rápido aclaramiento del virus de los pulmones. Finalmente, esta suplementación con AHCC demostró un mejor epitelio pulmonar en los ratones después de la infección de la gripe en comparación con el grupo control, así como una reducción de la infiltración de linfocitos y macrófagos en el tejido pulmonar (Ritz y cols., 2006).

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud mundial importante. El tres por ciento de la población mundial o aproximadamente 170 millones de personas en todo el mundo se han infectado con este virus (Wasley y Alter, 2000). Generalmente, del 2 al 35% de las personas infectadas con el VHC finalmente desarrollan cirrosis (Liang y cols., 2000) y carcinoma hepatocelular (Okuda, 2000). El tratamiento para los pacientes con hepatitis C crónica implica el uso de interferón pegilado junto con ribavirina. Sin embargo, estos regímenes no sólo causan muchos efectos secundarios, sino que también son muy costosos. La mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica no responden al tratamiento estándar y no pueden soportar los efectos secundarios de los medicamentos. En un estudio llevado a cabo en un hospital de Bangkok (Tailandia) se evaluó la eficacia y seguridad del AHCC en la reducción del ARN del VHC o en pruebas de función hepática (Liver Function Tests, LFTs) en pacientes con hepatitis C crónica (Thaiudom y cols., 2010). Para estudiar la eficacia del AHCC en la reducción de los niveles de ARN del VHC y la mejora de las pruebas de función hepática en

pacientes con hepatitis C crónica, se realizó un estudio randomizado comparando AHCC con placebo. En este estudio se seleccionaron pacientes de 15 años de edad o mayores que tenían infección por hepatitis C crónica, excluyendo pacientes con embarazo, creatinina sérica $\geq 1,5$ mg/dl, con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) y con antecedentes de descompensación hepática o carcinoma hepatocelular. Los pacientes fueron asignados a 2 grupos de estudio (A y B), ambos grupos recibieron 2 gramos de AHCC, 3 veces al día durante 24 semanas. En todos los pacientes se analizaron los niveles de ARN del VHC y se hizo un seguimiento de la función hepática. Los resultados muestran una reducción de los niveles de enzimas del ARN del VHC y Alanina Aminotransferasa o Alanina Transaminasa (ALT). Esta investigación puede servir como indicador preliminar para usar AHCC como una alternativa de tratamiento en pacientes con hepatitis C crónica que no responden al tratamiento estándar actual cuando los pacientes están a la espera de nuevos fármacos en desarrollo, además se tendrá que evaluar si el prolongar el número de días y aumentar la dosis de tratamiento con AHCC produce un impacto significativo en pacientes con hepatitis C crónica (Thaiudom y cols., 2010).

1.1.7.3. Infecciones bacteriana y fúngicas

Las infecciones son comunes en pacientes que han sufrido traumatismos graves y en heridas quirúrgicas. La infección es la complicación postoperatoria más común. El uso de técnicas asépticas, antibióticos y otros enfoques modernos han demostrado ser poco eficaces en la prevención y control de las infecciones (Heldricks y cols., 1987). Por lo tanto, se ha convertido en crucial el desarrollo de nuevas alternativas que ayuden a prevenir los efectos del trauma y otras complicaciones en el sistema inmunológico y mejorar la resistencia a la infección (Aviles y cols., 2006).

La suplementación con AHCC aumenta la supervivencia después del contacto con agentes infecciosos en ratones (Ritz, 2008). La suplementación con AHCC actúa modulando la inmunidad y aumentando la supervivencia en respuesta a una infección aguda. Los efectos de la suplementación con AHCC sobre la resistencia a

una infección con *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno asociado a neumonía bacteriana, infección del tracto urinario e infecciones oportunistas adquiridas en el hospital fueron evaluados en 2 modelos experimentales: en el modelo roedor de descarga del miembro posterior (Aviles y cols., 2003) y en el modelo de infección de herida quirúrgica (Aviles y cols., 2008; Aviles y cols., 2006).

El AHCC aumenta la resistencia a la infección en un modelo de ratón de infección de herida quirúrgica. La administración oral de AHCC mejora la supervivencia y prolonga el tiempo de vida de los ratones infectados con *Klebsiella pneumoniae* (Aviles y cols., 2006). En este estudio los investigadores realizaron un experimento cuyo objetivo fue evaluar los efectos profilácticos de la administración oral de AHCC, sobre la supervivencia en un modelo de ratón de infección quirúrgica de tejidos blandos. Dividieron los ratones en dos grupos (un grupo tratado con AHCC y otro grupo control), los ratones tratados recibieron diariamente mediante una sonda nasogástrica el AHCC disuelto en agua una semana antes y durante el período de la infección, mientras que los ratones del grupo control recibieron agua en las mismas condiciones experimentales. Todos los ratones fueron privados de comida, pero con acceso libre al agua 24 horas antes y 6 horas después de la infección. En estas condiciones, el modelo empleado en el estudio anterior simula condiciones de infección sistémica que a menudo se producen después de los procedimientos de cirugía.

El AHCC activa la función inmune al disminuir la carga bacteriana en un modelo murino de infección intramuscular (Aviles y cols., 2008). Este modelo animal simula las condiciones que a menudo suelen ocurrir después de un trauma o cirugía tales como la contaminación microbiana local y la privación de alimentos (Hershman y cols., 1988; Hershman y cols., 1988). Los componentes importantes de este modelo son el nutricional y el estado inmunológico del huésped. Una adecuada nutrición y una óptima función del sistema inmune son críticos para la resistencia a la infección. El sistema inmune juega un papel de vital importancia durante la infección y su función está seriamente comprometida durante un trauma grave o un procedimiento quirúrgico (Polk y cols., 1980; Miller y cols., 1982; Rodrick y cols., 1986; Faist y cols., 1988). En este modelo, los animales son privados de comida antes y poco después de la infección, estudios en animales han demostrado que el

hambre induce cambios en los parámetros inmunológicos (Galland y Polk, 1982; Freitag y cols., 2000; Duggal y cols., 2002; Pallinger y Csaba, 2005), incluyendo una reducción de los linfocitos circulantes (Galland y Polk, 1982; Freitag y cols., 2000), disminución de las células del bazo para responder a mitógenos y cambios en las células Th (Freitag y cols., 2000). En este modelo de infección quirúrgica el AHCC induce una fuerte respuesta inmunitaria temprana mediada por IL-12, TNF- α , IL-6 y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). Los resultados de esta investigación sugieren que el AHCC juega un rol importante en la eliminación de las bacterias mediante la inducción de una activación temprana y el equilibrio de la inmunidad innata. Aunque la activación temprana de la inmunidad innata y la redistribución de las células periféricas parecen jugar un papel crítico en el aclaramiento de bacterias, son necesarias nuevas investigaciones para definir completamente los mecanismos implicados en la protección contra la infección bacteriana inducida por AHCC.

La suplementación con este complemento dietético también es beneficiosa con los siguientes agentes infecciosos: *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Ritz, 2008). La eficacia del AHCC contra una infección oportunista se evaluó experimentalmente en ratones inmunosuprimidos infectados con dosis letal de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, o MRSA (Ishibashi y cols., 2000). En este estudio, cuatro días antes de la infección, en los ratones hembra jóvenes se induce leucopenia por vía intraperitoneal a través de la administración de ciclofosfamida (dosis de 200 mg/Kg). El AHCC se administró por vía oral (dosis de 1 g/Kg) en los grupos de ratones infectados con *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*; y por vía intraperitoneal (dosis de 0,5 g/Kg) en el grupo de ratones infectados con MRSA. Los tres grupos de ratones suplementados con AHCC exhibieron un aumento de la supervivencia en comparación con el grupo control. Estos datos sugieren que la suplementación con AHCC aumenta la supervivencia en ratones inmunocomprometidos en respuesta a un desafío infeccioso (Ishibashi y cols., 2000).

1.1.7.4. Inflamación Intestinal

• Flora Intestinal

El tracto gastrointestinal humano constituye un complejo ecosistema en continuo contacto con el medio externo, siendo el hábitat natural de un gran número de bacterias, las cuáles han evolucionado y se han adaptado a su entorno. Este ecosistema incluye numerosos microorganismos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis intestinal que son capaces de promover efectos beneficiosos para la salud, pero también contiene otros microorganismos potencialmente patógenos, que son capaces de invadir al hospedador. Se pueden diferenciar entre dos tipos de flora intestinal: la residente o autóctona y la pasajera o transitoria. La primera se adhiere a las células epiteliales de la mucosa, la forman microorganismos fijos que se multiplican con rapidez, se encuentran bien adaptados, son inoctrinos y estables. La flora pasajera no se fija al epitelio, ni se establece en el intestino, está constituida por los microorganismos no patógenos procedentes de la porción superior del tubo digestivo, los alimentos y el medio ambiente (Suárez y cols., 1994).

Antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal es estéril, siendo distintos los acontecimientos que pueden determinar la colonización inicial. Ésta tiene lugar durante el parto, en él se produce la primera exposición microbiana del recién nacido por la flora vaginal y fecal de la madre, habiéndose observado diferencias entre niños nacidos por cesárea o por vía vaginal (Adlerberth y cols., 1991; Gronlund y cols., 1999; Harmsen y cols., 2000). Posteriormente se forma una flora comensal estable, un estudio desarrollado evidencia que la lactancia materna promueve una composición bacteriana diferente a la nutrición mediante leches artificiales y plantea que el equilibrio ideal consiste en que la madre transfiera sus propias bacterias a la vez que confiere mecanismos de defensa (anticuerpos específicos, moléculas de inmunidad innata, etc.) frente a esos mismos gérmenes (Fanaro y cols., 2003). En este sentido, la disparidad entre la adquisición de bacterias y la transmisión de elementos de defensa inmunitaria en las etapas iniciales de la vida podría ser determinante en la patogénesis de algunas

enfermedades inmunoinflamatorias de la etapa adulta (Murch, 2001). Se considera que es a la edad de 2 años cuando la composición y el metabolismo de la microflora intestinal de un niño se asemejan a la de un adulto (Guérin y cols., 1997).

Es interesante resaltar que si bien hay modificaciones transitorias derivadas del uso de antibióticos o de causas dietéticas, estos cambios suelen ser reversibles, de modo que cada individuo mantiene una flora predominante relativamente estable durante toda su vida (Arribas, 2009).

Se establece una relación simbiótica entre la diversa microflora intestinal y el individuo. Así, en el lumen intestinal, las bacterias se benefician de un constante flujo de nutrientes, de una temperatura estable y de un buen nicho donde desarrollarse. De la misma forma, el huésped se beneficia de las bacterias por su capacidad de sintetizar vitamina K, obtener energía de los nutrientes no absorbidos en forma de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos y mantener la integridad y funcionalidad de la mucosa (Arribas, 2009).

Varios experimentos *in vivo* realizados en modelos animales libres de gérmenes demuestran que la ausencia total de microflora intestinal provoca alteraciones significativas en la estructura y función intestinal, como: reducción del número de vellosidades, desarrollo de criptas poco profundas, bajo recuento de leucocitos (Sharma y cols., 1995; Szentkuti y cols., 1990) y una disminución del número y la densidad de las placas de Peyer (Maeda y cols., 2001).

Los vertebrados en su convivencia con las bacterias, desarrollan en sus células epiteliales intestinales, receptores de reconocimiento de componentes específicos de bacterias, hongos y virus. Estos receptores incluyen los TLR (toll-like receptor) y los NOD (dominios de oligomerización de unión de nucleótidos), que son imprescindibles para el inicio de la respuesta inmunitaria innata y cuya activación genera diferentes cascadas de señalización intracelular que acaban en la producción de citoquinas proinflamatorias (Sansonetti, 2004). De esta forma se enlazan la respuesta inmunológica innata y adaptativa, ya que la primera acaba en

la maduración de las células dendríticas, que activan la respuesta inmunológica adaptativa (Medzhitov, 2001).

Una de las características más importantes de la flora comensal es su incapacidad para atravesar la barrera epitelial; sin embargo, si alguna de estas bacterias la atraviesa, son fagocitadas rápidamente por macrófagos de la mucosa del individuo sano, evitándose la activación de la respuesta inmune intestinal (tolerancia), en contraposición con lo que ocurriría si fuera un microorganismo patógeno (Macpherson y cols., 2000).

• Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que comprende colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), se caracteriza por la crónica y recurrente inflamación del intestino, generando diarrea, dolor abdominal y otros síntomas que disminuyen la calidad de vida del paciente. Existen diferencias importantes con respecto a la fisiopatología y tratamiento entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. La colitis ulcerosa afecta exclusivamente el intestino grueso a nivel de la mucosa, fundamentalmente a la región distal (recto/ano) mientras que la enfermedad de Crohn se caracteriza por la inflamación transmural y puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, frecuentemente a la región ileocecal (Gassull y Cabre, 1994). La inflamación se propaga a través de toda la pared intestinal, originando la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas en órganos adyacentes (Gasche, 2000; Levine, 1994). Estas lesiones afectan de forma discontinua y simultánea a cualquier segmento del tubo digestivo, es decir, pueden aparecer intercaladamente segmentos inflamados con otros que no presentan inflamación.

La importancia de EII como un problema de salud reside en su impacto en la calidad de vida del paciente y su prevalencia, que ha aumentado en los últimos años (Daddaoua y cols., 2007). Aunque la etiología de EII es actualmente desconocida, el papel que desempeña la flora intestinal es determinante en el desarrollo de los acontecimientos que finalmente dan lugar a las recaídas (Mahida y Rolfe, 2004). La hipótesis más aceptada, establece que en un individuo genéticamente predispuesto

interaccionan determinados factores ambientales, originándose una respuesta inmune exagerada frente a un antígeno presente en el lumen intestinal, respuesta que no es convenientemente controlada, por los mecanismos responsables de nuestro organismo, y que promueve la aparición y mantenimiento del proceso inflamatorio (Podolsky, 2002).

Por lo tanto, probablemente la enfermedad inflamatoria intestinal representa una incontrolada y exacerbada respuesta a los antígenos lumbales que en circunstancias normales sería controlada por los mecanismos reguladores del sistema inmune (Thompson-Chagoyan y cols., 2005). Aunque la EII puede ser a menudo manejada con éxito farmacológicamente, los medicamentos que se utilizan, por ejemplo, los corticoides, aminosalicilatos o azatioprina, tienen una gran cantidad de efectos adversos graves que limitan su aplicación. Por lo tanto, se requieren nuevos tratamientos con un bajo perfil de efectos adversos (Sands, 2000). Una estrategia de este tipo implica el uso de prebióticos y/o probióticos, con el objetivo de modular la flora intestinal para promover el crecimiento de bacterias beneficiosas e inhibir la proliferación de microorganismos potencialmente dañinos (Thompson-Chagoyan y cols., 2005).

Varios estudios han demostrado que los oligosacáridos obtenidos de diferentes fuentes (Daddaoua y cols., 2006; Hoentjen y cols., 2005) tienen un efecto antiinflamatorio en modelos *in vivo* de inflamación intestinal. La actividad antiinflamatoria del AHCC, se ha probado experimentalmente en un modelo de rata con colitis inducida por ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Daddaoua y cols., 2007) (Morris y cols., 1989). Estos métodos son muy útiles para el estudio de la inflamación colónica en animales de experimentación (tanto la dosis de TNBS como la concentración de etanol puede variar según el estudio y tiene que ser ajustada por el investigador). En el diseño experimental (Daddaoua y cols., 2007) además del grupo control, se incluyó un grupo de ratas tratadas con sulfasalazina, un fármaco antiinflamatorio, como un control positivo para evaluar el efecto terapéutico real del AHCC. Las alteraciones inducidas por la inflamación en el grupo de ratas denominadas T (al cuál se le induce la colitis y no recibe tratamiento), se reflejan los parámetros bioquímicos ensayados, mostrando además un aumento de citocinas

proinflamatorias y quimiocinas. Los investigadores observaron que la administración oral del AHCC afecta en gran medida las variables bioquímicas estudiadas, resultando en una reducción del estado inflamatorio, mediante una disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias. En todos los casos, el efecto del AHCC era comparable al producido por la sulfasalazina. Para estudiar más a fondo el mecanismo de acción del AHCC en la inflamación intestinal (Daddaoua y cols., 2007); los investigadores estudiaron los efectos del tratamiento con AHCC sobre los niveles de bacterias fecales en los diferentes grupos experimentales de ratas con colitis inducida por TNBS. El perfil de la microflora resulta alterado con la administración de TNBS presentando una disminución de las bacterias aeróbicas, bacterias ácido lácticas y un aumento de *Clostridium*. El tratamiento con AHCC mantiene los niveles normales del recuento bacteriano del perfil de la microflora, presentando un ligero aumento en el recuento de las bifidobacterias. En contraste, el tratamiento con sulfasalazina no produce ningún efecto en el recuento bacteriano de aerobios, bacterias ácido lácticas y *Clostridium* pero presenta un aumento considerable en el recuento de las bifidobacterias. Cabe resaltar que en este estudio, los resultados obtenidos con el AHCC muestran un efecto similar e incluso mayor que la sulfasalazina, un fármaco ampliamente utilizado para tratar la EII. Uno de los aspectos más llamativos del tratamiento con AHCC en comparación con la sulfasalazina es el efecto beneficioso sobre la ganancia de peso e ingesta de alimento de las ratas, cuyo efecto podría estar relacionado con los niveles más altos de citocinas tipo IL 1 asociadas al tratamiento con AHCC. Asimismo, afirman que su mecanismo de acción podría estar relacionado con su capacidad para promover la presencia de una microflora beneficiosa en el colon (bacterias de ácido láctico, bacterias aerobias y bifidobacterias). Por lo tanto, este compuesto puede ser una valiosa adición a las alternativas terapéuticas actuales para tratar la EII y podría ser útil emplearlo como prebiótico, para estimular a las bacterias que se encuentran en nuestro organismo como constituyentes de la flora intestinal, reforzando el sistema inmunológico.

Sobre la base del estudio (Daddaoua y cols., 2007), se propone el siguiente trabajo: "AHCC y *Bifidobacterium longum* BB536 ejercen sinergismo en colitis experimental" (Ocón y cols., 2013). En este artículo se Investigó el posible sinergismo entre el AHCC, que actúa como un prebiótico, y *Bifidobacterium longum*

(un probiótico con un potencial efecto promotor de la salud a nivel intestinal). En este estudio, se utilizó también el modelo de rata con colitis inducida por ácido TNBS (Daddaoua y cols., 2007). Esta asociación simbiótica ha sido diseñada para ofrecer beneficios para la calidad de vida en pacientes con EII (Fujimori y cols., 2009). *Bifidobacterium longum* ha sido probado anteriormente a corto plazo en pacientes con CU en asociación con otro sustrato prebiótico obteniéndose resultados positivos (Furrie y cols., 2005). Los resultados muestran que ambos tratamientos tuvieron actividad antiinflamatoria intestinal por separado, dicha actividad era mejorada cuando se usaba en combinación ambos compuestos (Ocón y cols., 2013).

El AHCC ejerce efectos terapéuticos en colitis a través de los linfocitos T (Mascaraque y cols., 2014). Los resultados demuestran que el AHCC presenta actividad antiinflamatoria en el colon impulsada por los linfocitos T, en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal crónica.

1.1.7.5. Patologías hepáticas

La suplementación con AHCC ha demostrado mediante una serie de estudios (Aviles y cols., 2006; Ritz y cols., 2006; Daddaoua y cols., 2007; Fujii y cols., 2007; Aviles y cols., 2008; Terakawa y cols., 2008), efectos positivos en el sistema inmunológico, efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Además el AHCC mejora el pronóstico hepatocelular postoperatorio en pacientes con carcinoma (Matsui y cols., 2002), sin embargo, el mecanismo por el cuál, el AHCC protege al hígado no está bien definido.

El AHCC inhibe la expresión de iNOS, biomarcador proinflamatorio, en los hepatocitos (Matsui y cols., 2011). En el hígado el óxido nítrico (NO) es producido y expresado constitutivamente por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), esta enzima se localiza en las células endoteliales sinusoidales vasculares, en condiciones fisiológicas es insignificante, pero en condiciones patológicas como sepsis, shock hemorrágico, isquemia-reperfusión, hepatitis y cirrosis se expresa en las células hepáticas incluyendo hepatocitos y células de Kupffer. El exceso de NO

por iNOS durante la infección y la inflamación en el hígado puede estar relacionado con una lesión hepática, la expresión de iNOS es un biomarcador en proinflamación (Matsui y cols., 2011). Estudios previos de fármacos clínicos que mostraron efectos hepatoprotectores en varios modelos animales de lesión hepática (Tsuchiya y cols., 2004; Tsuji y cols., 2005; Tanaka y cols., 2008; Hijikawa y cols., 2008; Ishizaki y cols., 2008), impidieron la inducción de iNOS en el hígado y disminuyeron la producción de mediadores inflamatorios. Por otro lado, estos fármacos ensayados en cultivos de hepatocitos de ratas estimulados con citocinas proinflamatorias (modelo de lesión hepática simple *in vitro*) también inhibieron la inducción de iNOS y la producción de NO (Nakanishi y cols., 2004; Tanaka y cols., 2008; Yoshida y cols., 2008). La posibilidad de que el AHCC podría inhibir la producción de NO como un posible mecanismo de protección del hígado fue investigado en el estudio antes mencionado (Matsui y cols., 2011). Los investigadores estudiaron si el AHCC influye en la inducción de la expresión génica de la iNOS, en cultivos primarios de hepatocitos de rata y el mecanismo involucrado en este proceso. Para lo cuál, elaboraron AHCC-SF, a partir de una disolución de AHCC en agua que se aplicó sobre una columna y se eluyó con agua y metanol. De esta primera elución se obtuvo 2 fracciones, la fracción de agua (compuestos hidrofílicos: azúcar, proteínas, etc.) y la fracción de metanol (compuestos hidrofóbicos: fibras, lípidos, polifenoles, etc.). Esta fracción de agua se concentró al vacío y luego se liofilizó (polvo amarillento). Esta misma fracción acuosa se vuelve a homogenizar en agua, se mezcla con metanol y se centrifuga, dos veces seguidas. A continuación, el precipitado se disuelve en agua y se aplica en otra columna y nuevamente se eluyó con agua y amoníaco. Obteniéndose dos fracciones: la fracción acuosa (compuestos neutros) y la fracción de amoníaco (compuestos catiónicos). Esta última fracción acuosa obtenida contiene el AHCC sin azúcar, se liofilizó y almacenó a -20°C. Los resultados demuestran que el AHCC-SF, inhibe la inducción de la expresión de iNOS y la producción de NO en lesiones hepáticas, desarrollando un papel hepatoprotector en modelos *in vitro*. Estos efectos hepatoprotectores deben ser apoyados con estudios en modelos de animales *in vivo* de daño hepático (Matsui y cols., 2011).

1.1.7.6. Sistema inmune

Las células T Helper (Th) o linfocitos T cooperadores o linfocitos CD4 +, son componentes esenciales del sistema inmune. Las células Th son heterogéneas y pueden dividirse en Th 1, Th 2 y Th 17 según la citocina que predominantemente producen (Zhu y cols., 2010). Las células Th 1 y Th 17 producen interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 17 (IL-17) respectivamente, y las células Th 2 producen IL-4 e IL-13. Cada subconjunto de células Th tienen un papel único en la defensa del huésped contra microorganismos patógenos (Reiner, 2007). Las células Th 1 frenan eficazmente microorganismos intracelulares como micobacterias y virus mediante la activación de IFN- γ . Las células Th 17 desempeñan un papel importante en la eliminación extracelular de bacterias y hongos mediante la expansión y activación de neutrófilos con IL-17 y los parásitos son controlados por las células Th 2 que producen IL-4 e IL-13 que pueden activar eosinófilos. El desarrollo de los diferentes subconjuntos de células Th es dependiente de las citocinas del medio (Zhu y cols., 2010; Murphy y cols., 2010). IFN- γ e IL-12 inducen la diferenciación de las células Th 1, mientras que IL-4 promueve el desarrollo de las células Th 2. Los monocitos son leucocitos grandes circulantes del linaje mieloide, con funciones esenciales dentro de la inmunidad innata incluyendo la fagocitosis y la producción de citocinas (Auffray y cols., 2009).

Los monocitos presentan receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos receptores incluyen los receptores tipo Toll (TLRs) que reconocen moléculas microbianas tales como lipopolisacáridos (LPS). La activación de estos receptores produce una formación de moléculas inflamatorias tales como IL-1 β . La producción de estas moléculas (IL-1 β) es esencial para iniciar y dirigir el desarrollo de la respuesta inmune a través del establecimiento de señales de activación a las células inmunes. Con la capacidad para producir citocinas, los monocitos pueden promover el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, incluyendo diferenciaciones de las células Th (Geissman y cols., 2008; Auffray y cols., 2009).

Los oligosacáridos incluyendo α -glucanos y β -glucanos de diversos microorganismos, cultivos y hongos son conocidos por estimular células inmunes, tales como macrófagos y células dendríticas (Estrada y cols., 1997; Hoshi y cols., 2005; Bittencourt y cols., 2006; Nisini y cols., 2007; Gerosa y cols., 2008). El AHCC contiene oligosacáridos en su composición, siendo éstos el componente más abundante del AHCC, aproximadamente el 74% del peso en seco (Ritz, 2008).

Modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* del AHCC, han demostrado efectos inmunomoduladores, tanto en humanos (Matsui y cols., 2002) como en roedores (Burikhanov y cols., 2000; Matsushita y cols., 1998; Wakame y cols., 1999); aumentando la actividad de las células NK, (Mamdooh y cols., 1992), la producción de citocina IL-12 (Yagita y cols., 1990; Yagita y cols., 2002), aumentando el número y las funciones de las células dendríticas (Terakawa y cols., 2008), e incrementando el número de células T CD8+ y células T $\gamma\delta$ (Hoshi y cols., 2005; Ritz, 2008; Terakawa y cols., 2008).

El AHCC promueve las respuestas celulares de los linfocitos Th (Th 1 y Th 17) a través de la inducción de la producción de IL-1 β por monocitos en humanos (Lee y cols., 2012). Se investigó si el AHCC podría promover las respuestas Th 1 y Th 17 mediante la estimulación de los monocitos, estas últimas células son abundantes en la sangre y tienen la capacidad de producir citocinas tales como IL-1 β . Se analizó también la medida de la producción de IL-1 β , a partir de los monocitos estimulados con AHCC, utilizando la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas). Los resultados de este estudio demostraron que los monocitos humanos tratados con AHCC, inducen altos niveles de producción de IL-1 β , la cuál promueve respuestas celulares Th 1 y Th 17.

1.2. *Trichinella spiralis*

El género *Trichinella* y la enfermedad que produce se conocen desde hace relativamente poco tiempo. A pesar de haber sido una de las parasitosis más estudiadas y combatida por las autoridades sanitarias de numerosos países, su conocimiento presenta aún en la actualidad numerosas lagunas (García, 2008).

El descubrimiento de *Trichinella spiralis* se debe a James Paget, estudiante de medicina de primer año en el hospital de San Bartolomé en Londres, en el año 1835, él observó el parásito en el músculo del diafragma de un albañil italiano de 51 años que había muerto de tuberculosis. Paget observó unas partículas en forma de arenilla que restaban afilado a su bisturí, tras la búsqueda insistente de un microscopio, consiguió examinar su muestra en el departamento de Botánica del Museo Británico. Aunque Paget comunicó su hallazgo en la Albernetian Society (un club de estudiantes), fue el zoólogo británico Richard Owen, un profesor suyo, quien días después denunció el hallazgo ante la Sociedad Zoológica de Londres y describió al parásito; identificándolo como un nematodo y denominándolo *Trichina spiralis*. Owen reconoció a Paget como el descubridor, y éste permitió a Owen que la denominara, quizás a cambio del prestigio y peso profesional que aportaba. En 1895 Raillet propuso el cambio de nombre de esta especie por el de *Trichinella spiralis*, ya que *Trichina* había sido aplicado a un género de mosca en 1830 (García, 2008; Ramírez, 1981; Gould, 1970).

La enfermedad es reconocida en los años siguientes en varios países, y sus sucesivos brotes, a veces con altos índices de mortalidad, alarman y conciencian rápidamente a la opinión pública. La inspección triquinoscópica se fue implantando y a finales del siglo XIX era una práctica común en Europa. Hace más de siglo y medio del descubrimiento de *Trichinella spiralis* y desde entonces hasta nuestros días el interés suscitado por este nematodo ha sido enorme, tanto desde el punto de vista sanitario, por la zoonosis que produce, como por su idoneidad como modelo de laboratorio para el estudio de otras helmintiasis y de su biología celular (García, 2008).

La *Trichinelosis* constituye una enfermedad zoonótica cosmopolita de origen alimentario, el agente etiológico causal es el nematodo *Trichinella spiralis*. Se considera un parásito eurixeno por la gran cantidad de hospedadores a los que puede afectar (Muñoz y cols., 2007).

La *Trichinelosis* es una enfermedad que no ocasiona de manera habitual la muerte. No presenta un cuadro clínico definido en su inicio y se confunde

habitualmente con enfermedades gastrointestinales o intoxicaciones alimentarias. Cuando existe una carga parasitaria importante las manifestaciones clínicas dependen del estadio: fase intestinal, sistémica ó muscular. No está considerada como un problema de salud pública, sin embargo sigue prevaleciendo en la población debido al consumo de carne de cerdo o jabalí que no ha pasado los pertinentes controles sanitarios (Chávez y cols., 2007).

1.2.1. Ciclo Biológico de *Trichinella* spp.

El ciclo parasitario se relaciona estrechamente con los signos y síntomas presentados y es similar en el ser humano y en los animales. A lo largo del ciclo biológico presenta diferentes formas morfológicas: larva infectante, llamada larva 1 (L1), hembra adulta (HA) y macho adulto (MA), y por último larva recién nacida (LRN). *Trichinella* spp., presenta un ciclo autoheteroxeno, lo que significa que el mismo hospedador alberga tanto las formas adultas (HA y MA), como las LRN y las L1 que serán infectantes para un nuevo hospedador (Ambrosioni y cols., 2006).

El ciclo se completa en un solo hospedador y se efectúa en tres fases: una primera fase entérica (a nivel intestinal), que comprende cuatro estadios larvarios, las formas adultas y la reproducción sexual de éstas, una segunda fase parenteral (migratoria, paso por vía hemolinfática), que abarca la migración de la LRN por todo el cuerpo y una tercera fase muscular, que comprende el asentamiento de esta forma larvaria en la musculatura estriada y su posterior evolución hasta el estadio L1, capaz de infectar a un nuevo hospedador (Becerril, 2004; García, 2008).

Las figuras (7, 8, 9 y 10), muestran L1 y formas adultas de *Trichinella* spp. El MA de *Trichinella spiralis* tiene un tamaño aproximado de 1,5 mm de largo y 0,36 µm de diámetro (Figura 9), siendo más pequeño que las hembras. La HA de *Trichinella spiralis* presenta un tamaño de 3 mm de largo y 0,36 µm de diámetro (Figura 10).

Tanto en la fase enteral como en la parenteral, el parásito induce cambios estructurales y químicos significativos. La larva infestante L1 ubicada en el tejido

muscular estriado, en unas estructuras altamente organizadas, produce una gran modificación en las células musculares (Purkenson y Despommier, 1974). La vida de esta L1 en estado “de espera” puede ser tan larga como la vida del hospedador. En contraste, los gusanos adultos se sitúan en las células del epitelio columnar o epitelio simple cilíndrico de la mucosa intestinal, tanto en células caliciformes como enterocitos o células absortivas, sobre todo en la base de las vellosidades, encontrándose directamente en el citoplasma, no apareciendo rodeadas de membrana del hospedador (Gardnier, 1976; Wright, 1979).

La fase intestinal es transitoria, permaneciendo de varias semanas a meses, dependiendo de la capacidad de la respuesta inmunitaria a cada cepa de las distintas especies de hospedadores (Wakelin y Denham, 1983; Bell, 1985). Así, cuando *T. spiralis* parasita a ratones desnudos (Ruitenbergh, 1977) las formas adultas permanecen en el intestino durante toda la vida del hospedador.

Los nuevos embriones constituyen la fase no intracelular y existen principalmente como formas libres, dentro del lumen de vasos sanguíneos y linfáticos. Sin embargo, estos embriones en su comportamiento, tienden a infectar células del músculo esquelético y a menudo penetran en células en las cuales no llegan a formar quistes como cerebro, corazón, riñón, entre otros (García, 2008).



Figura 7. (L1) de *Trichinella* spp.



Figura 8. *Trichinella* spp. (larvas).



Figura 9. (MA) de *Trichinella* spp.



Figura 10. (HA) de *Trichinella* spp.

1.2.1.1. Fase Intestinal

La transmisión del parásito de un individuo a otro se realiza casi exclusivamente por la ingestión del tejido muscular infectado con larvas (L1) enquistadas. Aunque se han descrito otras vías de infección, éstas son excepcionales. Normalmente cuando un hospedador susceptible (Despommier, 1983), ingiere tejido muscular infectado por *Trichinella*, se produce un proceso de digestión por acción de la pepsina y del ácido clorhídrico del estómago, proceso que dura unos minutos, durante el cual la larva no sufre ningún desarrollo. Una vez liberada, la L1 rápidamente penetra en la mucosa intestinal, produciéndose una modificación en estas células para constituir el alojamiento de las larvas, en lo que se denomina “nicho intramulticelular” (Despommier, 1983; Capo y cols., 1984).

El nicho intracelular consiste en una fila de células del epitelio columnar dentro de las cuales la larva se introduce. Ya que la larva L1 mide aproximadamente 1 mm de longitud por 35-38 μm de diámetro, y cada célula columnar mide aproximadamente 32 μm por 8,5 μm , cada gusano ocupa aproximadamente 117 células columnares durante la fase intestinal (Campbell, 1983).

Es generalmente en el duodeno donde se localiza el mayor número de larvas. Una vez en su nicho intramulticelular, las L1 sufren cuatro mudas, que se completan en un espacio de 30 horas, alcanzando el estado juvenil. Una vez llegados a la

madurez sexual se produce rápidamente el apareamiento, presumiblemente dentro de la mucosa intestinal (Despommier, 1983).

Una vez fecundadas las hembras, en el interior de los huevos, se desarrollan las L1, eclosionan en el interior del útero y posteriormente son eliminados por la vulva. Esta larviposición se realiza en el epitelio, desde donde las larvas migran a vénulas y vasos linfáticos (García, 2008).

1.2.1.2. Fase migratoria

El inicio de la fase migratoria depende de la especie hospedadora. Una vez que las L1 abandonan el útero de las hembras adultas, son transportadas rápida y pasivamente a los músculos, las larvas atraviesan la lámina propia del intestino, alcanzan los vasos linfáticos, vía vena cava superior llegan al corazón y por la aorta se incorporan a la sangre arterial para ser distribuidas por todo el organismo. El pico de L1 en sangre oscila entre el día 9 post-infección (Harley y Gallichico, 1971) y el día 12 (Yang y cols., 1984).

La fase de emigración es el único período, junto con el breve tiempo en el cuál las L1 permanecen en el estómago tras la infección, en el que *Trichinella* se comporta como un parásito extracelular. A pesar de que se han descrito infecciones transitorias en células de diversos órganos, únicamente las células del tejido muscular estriado constituyen el nicho intracelular adecuado para que continúe el desarrollo de la larva, a partir de este momento *Trichinella* se convierte de nuevo en un parásito intracelular. Existen numerosos trabajos sobre los músculos más frecuentemente infectados, de los cuales se concluye que los músculos que tienen mayor actividad son los más altamente parasitados, por ejemplo: diafragma, intercostales, bíceps, tríceps, flexores y extensores de carpo y tarso, linguales, faríngeos, etc. (García, 2008).

1.2.1.3. Fase muscular

Durante esta fase intracelular, las larvas aparecen asociadas al citoplasma de la célula hospedadora (Despommier, 1975). Durante la pausa que se produce en su ciclo de desarrollo (días 3 y 4 post-penetración), el nicho intracelular muestra una nueva disposición, produciéndose cambios estructurales de forma que la célula hospedadora pierde las características de fibra muscular y adquiere las características de una nueva entidad, la “célula nodriza” (Backwinkle y Themann, 1972; Despommier, 1975).

El crecimiento de la larva dentro de su nicho, es sobre todo debido al crecimiento de su esticosoma (Despommier, 1973; Bruce, 1974). El gusano enrollado en el interior de su célula nodriza, alcanza así la situación “de espera” antes de reiniciar una nueva fase entérica en otro hospedador. El tiempo necesario para la calcificación de los quistes varía considerablemente en función de la especie hospedadora; en general se admite que las larvas permanecen viables durante largos períodos de tiempo en el interior de los quistes calcificados (García, 2008).

Las figuras 11 y 12, muestran las etapas de diferenciación de la célula nodriza y el ciclo biológico interno de *Trichinella spiralis* respectivamente.

El ciclo biológico de este parásito es fundamentalmente endocelular y se produce en las microvellosidades intestinales y en el tejido muscular. La producción de larvas por parte de la HA depende del grado de infestación, del estado inmunológico y especie del hospedador, así como de la especie de *Trichinella*.

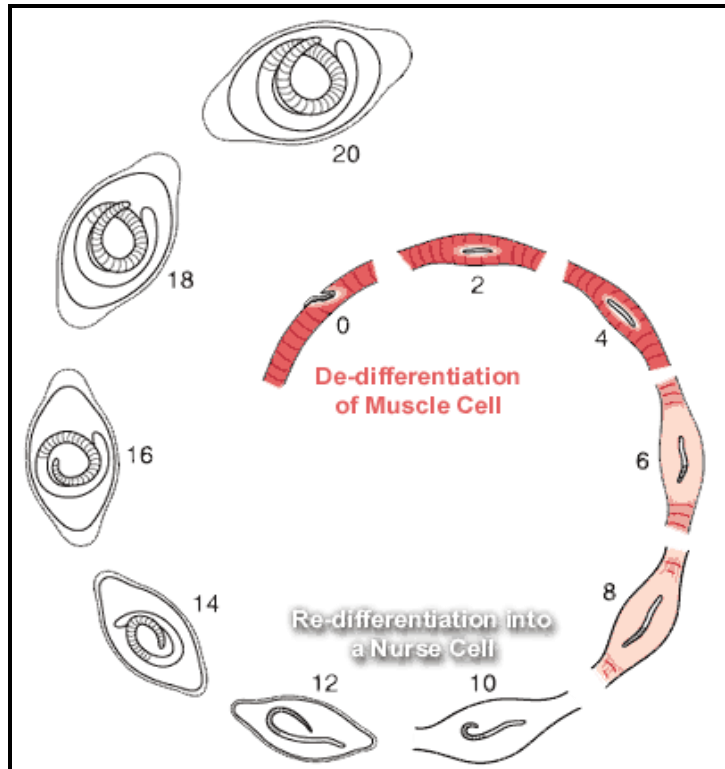


Figura 11. Ciclo biológico *T. spiralis* (adaptado de Despommier, 1975).

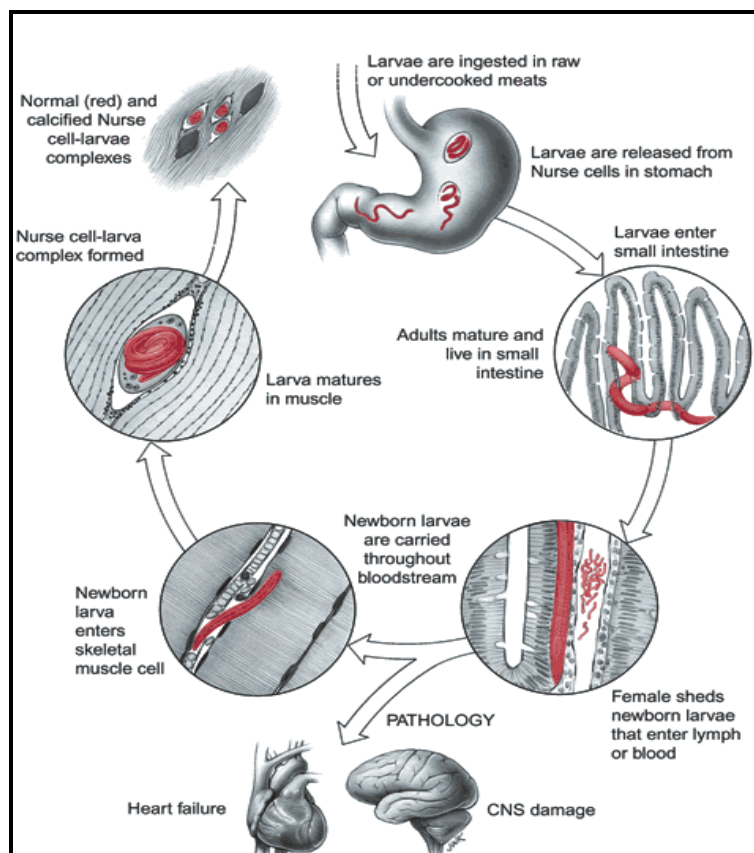


Figura 12. Ciclo biológico de *T. spiralis*. (adaptado de www.trichinella.org/bio_lifecycle.htm).

1.2.2. *Trichinella* en ratón, como modelo experimental de quimioterapia antihelmíntica

El desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios, para su uso tanto en medicina humana como veterinaria, requiere un enfoque multidisciplinar; por ejemplo recurriendo a la aplicación de la Tecnología Farmacéutica se producen o mejoran sustancias dotadas de una posible actividad farmacológica, hecho que se comprueba, haciendo uso de modelos experimentales para el cribado farmacológico tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos modelos experimentales deben responder a un planteamiento económico simple, es decir, deben permitir obtener los máximos rendimientos, utilizando los mínimos medios posibles.

El modelo experimental murino de *Trichinella*, nos permite realizar un cribado sencillo y eficaz. Esto es debido, por un lado al fácil mantenimiento de este parásito en los animales de laboratorio y por otro, al corto período de tiempo necesario para reproducir su ciclo biológico completo, pudiendo, por lo tanto, ensayar fármacos con posible actividad antihelmíntica a diferentes niveles, siendo los resultados extrapolables a un gran número de estados clínicos reales (López, 1996).

2. Parte experimental

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. CARACTERIZACIÓN DEL AHCC

Durante el desarrollo experimental se han utilizado los siguientes lotes de AHCC:

- AHCC-FD (Lote 94-0119). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote 84-0818-2). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote E93-0706-2). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote E13-0403-2). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote E14-0214-2). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote E15-0228-2). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote E18-0822-1). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FD (Lote C28-1018-1). Amino Up Chemical Co. Ltd.
- AHCC-FG (Lote 905FE92). Amino Up Chemical Co. Ltd.

AHCC-FD y **AHCC-FG** son presentaciones diferentes de AHCC. AHCC-FD es un compuesto obtenido por extracción y posterior liofilización, por su naturaleza y composición es higroscópico. AHCC-FD se puede considerar como una materia prima que se puede combinar con estabilizantes grasos para dar AHCC-FG que es un granulado fino (formulación hidrófoba) que puede utilizarse directamente en sobres o en cápsulas.

2.1.1. Análisis organoléptico

Se ha realizado el análisis de las dos presentaciones de AHCC como materia prima y los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis organoléptico de las dos presentaciones utilizadas.

| Presentaciones | Lotes | Aspecto | Olor y Color | Sabor | Solubilidad |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| AHCC-FD (Polvo liofilizado) | 94-0119 84-0818-2 E93-0706-2 E13-0403-2 E14-0214-2 E15-0228-2 E18-0822-1 C28-1018-1 | Polvo muy fino, liofilizado, higroscópico. | Marrón de olor característico | Amargo, Recuerda a café | Alta solubilidad en agua. |
| AHCC-FG (Fine Granules, gránulos finos) | 905FE92 | Gránulos muy finos. | Marrón claro de olor característico | Amargo | Flota y no se dispersa en agua. |

2.1.2. Cuantificación de AHCC mediante espectrofotometría

2.1.2.1. Validación del método espectrofotométrico

Para cuantificar la cantidad de AHCC se diseñó y desarrolló un método de análisis por espectrofotometría UV-Visible.

- **Equipos utilizados**

- Espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700, Shimadzu, Japón.
- Agitador magnético-calefactor RCT Basic IKA. Labortechnik, Alemania.
- Baño de ultrasonidos ULTRASON-H, Selecta.

- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de 0,1 mg \pm 0,01, que mide el rango de 1 mg a 101 g.

- **Reactivos y filtros**

- Agua desionizada de Millipore Elix 3.
- Excipientes presentes en AHCC-FD y FG (Amino Up Chemical Co. Ltd.)
- Sodio dodecilo sulfato, Panreac Química S.A., Barcelona, España.
- Filtros de membrana de polipropileno de 0,45 μ m, hidrófilo (Acrodisc Pall ®).

Para validar el método, según las directrices ICH, se han estudiado los siguientes parámetros: Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud y Robustez.

- **Muestras analizadas** (Proporcionadas por Amino Up Chemical Co. Ltd.):

- AHCC-FD (Lote 84-0818-2).
- AHCC-FD- α Ciclodextrina (Lote 94-0119).
- Muestra P (Lote 83-0630-1).
- Cápsula AHCC (Lote 08038G).
- AHCC-FG (Lote 905FE92).

Las muestras se solubilizaron en agua desionizada y se filtraron a través de membranas de 0,45 μ m de polipropileno.

Antes de empezar con la validación del método analítico, preparamos disoluciones acuosas [Concentración: 0,5 mg/ml] con cada una de las muestras a analizar y realizamos sus correspondientes barridos en el espectrofotómetro. La figura 13, muestra un barrido en el espectrofotómetro de la disolución de AHCC-FD (Lote 84-0818-2). Todas las muestras analizadas de AHCC mostraron una máxima absorción UV a 275 nm. Las demás muestras analizadas presentan un espectro similar a la figura 13.

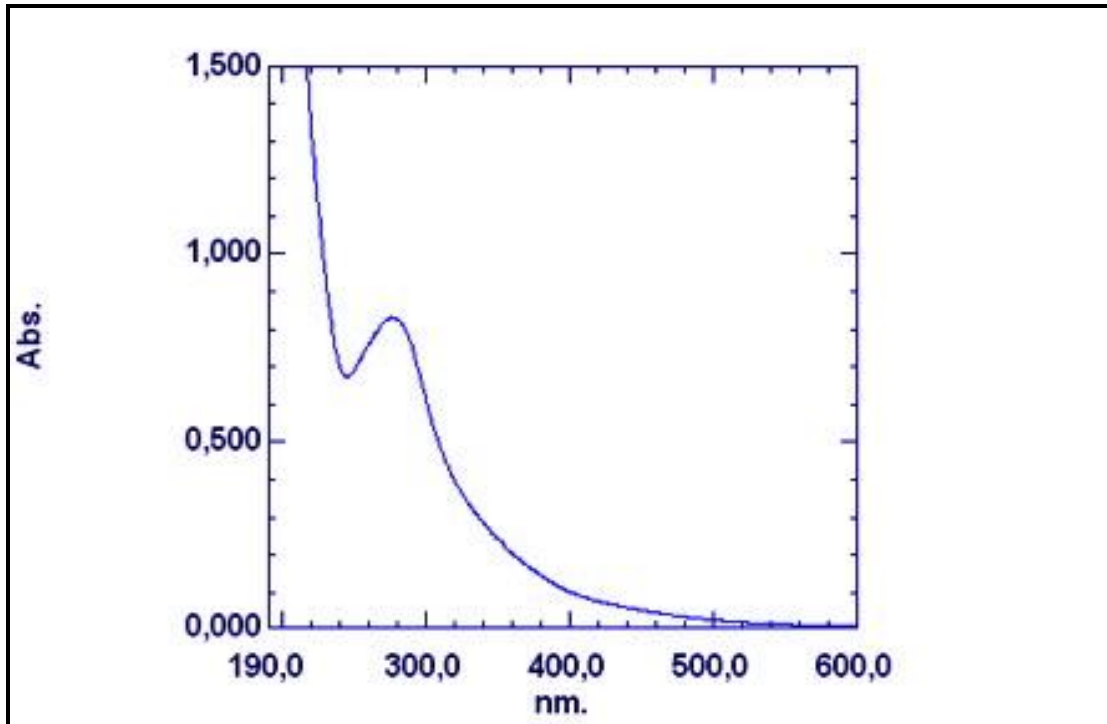


Figura 13. Barrido UV/VIS de la disolución de AHCC-FD (Lote 84-0818-2).

Uno de los componentes químicos del AHCC es el isomaltol que es un agente aromatizante y saborizante. La estructura química del isomaltol tiene un grupo cromóforo y disuelto en metanol tiene una máxima absorción UV a 280 nm (Index Merck, 2002). Es esta estructura química la que nos sirve de referencia para poder analizar de forma cuantitativa el AHCC y valorarlo en base al isomaltol presente. Todas las muestras analizadas de AHCC, solubilizadas en agua desionizada, mostraron una máxima absorción UV a 275 nm. Se seleccionó esta longitud de onda (λ), de 275 nm para analizar AHCC.

- **Preparación de la disolución patrón:**

En un matraz aforado pesamos exactamente 50 mg de muestra y la disolvemos en 50 ml de agua desionizada con la ayuda de un agitador magnético, después filtramos y obtenemos una concentración de 1 mg/ml de muestra.

- **Selectividad:**

Empezamos estudiando este parámetro para demostrar que el método analítico no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. Para probar la posible interferencia de los diferentes excipientes, se preparó una mezcla placebo.

- ✓ **Preparación de la mezcla placebo**

Preparamos una mezcla placebo equivalente a 10 g de una muestra de AHCC-FD. Para lo cual, en primer lugar pesamos exactamente cada uno de los excipientes que forman el producto y luego procedimos a mezclarlos homogéneamente. De esta mezcla placebo preparamos una disolución acuosa [Concentración 0,5 mg/ml] y realizamos un barrido en el espectrofotómetro. La absorbancia en la longitud de onda ($\lambda=275$), fue de solo 0,008 de intensidad.

- **Linealidad:**

Con la finalidad de demostrar que los resultados de absorbancias de las muestras analizadas son linealmente proporcionales a la concentración de principio activo presente en la muestra, evaluamos la linealidad. Para su estudio hemos preparado por triplicado una disolución patrón [concentración 1 mg/ml] de cada una de las muestras a analizar en agua desionizada, durante 3 días diferentes. Cada día se preparó disoluciones patrón de cada una de las muestras analizadas. De cada disolución patrón tomamos alícuotas en matraces aforados, diluyendo y enrasando con agua desionizada. Las concentraciones obtenidas de cada disolución patrón son las siguientes: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 $\mu\text{g/ml}$.

- **Precisión:**

Se ha determinado la variabilidad del método analítico mediante el estudio de repetibilidad y de precisión intermedia. En el ensayo de repetibilidad comprobamos la variabilidad del método en el mismo día del análisis, mientras que el análisis de precisión intermedia nos indica la variabilidad existente entre diferentes días.

- ✓ **Repetibilidad:** se preparó por duplicado disoluciones patrón para cada muestra. De cada disolución patrón se toma una alícuota determinada para preparar 6 disoluciones [concentración 450 µg/ml], equivalente al 100% por cada muestra ensayada y se miden las absorbancias en el espectrofotómetro.
- ✓ **Precisión intermedia:** se estudió midiendo las absorbancias de las disoluciones preparadas para evaluar la repetibilidad al día siguiente de haber realizado el ensayo, así evaluamos la variación entre diferentes días de análisis.

Como referencia para la cuantificación se tomó la muestra de AHCC-FD (Lote 84-0818-2) y se la consideró como pureza del 100%. En ambos estudios se han determinado los siguientes parámetros: concentración obtenida, porcentaje de recuperación y la desviación estándar relativa (RSD).

- **Exactitud:**

Este ensayo demuestra la proximidad entre los resultados obtenidos por el método analítico (valor teórico) y el valor real. Para su estudio preparamos por triplicado disoluciones placebo cargadas con diferentes cantidades de AHCC obteniendo disoluciones en un rango de 80%, 100% y 120% (estas son las concentraciones teóricas). Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes: 350, 450 y 550 µg/ml equivalentes al 80%, 100% y 120% de una concentración conocida. A partir de los resultados se ha calculado a cada concentración, la media del porcentaje de recuperación, RSD y los límites de confianza al 95%.

- **Robustez:**

Estudiamos la robustez al añadir un agente surfactante al medio de disolución y someter las muestras a calentamiento, a través de:

- **La adecuación del método para la cuantificación de los gránulos de AHCC-FG:**

Los gránulos de AHCC-FG tienen en su formulación un alto contenido de lubricante. Esto trae como consecuencia que sea difícil la liberación completa de su contenido. Con el fin de probar como afecta la presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) o también llamado lauril sulfato sódico (SLS), agente tensioactivo, en la disolución del contenido de los gránulos de AHCC-FG, se realizó el siguiente experimento:

- ✓ Pesamos exactamente 250 mg de gránulos de AHCC-FG (contenido de las cápsulas de AHCC a analizar). Estos gránulos se suspendieron en dos medios diferentes. Uno con agua desionizada y el otro además de agua desionizada contenía SLS a una concentración de 0,5 mg/ml. Durante 30 minutos las muestras se agitaron con un agitador magnético a velocidad media y a temperatura ambiente, luego se tomó una alícuota, se filtró y analizó en el espectrofotómetro ($\lambda=275$). Se realizó el experimento por triplicado.

Con el fin de comprobar si la energía de ultrasonidos puede mejorar la extracción y disolución del contenido de las cápsulas de AHCC (AHCC-FG), realizamos el siguiente experimento:

- 1.- Agitación magnética del contenido de las cápsulas de AHCC (250 mg/500 ml), durante 30 minutos en un medio de disolución con SLS (0,5%) y sin SLS. Se realiza por triplicado.

2.- Condiciones 1 + 30 minutos de agitación en un baño de ultrasonidos, durante este proceso la muestra alcanza una temperatura de 42°C. Analizamos en el espectrofotómetro una muestra previamente filtrada.

3.- Condiciones 1 + 60 minutos de agitación en un baño de ultrasonidos, durante este proceso la muestra alcanza una temperatura de 54°C. Tomamos una alícuota y la medimos en el espectrofotómetro previa filtración.

4.- Condiciones 1 + 90 minutos de agitación en un baño de ultrasonidos, durante este proceso la muestra alcanza una temperatura de 64°C. La muestra se analiza como en los casos anteriores.

2.2. DESARROLLO DE FORMULACIONES ORALES DE AHCC

En el presente trabajo diseñamos y elaboramos formulaciones hidrófilas de AHCC para cápsulas, comprimidos y sobres.

2.2.1. Cápsulas con AHCC

Nos planteamos disminuir el tamaño de las cápsulas de AHCC comercializadas (cápsulas de gelatina número "0"), para lo cuál decidimos diseñar una fórmula a encapsular en cápsulas número "1", con la misma cantidad de principio activo pero cambiando los excipientes y disminuyéndolos. Reducimos la cantidad de lubricante, al disminuir el agente graso lubricante se debe evaluar el efecto en fluidez, velocidad de disolución y estabilidad. Asimismo, se propone la sustitución de cápsulas de gelatina convencional por cápsulas vegetales de hidroxipropil metil celulosa o hipromelosa (HPMC), blancas, con un bajo nivel de humedad adecuadas para ingredientes sensibles a la humedad (el AHCC-FD es un polvo liofilizado muy higroscópico).

- **Equipos utilizados**

- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de $0,1 \text{ mg} \pm 0,01$, que mide el rango de 1 mg a 101 g.
- Encapsuladora manual.
- Estufa de secado (J. Bonals), Barcelona, España.

- **Materiales y reactivos**

- AHCC-FD (Lotes: 84-0818-2, E93-0706-2).
- Tamices (desde una luz de malla de 0,040; 0,100; 0,125; 0,200; 0,297; 0,350; 0,500; 0,710 hasta 1,500 mm).
- Morteros de porcelana, bandejas de secado (granulados).
- Cápsulas de HPMC blancas, número "1" (Amino Up Chemical Co. Ltd.).
- Cápsulas de HPMC blancas, número "1", Vcaps, Capsugel.
- Excipientes fluidificantes, lubricantes y diluyentes autorizados en industria alimentaria.
- Etanol 96° (alcohol etílico), lote 1170, Alcoholes Aroca, S.I., España.

2.2.1.1. Mezcla directa a encapsular

Primero se pesan los componentes y se prepara la mezcla para 100 cápsulas. El peso de mezcla a encapsular es de 0,85 g de los cuales 0,48 corresponden a AHCC-FD (lote 84-0818-2). Los excipientes seleccionados son una mezcla de fluidificante, lubricante y diluyente aprobados para su uso en fabricación de complementos alimentarios.

Cada uno de los componentes de esta formulación se tamizan previamente antes de mezclarlos, en tamices de 0,710 o 0,500 mm (dependiendo del tamaño de partícula de la materia prima). Luego se mezclan manualmente en una bolsa de plástico, siguiendo exactamente el esquema anterior durante 10 minutos. De esta formulación preliminar se evaluó el ángulo de reposo (α), velocidad de flujo (V_f), el índice de Carr e índice de Hausner (Aulton, 2004). Hicimos un pequeño experimento antes de realizar el llenado de las 100 cápsulas de HPMC blancas número "1",

pesando 10 cápsulas vacías y 10 cápsulas llenas, para tener un peso promedio del contenido de cada cápsula.

Previamente se hace un análisis de granulometría con 2 lotes de AHCC-FD (84-0818-2 y E93-0706-2), utilizando para el ensayo 40 g de cada lote, empleando una serie de tamices con luz de malla desde 0,040; 0,100; 0,125; 0,200; 0,297; 0,350; 0,500; hasta 0,710 mm; durante 10 minutos de agitación manual.

Decidimos mejorar la fluidez de esta mezcla preliminar sustituyendo algunos excipientes y desarrollamos una segunda formulación en la que el contenido final por cápsula es de 0,4 g de los cuales AHCC-FD es 0,258 g.

✓ **La fórmula por cápsula (mg):**

| | |
|-----------------------------------------------|-----|
| AHCC-FD..... | 258 |
| Sipernat® (2 %)..... | 8 |
| Estearato de magnesio (1 %)... | 4 |
| Avicel® PH102 (32,5%)..... | 130 |
| Peso total del contenido por cápsula: 400 mg. | |

El contenido de AHCC-FD por cápsula es de 258 mg, que representa un 64,5% de riqueza. El volumen de una cápsula es 0,50 ml. De esta formulación se evaluó el ángulo de reposo, velocidad de flujo, el índice de Carr e índice de Hausner.

Las cápsulas elaboradas se almacenaron en un frasco ámbar con tapón de plástico rosca en un lugar fresco y seco a temperatura ambiente, para su posterior estudio de estabilidad. Al cabo de unas semanas, decidimos abrir el frasco para observar el aspecto de las cápsulas y su contenido. Las cápsulas presentaban buen aspecto, pero su contenido había captado humedad y la mezcla estaba apelmazada, endurecida. Entonces, nos planteamos mejorar la fórmula para cápsulas diseñando un granulado con etanol.

2.2.1.2. Granulado con etanol

Nos propusimos desarrollar un granulado para cápsulas, incorporando el lubricante en el etanol que utilizamos para granular, de esta manera recubrimos el AHCC con lubricante protegiéndolo de la humedad. Elaboramos varios granulados a través de tres fórmulas, probando diferentes excipientes y cambiando el porcentaje del agente lubricante. Preparamos 50 cápsulas con cada una de las fórmulas.

✓ **Fórmula 1 para una cápsula (mg):**

| | |
|---------------------------------------------------|-----------------|
| AHCC-FD (Lote E93-0706-2)..... | 250 |
| Aerosil® 200 (2%)..... | 6 |
| Ceolus® o Neusilin® UFL-2..... | 63 ó 51 (A o B) |
| Lubriwax® 102H (2%) o Compritol® 888ATO (6%)..... | 6 ó 18 (A o B) |

Peso total del contenido por cápsula: 325 mg de los cuales AHCC-FD es 76,9%. Hemos utilizado aluminometasilicato magnésico (Neusilin® UFL-2, agente antiapelmazamiento), ideal para polvos higroscópicos como el AHCC-FD.

Pesamos exactamente cada uno de los componentes y los tamizamos (tamiz de 0,710 mm), mezclamos homogéneamente en una bolsa de plástico el AHCC con el fluidificante y el diluyente durante 10 minutos. Dispersamos el lubricante en 9,5 ml de etanol de 96° hasta su total disolución. En un mortero incorporamos la mezcla y añadimos poco a poco la disolución anterior (punto crítico en la granulación). El granulado obtenido se tamiza por un tamiz de 1,5 mm y se deja evaporar el etanol a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se sigue secando el granulado en una estufa a una temperatura de 45°C por 1 hora. Transcurrido ese tiempo el granulado se retira de la estufa y se vuelve a tamizar por tamiz de 1,5 mm.

La tabla 4, muestra las cantidades utilizadas para preparar 50 cápsulas, con cada granulado (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8), empleando la fórmula 1.

Tabla 4. Muestra los diferentes tipos de granulados para cápsulas.

| Cantidades para elaborar 50 cápsulas con cada granulado | | | | | | |
|---------------------------------------------------------|---------|---------------|----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Tipos | AHCC-FD | Fluidificante | Diluyente (A o B) | Cantidad (A o B) | Lubrificante (A o B) | Cantidad (A o B) |
| G1 | 12,5 | 0,300 | A | 3,15 | A | 0,300 |
| G2 | 12,5 | 0,300 | B | 3,15 | A | 0,300 |
| G3 | 12,5 | 0,300 | A | 2,55 | A | 0,900 |
| G4 | 12,5 | 0,300 | B | 2,55 | A | 0,900 |
| G5 | 12,5 | 0,300 | A | 3,15 | B | 0,300 |
| G6 | 12,5 | 0,300 | B | 3,15 | B | 0,300 |
| G7 | 12,5 | 0,300 | A | 2,55 | B | 0,900 |
| G8 | 12,5 | 0,300 | B | 2,55 | B | 0,900 |

Los granulados (G1, G3, G5, G7) los descartamos porque al incorporar la disolución de etanol con lubricante producen un cambio de color y consistencia en las mezclas, a pesar de que se dejaron secar a temperatura ambiente y en estufa como se realizó con los otros granulados. A todos los demás granulados (G2, G4, G6, G8), se les realizó los siguientes análisis: Velocidad de flujo, tamaño de partícula, índice de Carr e índice de Hausner, humedad (% pérdida de peso por desecación), y posterior llenado en cápsulas número "1" utilizando la encapsuladora manual. Elaboramos 2 granulados más con la fórmula 2 y 3 respectivamente (G9 y G10). En ambas fórmulas suprimimos el Aerosil® 200 e incrementamos la cantidad de Neusilin® UFL-2 con la proporción de Aerosil® 200 suprimido, cambiando el porcentaje de lubricante.

✓ **Fórmula 2 para una cápsula (mg):**

AHCC-FD (Lote E93-0706-2).....250

Neusilin® UFL-2.....69

Compritol® 888 ATO (2%).....6

Peso total del contenido por cápsula: 325 mg.

✓ **Fórmula 3 para una cápsula (mg):**

| | |
|-----------------------------------------------|-----|
| AHCC-FD (Lote E93-0706-2)..... | 250 |
| Neusilin® UFL-2..... | 57 |
| Compritol® 888 ATO (6%)..... | 18 |
| Peso total del contenido por cápsula: 325 mg. | |

Elaboramos los granulados (G9 y G10), siguiendo el mismo procedimiento que los anteriores, gastando 16 ml de etanol para granular una mezcla para 50 cápsulas con cada una de las fórmulas. A estos granulados también les realizamos los ensayos correspondientes antes mencionados.

Las cápsulas obtenidas con cada granulado se almacenaron en diferentes frascos de cristal topacio con tapón de plástico rosca y su correspondiente etiqueta, para su posterior estudio de estabilidad.

2.2.1.3. Estudio de estabilidad de cápsulas de AHCC

Decidimos evaluar la estabilidad de las cápsulas de AHCC número “1” que habíamos elaborado, para lo cuál diseñamos un estudio de estabilidad acelerado. Con la finalidad de comparar la formulación desarrollada con la de referencia, en este estudio incluimos cápsulas de AHCC número “0” de HPMC, proporcionadas por Amino Up Chemical Co. Ltd., fabricadas por un laboratorio español de acuerdo a la fórmula japonesa. Estas cápsulas son las que se comercializan en Japón como complemento dietético. Las cápsulas de AHCC fabricadas en Japón son envasadas en frasco de vidrio ámbar y tienen 2 años de caducidad.

- **Equipos utilizados**

- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de $0,1 \text{ mg} \pm 0,01$, que mide el rango de 1 mg a 101 g.
- Estufa a $30^\circ \text{ C} \pm 2^\circ \text{ C}$.
- Balanza de infrarojo (desecador IR), Mettler MP 100 y LP16.

- Equipo de disgregación Pharma Test PTZ1.
- Encapsuladora manual.

- **Materiales y reactivos**
 - Cápsulas de AHCC número "1", de HPMC blancas (fórmula desarrollada en esta tesis).
 - 300 cápsulas de AHCC número "0", de HPMC transparente, en frasco de vidrio ámbar (lote 60734103), fórmula de referencia industrial fabricada en empresa de complementos alimentarios en Madrid, España.
 - Cápsulas de HPMC blancas, número "0", lote 53142571, Vcaps, Capsugel.
 - Cápsulas de gelatina dura transparente, número "0", lote 710056, Fagron, Ibérica. S.A.U.
 - Placas Petri de vidrio.
 - Solución saturada de cloruro de sodio (NaCl), genera una humedad relativa (HR) de $75\% \pm 5\%$: preparada en un desecador a partir de NaCl, Panreac Química S.A., Barcelona, España, a saturación en agua desionizada de Millipore Elix 3.
 - Solución saturada de dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), genera una HR de $96\% \pm 5\%$: preparada en un desecador a partir de KH_2PO_4 , Panreac Química S.A., Barcelona, España, a saturación en agua desionizada de Millipore Elix 3.

El contenido de las cápsulas de AHCC número "0" fórmula de referencia fabricada industrialmente en Madrid (según la fórmula japonesa de referencia), lo utilizamos para elaborar cápsulas de HPMC blancas y de gelatina dura transparente ambos tipos de cápsula número "0". Además de comparar formulaciones, queríamos determinar el tipo de cápsula más resistente frente a condiciones de almacenamiento adversas, siendo el AHCC-FD un polvo liofilizado higroscópico.

- **Muestras**

- 80 Cápsulas de HPMC transparentes, número "0".
- 80 Cápsulas de HPMC blancas, número "0".
- 80 Cápsulas de gelatina dura transparentes, número "0".
- 80 Cápsulas de HPMC blancas, número "1" (fórmula desarrollada).

La figura 14, muestra el contenido de las cápsulas de HPMC número "0", fabricadas industrialmente en Madrid (fórmula de referencia), al abrir las cápsulas de HPMC transparentes, observamos un fino y homogéneo granulado de color pardo oscuro, que fluye muy bien. Este granulado es el que empleamos para encapsular las cápsulas de HPMC blancas y de gelatina dura transparentes, ambos tipos de cápsulas número "0", utilizadas en este estudio de estabilidad.

En el estudio de estabilidad las cápsulas son colocadas en placas petri abiertas, distribuidas uniformemente, en desecadores con diferentes HR, estos desecadores cerrados los colocamos en una estufa a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figura 14. Contenido de las cápsulas industriales de referencia fabricadas en Madrid.

- **Tiempo de muestreo**

Para HR de $75\% \pm 5\%$, el estudio se realizó durante 15 días, tomando muestras en los siguientes días: 0, 2, 4, 9 y 15 y para HR de $96\% \pm 5\%$, el estudio se realizó durante 45 días, tomando muestra en los siguientes días: 0, 2, 4, 9, 15, 24 y 45.

Adicionalmente colocamos cápsulas vacías de los tres tipos ensayados durante 17 días, para determinar el porcentaje de humedad que captan respectivamente sin contenido. La figura 15, muestra los diferentes tipos de cápsulas colocadas en las placas petri antes de iniciar el estudio de estabilidad.

Es importante mencionar que las cápsulas son colocadas sin su envase de acondicionamiento primario, sea este frasco de vidrio ámbar, frasco de plástico, o blíster de aluminio. Por lo tanto, diseñamos un estudio de estabilidad en condiciones extremas, sin considerar el acondicionamiento primario.



Figura 15. Disposición de los diferentes tipos de cápsulas en placas petri abiertas, antes de colocarlas en los respectivos desecadores.

- **En el estudio de estabilidad analizamos:**

- ✓ **Aspecto.** Por observación visual tanto de la cápsula como del contenido.
- ✓ **Contenido de humedad en porcentaje.** La humedad del AHCC contenido en las cápsulas es medida por la pérdida de masa por desecación a través de una balanza de infrarrojo (IR) a una temperatura de 105°C durante 120 segundos (por triplicado).
- ✓ **Ensayo de disgregación.** Lo realizamos por triplicado para cada tipo de cápsula (Farmacopea Europea 6,0; p.718, 2008).

2.2.2. Comprimidos con AHCC

Se desarrollan comprimidos masticables de AHCC, que presenten buen aspecto y parámetros farmacotécnicos óptimos.

- **Equipos utilizados**

- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de 0,1 mg \pm 0,01, que mide el rango de 1 mg a 101 g.
- Máquina de comprimir excéntrica de sobremesa Korsch conectada a motor Erweka (modelo EK 0).
- Estufa de secado (J. Bonals), Barcelona, España.
- Equipo de disgregación Pharma Test PTZ1.
- Calibre.

Desarrollamos una formulación preliminar para comprimidos de AHCC, la cuál modificamos con la finalidad de obtener comprimidos masticables de AHCC, que presenten buen aspecto y parámetros farmacotécnicos óptimos.

- **Materiales y reactivos**

- AHCC-FD (Lote 94-0119).
- Tamices (0,710; 1,500 mm).
- Morteros de porcelana, bandejas de secado (granulados).

- Neusilin® UFL-2 (aluminio metasilicato magnésico), lote 912025, Fuji Chemical Co. Ltd., Japón.
- Compritol® 888 ATO (USP NF: behenato de glicerilo), lote 125839, Gattefossé, Francia.
- Polyplasdone® XL (Crospovidona NF), lote S70109, ISP Technologies.
- Polivinil pirrolidona (PVP) K30, lote 05500128586, ISP Technologies.
- Kollidon® CL (crospovidone Ph. Eur. Type A, USP/NF, JPE), lote 26877188QO, Basf, Germany.
- Aerosil® 200 (dióxido de sílice coloidal), Pharma Degussa, Alemania.
- Precirol® ATO 5 (gliceril diestearato, tipo I, USP/NF), lote 102368, Gattefossé, Francia.
- Almidón de maíz.
- Swelstar® FD-1 (almidón pregelatinizado), lote 9031, Asahi Kasei Chemicals Corporation, Tokyo, Japón.
- Etanol 96° (alcohol etílico), lote 1170, Alcoholes Aroca, S.I., España.

2.2.2.1. Primera fórmula de comprimidos

(Fórmula cualitativa y cuantitativa)

Como formulación de partida preparamos la siguiente:

| | |
|-------------------------------------------------------|--------|
| AHCC-FD..... | 1 g |
| Neusilin® UFL-2 (Antiapelmazante)..... | 305 mg |
| Compritol® 888 ATO (6%) (Lubrificante)..... | 90 mg |
| de los cuáles 60 mg (= 4% intra) y 30 mg (= 2% inter) | |
| Polyplasdone® XL (4%) (Disgregante)..... | 60 mg |
| de los cuáles 30 mg (= 2% intra) y 30 mg (= 2% inter) | |
| PVP K30 (3%) (aglutinante)..... | 45 mg |
| Peso por comprimido: 1,5 g | |

- **Procedimiento de fabricación de comprimidos (primera fórmula)**

Pesamos exactamente cantidades para elaborar 20 comprimidos. Tamizamos el AHCC-FD y los excipientes por tamiz de 0,7 mm. Se mezcló homogéneamente el AHCC-FD con el Neusilin® y el 2% de Polyplasdone® XL (30 mg). La PVP K30 se dispersó en 10 ml de etanol y sobre esta disolución se añadió poco a poco el 4% de Compritol® (60 mg), se incorporó más etanol a la disolución formada hasta solubilizar todo el Compritol® (volumen final de 30 ml). Después, se empezó a granular la mezcla formada por el AHCC-FD, Neusilin® y Polyplasdone® XL incorporando poco a poco sobre esta mezcla la disolución de etanol conteniendo el agente aglutinante y el agente lubricante. Cuando el granulado está listo se pasa por un tamiz de 1,5 mm. Inmediatamente se dejó secar a temperatura ambiente durante 35 minutos para evaporar todo el solvente, antes de llevarlo a secar 1 hora en la estufa a 45°C. Cuando el granulado está seco se tamizó nuevamente por 1,5 mm., el granulado obtenido es homogéneo y se procedió a mezclarlo unos 15 minutos con el 2% de Polyplasdone® XL (30 mg) y el 2% de Compritol® (30 mg). Esta mezcla final es la que se utilizó para comprimir.

Los comprimidos obtenidos son oblongos, ranurados, biconvexos de 22 mm de diámetro mayor y 11 mm de diámetro menor, tienen buen aspecto, brillo y no sueltan polvo pero tardan más de 20 minutos en disgregarse, a pesar de disminuir la dureza siguen teniendo un tiempo de disgregación mayor de 20 minutos. Intentamos aumentar el porcentaje de disgregante pero no mejoramos el ensayo de disgregación de los comprimidos y decidimos modificar la fórmula preliminar. Reducimos el peso final del comprimido a 1,350 g, reemplazamos el Polyplasdone® XL por el Kollidon® CL aumentando su porcentaje en la fórmula y quitando el aglutinante PVP K30.

2.2.2.2. Segunda fórmula

(Fórmula cualitativa y cuantitativa)

| | |
|-------------------------------------------------------------|--------|
| AHCC-FD..... | 1 g |
| Neusilin® UFL-2. (Antiapelmazante)..... | 168 mg |
| Compritol® 888 ATO (4%) (Lubrificante)..... | 52 mg |
| de los cuáles 26 mg (= 2% intra) y otros 26 mg (= 2% inter) | |
| Kollidon® CL (10%) (Disgregante)..... | 130 mg |
| de los cuáles 65 mg (= 5% intra) y otros 65 mg (= 5% inter) | |
| Peso por comprimido: 1,350 g | |

- **Procedimiento de fabricación de comprimidos según fórmula modificada**

Procedimos a elaborar comprimidos masticables a través de la fórmula modificada, para lo cuál pesamos exactamente cantidades para 40 comprimidos, tamizamos el AHCC-FD y los excipientes empleando el tamiz de 0,7 mm., mezclamos homogéneamente el AHCC-FD con el Neusilin® y una parte del disgregante (5%). El lubricante (2%) se solubilizó en 15 ml de etanol, esta disolución se incorporó poco a poco sobre la mezcla antes mencionada y se procedió a granular. El granulado se pasó por tamiz de 1,5 mm., luego se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos con la finalidad de evaporar todo el etanol y posteriormente se llevó a secar en una estufa a una temperatura de 45°C por 1 hora. Transcurrido este periodo de tiempo, el granulado se retira de la estufa y se vuelve a tamizar empleando el tamiz de 1,5 mm. El granulado resultante se procedió a mezclarlo homogéneamente con el 5% de disgregante y con el 2% de lubricante restante que se añade a la mezcla antes de comprimir. Se mezcló homogéneamente durante 15 minutos antes de comprimir. Al comprimir esta mezcla el punzón no se pega, es fácil de comprimir y no desprende polvo. Los comprimidos elaborados presentan buen aspecto, son oblongos, ranurados, biconvexos de 22 mm de diámetro mayor y 11 mm de diámetro menor, tienen brillo, son de color pardo, al masticarlos tienen un sabor a café. Las especificaciones de peso, dureza, diámetro, longitud, altura y espesor son óptimas. Además cumplen con el ensayo de

disgregación. La figura 16, muestra los comprimidos elaborados según la segunda fórmula.

Al desarrollar la fórmula para comprimidos de AHCC, utilizamos excipientes aprobados solo en Europa, pero con el objetivo de adaptar la fórmula a Japón y EE.UU., hicimos una modificación de la fórmula anterior, sustituyendo algunos excipientes por otros equivalentes pero debidamente aprobados en Japón, EE.UU., y Europa. Decidimos elaborar comprimidos más pequeños, de peso final (0,9 g), conteniendo 0,6 g de AHCC-FD y con excipientes aprobados en las tres regiones.



Figura 16. Comprimidos conteniendo 1 g de AHCC.

2.2.2.3. Tercera fórmula

(Fórmula cualitativa y cuantitativa)

| | |
|-------------------------------------------------------------|--------|
| AHCC-FD..... | 0,6 g |
| Aerosil® 200 (2%) (Fluidificante)..... | 18 mg |
| Precirol ATO® (4%) (Lubrificante)..... | 36 mg |
| de los cuáles 18 mg (= 2% intra) y otros 18 mg (= 2% inter) | |
| Almidón de maíz (Diluyente)..... | 210 mg |

Swelstar® FD-1 (4%) (disgregante).....36 mg

de los cuáles 18 mg (= 2% intra) y otros 18 mg (= 2% inter)

Peso por comprimido: 0,900 g

- **Procedimiento de fabricación de comprimidos (tercera fórmula)**

Se pesó exactamente las cantidades para elaborar 20 comprimidos masticables. Previa tamización de todos los componentes, se mezcló homogéneamente el AHCC-FD con el Aerosil® 200, el 2% del Swelstar® (usado en la etapa granular) y el almidón durante 15 minutos. Procedimos a granular en un mortero la mezcla anterior, incorporando poco a poco la disolución de etanol con Precirol® ATO (volumen de etanol de 7 ml), el Precirol® proporciona propiedades antifricción, antiadherentes y deslizantes (lubrificante), se tamiza por tamiz de 1,5 mm, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos para evaporar el solvente y luego se llevó a secar en una estufa a 45°C por 1 hora. Cuando el granulado está seco, se retira de la estufa y se vuelve a tamizar por tamiz de 1,5 mm y finalmente se mezcla homogéneamente durante 15 minutos con la parte restante del disgregante (Swelstar®) y con el 2% del lubricante. La mezcla resultante es la que se utiliza para comprimir.

Los comprimidos obtenidos presentan un aspecto agradable, son oblongos, biconvexos de 18 mm de diámetro mayor y 10 mm de diámetro menor, de color pardo, similar a los anteriores, disgregan bastante rápido, cumplen con todas las especificaciones. Los comprimidos se almacenan en un frasco de cristal topacio con tapón de plástico rosca para su posterior estudio de estabilidad.

2.2.3. Sobres con AHCC

En la presente tesis doctoral hemos desarrollamos tres formulaciones hidrófilas de sobres conteniendo AHCC (granulado para reconstituir) incluyendo el correspondiente estudio de estabilidad según las directrices ICH.

- **Equipos utilizados**

- Granatario PM34-K, Mettler Toledo
- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de 0,1 mg \pm 0,01, que mide el rango de 1 mg a 101 g.
- Estufa de secado (J. Bonals), Barcelona, España.
- Balanza de infrarojo (desecador IR) Mettler MP 100 y LP16.
- Soporte universal adaptado con un cono metálico (ángulo de reposo: α ; velocidad de flujo: V_f).
- Selladora eléctrica (TISH-305C) Impulse Sealer, COMECTA,S.A.

- **Materiales y reactivos**

- AHCC-FD (Lotes: 84-0818-2; E93-0706-2; E13-0403-2; E14-0214-2; E15-0228-2; E18-0822-1).
- Bovina de aluminio-aluminio.
- Tamices (0,710; 1,500 mm).
- Morteros de porcelana, bandejas de secado (granulados).
- Pearlitol® 200 SD (D-Manitol, USP 23-NF 18), Roquette, Laisa España, S.A.
- Glucidex® 6D, lote 761598, Roquette, Laisa España, S.A.
- Neusilin® UFL-2 (aluminometa silicato magnésico), lote 912025, Fuji Chemical Co. Ltd., Japón.
- Avicel® PH 112 (celulosa microcristalina), Panreac Química S.A., Barcelona, España.
- Sipernat® 160 (dióxido de silicio), Evonik Degussa, Alemania.

- GalenIQ® 721 (Isomalt Ph. Eur., BP, USP 29-NF 24), lote L632, Beneo Palatinit, GmbH, Germany.
- GalenIQ® 800 (Isomalt Ph. Eur., BP, USP 29-NF 24), lote L917, Beneo Palatinit, GmbH, Germany.
- Aerosil® 200 (dióxido de sílice coloidal), Pharma Degussa, Alemania.
- Etanol 96° (alcohol etílico), lote 1170, Alcoholes Aroca, S.I., España.
- Agua potable (obtenida del grifo, para reconstituir las formulaciones).
- Palatinose® (Isomaltulosa), lote L121093700, Beneo Palatinit, GmbH, Germany.

Iniciamos el estudio del desarrollo de una formulación óptima para fabricar sobres de AHCC, a partir de la siguiente fórmula (polvo para reconstituir):

**Sobre de AHCC
(1 dosis)**

- ✓ AHCC-FD® (lote 84-0818-2).....258 mg
- ✓ Sipernat ® 160 (1%).....15 mg
- ✓ GalenIQ® 721 (Diluyente hidrófilo especial).....1227 mg

Peso total del contenido por sobre: 1500 mg

Se pesó exactamente cada uno de los componentes y se mezcló homogéneamente durante 10 minutos en bolsa de plástico. La mezcla final presenta buena fluidez, pero el aspecto de la mezcla no es uniforme debido a la diferencia de tamaño de las partículas de cada componente. Realizamos un pequeño experimento para probar la formulación de los sobres (polvo para reconstituir), incorporamos en un vaso con agua la mezcla equivalente a una dosis de AHCC, se dispersó bien con una ligera agitación, tiene sabor agradable (ligeramente a café).

Con la intención de mejorar la homogeneidad de la mezcla se probaron excipientes con un grado de control de tamaño de partícula más similar al de AHCC-

FD. Por lo tanto, decidimos mejorar la formulación de sobres de AHCC, probando varios excipientes (en diferentes proporciones), realizando mezclas directas, analizando sus características organolépticas (aspecto, sabor, color, textura, disolución en agua) y fluidez de la mezcla. Iniciamos el estudio haciendo 2 mezclas directas previa tamización de sus componentes:

✓ **Primera mezcla (cantidades por sobre):**

AHCC-FD (lote E93-0706-2).....1 g
Manitol (Pearlitol® 200 SD).....1 g
Sypernat® 160 (2%).....200 mg
Neusilin® UFL-2 (5%).....500 mg
Avicel® PH 112.....2,3 g
Peso final de la mezcla: 5 g

Pesamos exactamente cada componente, después procedemos a pasarlos por el tamiz de 0,7 mm y finalmente se mezcló homogéneamente durante 10 minutos esta primera mezcla. El resultado final fue una mezcla homogénea, uniforme, buen aspecto y textura, pero no presentaba buena fluidez y al incorporar la mezcla equivalente a 1 sobre de AHCC en agua, el Avicel® PH 112 precipita, formando una disolución con un precipitado blanco (sedimento de pequeños gránulos blancos). Nos planteamos realizar una segunda mezcla suprimiendo el Avicel® PH 112, que le otorgaba un aspecto no uniforme a la mezcla anterior dispersa en agua.

✓ **Segunda mezcla (cantidades por sobre):**

AHCC-FD (lote E93-0706-2).....1 g
Manitol (Pearlitol® 200 SD)..... 1,150 g
Sypernat® 160 (1%).....100 mg
Neusilin® UFL-2 (2,5%).....250 mg
Peso final de la mezcla: 2,5 g.

Se pesó exactamente cada componente, luego se tamizó por tamiz de 0,7 mm y finalmente se mezcló homogéneamente durante 10 minutos esta segunda mezcla.

El resultado final fue una mezcla homogénea, de buen aspecto y textura, pero no fluye y al incorporar la mezcla equivalente a 1 sobre de AHCC en agua, se obtiene una disolución homogénea, sin precipitado, de color pardo claro y sabor ligeramente a café. Esta segunda mezcla es óptima en cuanto a las características organolépticas pero no presenta la fluidez adecuada, así que decidimos diseñar otras formulaciones y además de realizar mezclas directas, nos planteamos elaborar granulados con las mezclas para mejorar las propiedades de flujo. Planteamos 4 formulaciones (4 mezclas directas) y de cada mezcla elaboramos su correspondiente granulado (4 granulados), en total realizamos 8 fórmulas (4 mezclas y 4 granulados), a los cuáles los denominamos: M₁, M₂, M₃, M₄, G₁, G₂, G₃ y G₄. Con cada formulación elaboramos 40 sobres de AHCC y los envasamos en bolsa de plástico con cierre y en sobres de aluminio sellados herméticamente.

✓ **FORMULACIÓN 1 (Cantidades para 1 sobre):**

Llamaremos M₁: Mezcla directa y G₁: Granulado de M₁

AHCC-FD (lote E93-0706-2).....0,500 g
GalenIQ® 721 (Diluyente hidrófilo especial).....2,500 g
Sypernat® 160.....0,030 g

Peso total del contenido: 3,030 g
Para elaborar el granulado (G₁), gastamos 55-60 ml de etanol (40 sobres).

✓ **FORMULACIÓN 2 (Cantidades para 1 sobre):**

Llamaremos M₂: Mezcla directa y G₂: Granulado de M₂

AHCC-FD (lote E93-0706-2).....0,500 g
Manitol (Pearlitol® 200SD).....0,575 g
Sypernat® 160.....0,050 g
Neusilin® UFL-2.....0,125 g

Peso total del contenido: 1,250 g
Para elaborar el granulado (G₂), gastamos 20-25 ml de etanol (40 sobres).

✓ **FORMULACIÓN 3 (Cantidades para 1 sobre):**

Llamaremos M₃: Mezcla directa y G₃: Granulado de M₃

| | |
|---------------------------------|---------|
| AHCC-FD (lote E93-0706-2)..... | 0,500 g |
| Manitol (Pearlitol® 200SD)..... | 0,575 g |
| Aerosil® 200..... | 0,050 g |
| Neusilin® UFL-2..... | 0,125 g |

Peso total del contenido: 1,250 g

Para elaborar el granulado (G₃), gastamos 20-25 ml de etanol (40 sobres).

✓ **FORMULACIÓN 4 (Cantidades para 1 sobre):**

Llamaremos M₄: Mezcla directa y G₄: Granulado de M₄

| | |
|---------------------------------|---------|
| AHCC-FD (lote E93-0706-2)..... | 0,500 g |
| Manitol (Pearlitol® 200SD)..... | 0,575 g |
| Sypernat® 160..... | 0,050 g |
| Neusilin® UFL-2..... | 0,125 g |
| Glucidex® 6D..... | 1,0 g |

Peso total del contenido: 2,250 g

Para elaborar el granulado (G₄), gastamos 28-30 ml de etanol (40 sobres).

Para obtener las 8 fórmulas, primero elaboramos las mezclas directas (sin granular) por duplicado de cada formulación. Para la formulación 1, se pesó exactamente por duplicado los componentes para preparar 40 sobres de AHCC, luego se tamizó por tamiz de 0,7 mm. Después se procedió a mezclarlos homogéneamente durante 10 minutos en bolsa de plástico. Obtuvimos 2 mezclas, de las cuáles una granulamos (G₁), se realizó el mismo procedimiento para las formulaciones restantes. A las mezclas resultantes (M₁, M₂, M₃, M₄), se les realizó el

análisis organoléptico (aspecto, textura, color, olor, solubilidad en agua), ángulo de reposo, velocidad de flujo, pérdida de masa por desecación.

Las granulaciones con etanol de 96°, se prepararon en un mortero, en el cuál se añadió la mezcla directa correspondiente y se granuló incorporando poco a poco el etanol hasta su punto final, el granulado obtenido se pasó por un tamiz de 1,5 mm, se dejó secar a temperatura ambiente sobre un papel filtro colocado en una bandeja de secado por 30 minutos para evaporar el solvente (etanol), luego lo llevamos a la estufa de secado durante 1 hora a 50°C. Finalmente el granulado seco lo volvemos a pasar por tamiz de 1,5 mm. A los granulados obtenidos (G₁, G₂, G₃ y G₄), también se les realizó el análisis organoléptico correspondiente, α , V_f, análisis de granulometría utilizando tamizadora manual, realizando movimientos en vaivén durante 10 minutos de cada granulado (el resultado lo expresamos en % retenido) y pérdida de masa por desecación. Con los granulados elaborados obtuvimos mejores propiedades de flujo, decidimos realizar un pequeño estudio de estabilidad comparando las 8 formulaciones elaboradas (M₁, M₂, M₃, M₄, G₁, G₂, G₃ y G₄), en sus respectivos envases primarios (bolsa de plástico con cierre o sobre de aluminio sellado herméticamente).

2.2.3.1. Primeros estudios de estabilidad de las formulaciones de sobres

Diseñamos un primer estudio de estabilidad de las 8 formulaciones para sobres de AHCC elaboradas en el apartado anterior. Las muestras se mantienen a una temperatura de 30°C ± 2°C empleando dos humedades relativas diferentes de 75% ± 5% y de 96% ± 5%. El tiempo de almacenamiento es de 4 semanas.

- **Equipos utilizados**

- Estufa a 30°C ± 2°C.
- Balanza de infrarojo (desecador IR), Mettler MP 100 y LP16.

- **Materiales y reactivos**

- Solución saturada de NaCl (HR de 75% ± 5%): preparada en un desecador a partir de NaCl, Panreac Química, España, a saturación en agua desionizada de Millipore Elix 3.
- Solución saturada de KH₂PO₄ (HR de 96% ± 5%): preparada en un desecador a partir de KH₂PO₄, Panreac Química, España, a saturación en agua desionizada de Millipore Elix 3.

Muestras

(Mezclas)

(Granulados):

M₁ →3,030 g

G1→3,030 g

M₂ →1,250 g

G2→1,250 g

M₃ →1,250 g

G3→1,250 g

M₄ →2,250 g

G4→2,250 g

- **Tiempo de muestreo**

Se analizaron las muestras en los siguientes días de almacenamiento: 0, 2, 7, 14 y 30, para ambas humedades relativas.

- **En el estudio de estabilidad analizamos:**

- ✓ **Aspecto.** Por observación visual del contenido en el envase primario (si ha captado humedad).
- ✓ **Contenido de humedad en porcentaje.** La humedad del AHCC contenido en las formulaciones para sobres, es evaluada por la pérdida de masa por desecación a través de una balanza de IR a una temperatura de 105°C durante 120 segundos (el análisis se realizó por triplicado).
- ✓ **Ensayo de solubilidad.** Vertimos el contenido del sobre en un vaso de precipitado conteniendo aproximadamente 150 ml de agua y observamos si hay cambios en la coloración, si se forma un precipitado, si hay residuo,

formación de espuma, estableciendo una comparación con el ensayo inicial de las formulaciones (día=0).

2.2.3.2. Efecto del tipo de diluyente y de la dosis de AHCC-FD en sobres

Al desarrollar las anteriores formulaciones para sobres de AHCC comprobamos que los granulados aportaban mejores propiedades de flujo. Decidimos optimizar la formulación 1, en cuya fórmula destaca el diluyente hidrófilo especial (Ph. Eur., USP 29-NF 24).

Con la finalidad de optimizar la formulación 1, nos planteamos comparar dos tipos del diluyente hidrófilo especial (A y B que corresponden a los tipos de Isomalt GalenIQ® 721 e Isomalt GalenIQ® 800), y sustituir el Sypernat® 160 por el Aerosil® 200 (agente granulante). El diluyente hidrófilo especial A, es un aglomerado de partículas, ideal para realizar mezclas de compresión directa, con alta solubilidad en agua, en comparación con el diluyente hidrófilo especial B que presenta finos y pequeños gránulos (partículas de tamaño 10 veces menor que el tipo A), ideal para granulación húmeda, soluble en agua y además presenta menos porcentaje de agua que el tipo A, una propiedad importante debido al alto poder de higroscopicidad del AHCC. En primer lugar, elaboramos una mezcla directa empleando el diluyente hidrófilo especial tipo A, a través de la siguiente fórmula optimizada:

Cantidades para 1 sobre de AHCC:

| | | |
|---|--------------------------------|---------|
| } | AHCC-FD (lote E13-0403-2)..... | 0,600 g |
| | Diluyente especial A..... | 2,500 g |
| | Aerosil® 200..... | 0,030 g |

Peso del contenido: 3,130 g

Se pesó exactamente cantidades para 20 sobres, luego se tamizó el AHCC y los excipientes por tamiz de 0,7 mm., y se procedió a mezclar homogéneamente los componentes durante 10 minutos. La mezcla resultante no es totalmente homogénea, debido a que diluyente hidrófilo especial tipo A presenta partículas con

una distribución de tamaño mayor que el AHCC-FD, el aspecto es regular, la mezcla tiene buenas propiedades de flujo. A continuación, debido al resultado obtenido decidimos realizar un granulado utilizando el diluyente hidrófilo especial tipo B (isomalt GalenIQ® 800). La figura 17 muestra el aspecto de la mezcla con el diluyente tipo A.



Figura 17. Mezcla obtenida utilizando el diluyente hidrófilo especial tipo A.

Utilizando la misma fórmula optimizada, manteniendo las cantidades de los componentes, pero cambiando el tipo de diluyente hidrófilo, elaboramos un granulado para sobres de AHCC. En la figura 19, se muestra el granulado obtenido.



Figura 18. Granulado elaborado con el diluyente hidrófilo tipo B.

Para elaborar el granulado que observamos en la figura 19, se pesó exactamente cantidades para hacer 20 sobres de AHCC, previa tamización por tamiz de 0,7 mm, del diluyente y fluidificante, se mezclaron homogéneamente estos componentes con el AHCC-FD (polvo liofilizado) en bolsa de plástico durante 15 minutos. La mezcla obtenida de aspecto uniforme y color marrón claro, se vertió en un mortero de porcelana y se granuló con etanol de 96°, cuando el granulado había tomado la consistencia adecuada (gastando 35 ml de solvente), se hizo pasar el granulado a través de un tamiz de 1,5 mm. El granulado se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos para evaporar el solvente y luego se llevó a secarlo en una estufa por 1 hora a temperatura de 45°C. Cuando terminó de secarse el granulado se tamizó nuevamente por tamiz de 1,5 mm. Conseguimos elaborar un granulado óptimo conteniendo AHCC a través de una formulación optimizada diseñada para sobres de AHCC (granulado para reconstituir en agua). Este granulado para sobres de AHCC presenta aspecto uniforme, homogéneo, compuesto de pequeños gránulos de tamaño similar, gránulos bien formados sin polvo, de color marrón claro, con sabor ligeramente a café, de fácil disolución en agua con una ligera agitación.

A partir de la fórmula que optimizamos para elaborar un granulado para sobres de AHCC, nos planteamos hacer granulados con tres dosis distintas de AHCC.

Por lo tanto, diseñamos tres fórmulas definitivas para fabricar sobres de AHCC:

- Dosis 0,6 g

| | |
|---------------------------------|---------|
| AHCC-FD® (lote E13-0403-2)..... | 0,600 g |
| GalenIQ® 800..... | 2,500 g |
| Aerosil® 200..... | 0,030 g |

Peso del contenido: 3,130 g

- Dosis 0,9 g

| | |
|---------------------------------|---------|
| AHCC-FD® (lote E13-0403-2)..... | 0,900 g |
| GalenIQ® 800..... | 2,500 g |
| Aerosil® 200..... | 0,030 g |

Peso del contenido: 3,430 g

- Dosis 1,8 g

| | |
|---------------------------------|---------|
| AHCC-FD® (lote E13-0403-2)..... | 1,800 g |
| GalenIQ® 800..... | 2,500 g |
| Aerosil® 200..... | 0,030 g |

Peso del contenido: 4,330 g

Con estas fórmulas fabricamos tres lotes a escala piloto (200 sobres por cada dosis de AHCC). Para cada lote elaboramos su correspondiente protocolo de producción, además de realizar controles durante el proceso de fabricación.

Asimismo, a cada lote piloto de sobres (conteniendo una dosis de AHCC), se le realizó el análisis de los siguientes parámetros:

- ✓ Aspecto (homogeneidad, color, sabor, disolución en agua).
- ✓ Capacidad de flujo (V_f , α , por triplicado).
- ✓ La pérdida de peso por desecación (por triplicado).
- ✓ Tamaño de partículas por granulometría.
- ✓ Uniformidad de masa (30 sobres, según Ph. Eur., 6.0., 2008).
- ✓ Prueba de cierre (en su envase definitivo, según Ph. Eur., 6.0., 2008).

2.2.3.3. Elaboración de tres lotes de sobres de AHCC a escala piloto

A continuación se describe el procedimiento utilizado en la elaboración de los tres lotes a escala piloto de sobres conteniendo granulados con diferentes dosis de AHCC, esquematizado a través de un diagrama de flujo en la figura 19.

En primer lugar se pesan exactamente los componentes de cada fórmula, cantidades para preparar un lote de 200 sobres de AHCC con cada formulación. Después se tamiza el diluyente GalenIQ® 800 a través de un tamiz de 0,7 mm en un mezclador planetario (o equipo similar por ejemplo: mezclador sigma) se mezcló el AHCC-FD con el diluyente y fluidificante durante 15 minutos empleando una velocidad media en el mezclador, el aspecto de la mezcla (polvo) tiene que ser uniforme y de color marrón. Seguidamente se procedió a humectar la mezcla anterior, incorporando etanol 96° poco a poco en el mezclador planetario, la cantidad de etanol que se incorpora a la mezcla es un punto crítico en la granulación, si adicionamos poca cantidad de solvente los gránulos no tienen la consistencia adecuada, se romperán con gran facilidad y si adicionamos demasiado etanol a la mezcla, se formará una masa muy húmeda que al pasarla a través de un tamiz en lugar de obtener gránulos se obtendrá una masa de consistencia similar a la de un fideo. Por lo tanto, al incorporar el etanol poco a poco se va humectando la mezcla hasta que tome la consistencia adecuada. La cantidad de etanol 96° depende del tamaño del lote, el recipiente y la velocidad de humectación. A continuación, la masa semisólida se obliga a pasar a través de un tamiz de 1,5 mm obteniéndose los gránulos. El granulado obtenido se dejó secar a temperatura ambiente 45 minutos para evaporar el solvente y luego se secó en una estufa 45°C durante 1 hora. El granulado ya seco, es retirado de la estufa y nuevamente se hace

pasar por un tamiz de 1,5 mm con la finalidad de romper los aglomerados formados. El aspecto del granulado obtenido es homogéneo, de color marrón, con buenas propiedades de flujo. El granulado obtenido se almacenó en un recipiente cerrado para evitar la absorción de humedad (agua) de la atmósfera, finalmente se dosificó y envasó por volumen en sobres de aluminio herméticamente sellados con calor. Para elaborar estos granulados se necesitan ambientes diseñados para trabajar con solventes, utilizar vestimenta apropiada, usar mascarillas, gorro y guantes. En la elaboración de los granulados seguimos las normas de buenas prácticas de fabricación. Las cantidades de etanol utilizados en la elaboración de los distintos lotes han sido 350 ml para la dosis de 0,6 g de AHCC-FD; 390 ml para la dosis de 0,9 g de AHCC-FD y de 490 ml para la dosis de 1,8 g de AHCC-FD.

Las figuras 20 y 21, muestran los granulados conteniendo 3 dosis diferentes de AHCC-FD, y los sobres elaborados de AHCC (dosis de 0,6 g; 0,9 g y 1,8 g de AHCC-FD), respectivamente. Cada sobre de AHCC, contiene un granulado para reconstituir en agua, los granulados presentan diferente color, variando la intensidad del color marrón en función del contenido de AHCC-FD. El granulado con mayor cantidad de AHCC-FD (dosis de 1,8 g) es el más oscuro, seguido de la dosis de 0,9 g AHCC- FD y finalmente el granulado conteniendo 1,6 g de AHCC-FD.

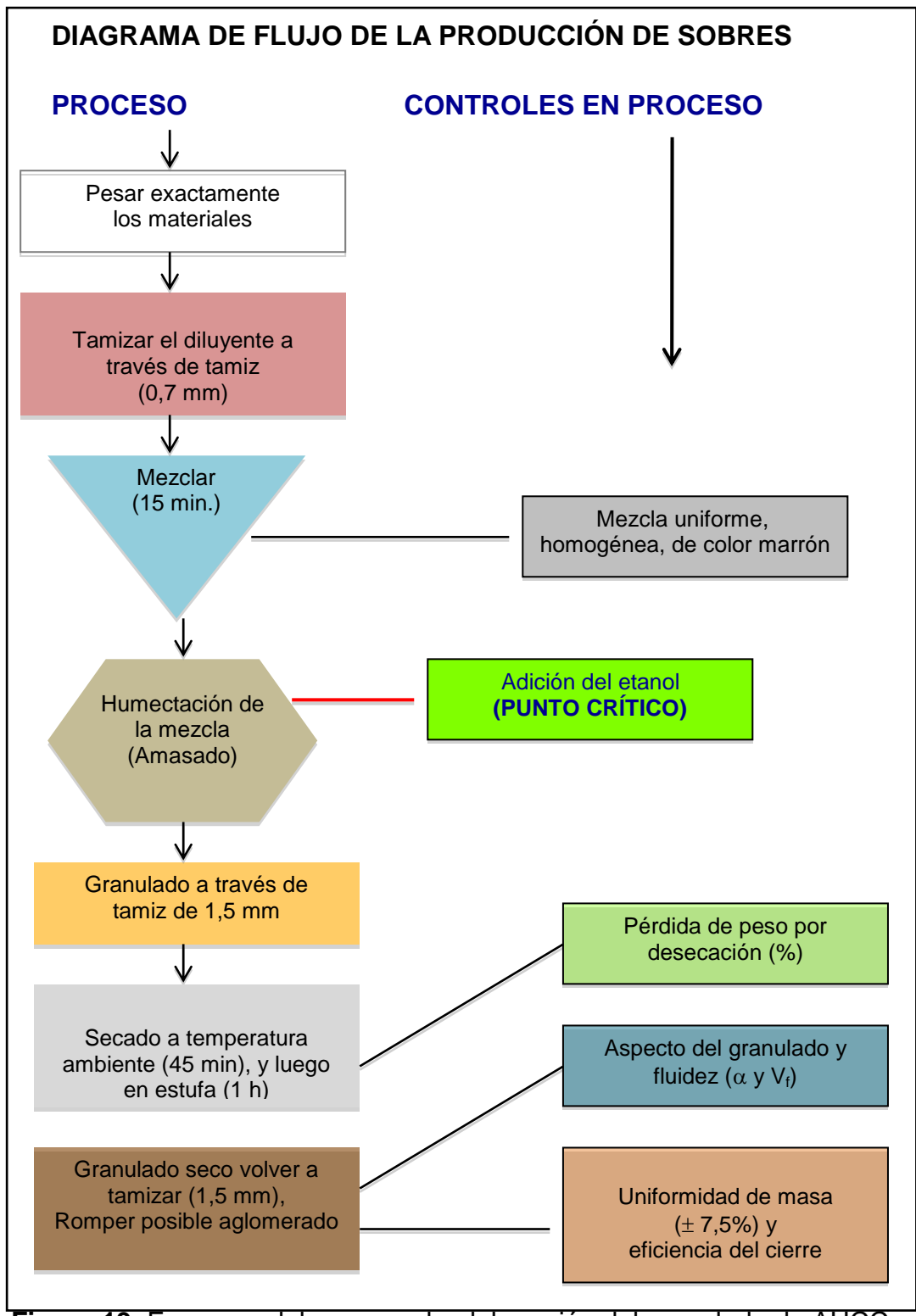


Figura 19. Esquema del proceso de elaboración del granulado de AHCC.



Figura 20. Granulados de AHCC en los que se observa diferente color dependiendo de la dosis de AHCC-FD.



Figura 21. Sobres con AHCC elaborados, dosificados y envasados en aluminio-aluminio herméticamente sellados con calor.

2.2.3.4. Efecto del diluyente en la estabilidad de AHCC-FD

Realizamos un estudio comparativo entre el diluyente hidrófilo tipo B (GalenIQ® 800) e isomaltulosa (Palatinose®). La finalidad del estudio es comprobar si isomaltulosa puede ser una alternativa al diluyente hidrófilo tipo B en la elaboración de sobres con AHCC.

Se elabora un lote de 20 sobres de AHCC (dosis de 0,6 g de AHCC-FD), utilizando isomaltulosa, siguiendo el esquema de la figura 19. Previamente se pulverizan los cristales de isomaltulosa en un mortero de porcelana para uniformizar el tamaño de sus partículas y después proseguir con la elaboración del granulado. La tabla 5, muestra las características entre ambos granulados, empleando el diluyente hidrófilo tipo B o isomaltulosa.

Tabla 5. Principales diferencias entre un granulado elaborado con el diluyente GalenIQ® 800 o isomaltulosa.

| Características de los granulados | Granulado utilizando GalenIQ® 800 | Granulado utilizando isomaltulosa (Palatinose®) |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aspecto | Buen aspecto, textura. | Buen aspecto, menos polvo fino. |
| Color | Marrón claro. | Marrón oscuro. |
| Fluidez | Buena fluidez. | Buena fluidez. |
| Sabor | Ligeramente a café. | Dulce y ligeramente a café. |
| Disolución en agua | En contacto con el agua cae al fondo, se solubilizó mediante una ligera agitación, libera burbujas, forma espuma en su superficie, no dejó residuo. | En contacto con el agua cae al fondo, se solubilizó mediante un par de agitaciones, no dejó residuo, tampoco generó burbujas, ni forma espuma. |

Posteriormente, elaboramos 1 lote de granulado (dosis de 0,6 g de AHCC-FD), con isomaltulosa (cantidades para 100 sobres de AHCC), siguiendo el mismo procedimiento de fabricación que los sobres de AHCC conteniendo el diluyente GalenIQ® 800.

El granulado obtenido tiene buen aspecto y fluidez, de sabor muy dulce y ligeramente a café. A continuación se realiza un estudio de estabilidad acelerado para evaluar el efecto de isomaltulosa en lugar del diluyente GalenIQ® 800.

- **Estudio comparativo del efecto de isomalt o isomaltulosa en la estabilidad de formulaciones para sobres con una dosis de 0,6 g de AHCC-FD**

Se colocan ambos granulados en placas petri sin ningún envase primario (figuras 22 y 23) a 30°C y en desecador con humedad relativa del 75%. Se analizan las muestras en condiciones iniciales (T=0) y a los siguientes tiempos de almacenamiento: 1, 3, 4, 6, 10, 17 y 30 días.



Figura 22. Granulado con isomaltulosa, dispuesto en placa petri antes de iniciar el estudio de estabilidad acelerado.

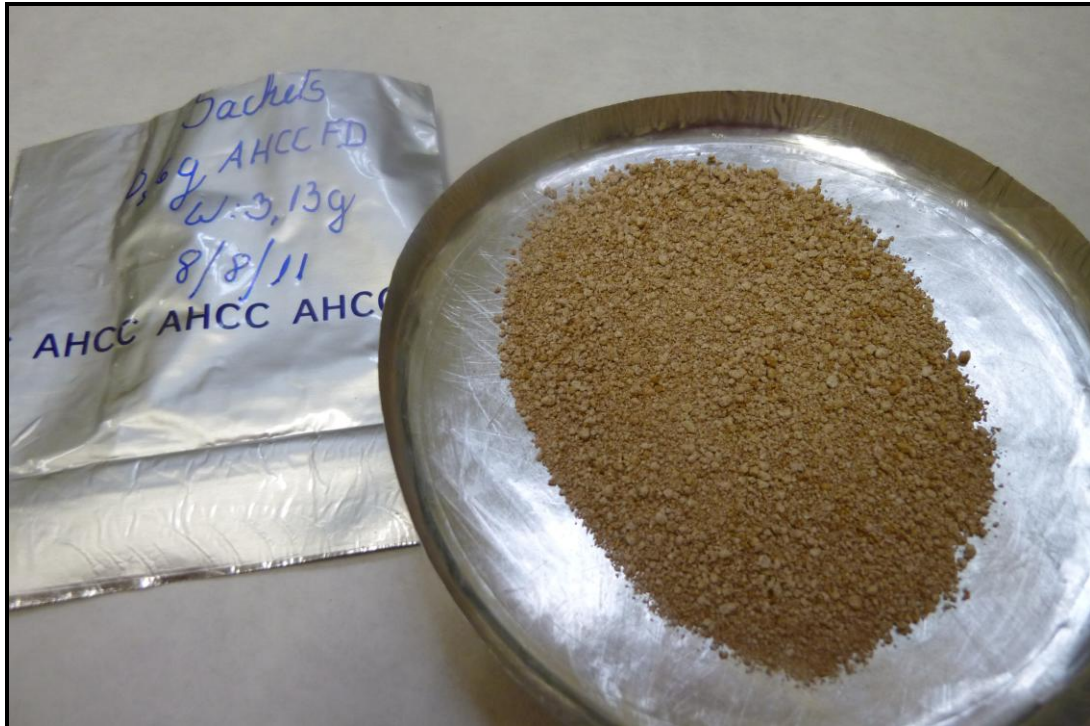


Figura 23. Granulado con diluyente hidrófilo tipo B, antes de iniciar el estudio de estabilidad acelerado.

A continuación, se muestra ambos granulados conteniendo AHCC (dosis de 0,6 g de AHCC-FD), figura 24. Además en dicha figura se puede observar el cambio de coloración del granulado, siendo el granulado más oscuro el elaborado con isomaltulosa, ambos contienen la misma cantidad de AHCC-FD en la formulación.

Los resultados obtenidos con ambos compuestos, nos permiten comprobar la gran estabilidad que aporta el Isomalt en la formulación en comparación con la Isomaltulosa y el gran poder antiapelmazante del isomalt en condiciones de elevada humedad. Ambos granulados captan humedad, pero resiste mejor la formulación elaborada con isomalt.



Figura 24. Granulados conteniendo AHCC-FD, uno elaborado con isomaltulosa (más oscuro) y el otro elaborado con isomalt (más claro).

2.2.3.5. Estudio de estabilidad de los sobres a escala piloto elaborados con diferentes dosis de AHCC-FD

Diseñamos un estudio de estabilidad de los sobres elaborados según las directrices ICH Q1A (R2).

- **Protocolo de estabilidad para sobres de AHCC**

- **Características de las muestras:** en el estudio de estabilidad utilizamos muestras de sobres elaborados con diferentes dosis a escala piloto, conservados a temperatura ambiente (20°C) en el laboratorio. Estos sobres fueron elaborados e inmediatamente envasados por volumen en cierres de aluminio sellados herméticamente al calor.
- **Condiciones de almacenamiento:** se realizó un estudio en condiciones aceleradas y a largo plazo.

- **Estudio a largo plazo:** $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$., y HR de $96\% \pm 5\%$. Generamos esta HR, a partir de solución saturada de KH_2PO_4 , preparada en un desecador y luego colocamos los sobres en posición vertical dentro del desecador y lo conservamos en una estufa a la temperatura antes mencionada.
- **Estudio acelerado:** $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$., y HR de $75\% \pm 5\%$. Generamos esta HR, a partir de solución saturada de NaCl , preparada en un desecador y luego colocamos los sobres en posición vertical dentro del desecador y lo conservamos en una estufa a la temperatura antes mencionada.

- **Tiempo de muestreo:**

Estudio a largo plazo: 0, 6 semanas, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 24 meses y 36 meses. De cada lote se tomó sobres de 3 puntos distintos.

Estudio acelerado: 0, 6 semanas, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 24 meses y 36 meses. Decidimos ampliar el estudio más tiempo para poder evaluar nuestra formulación en condiciones extremas.

- **Propiedades a evaluar de los sobres:**

- ✓ **Aspecto.** Observación visual del contenido, presencia de aglomerados, apelmazamiento, cambio en la coloración del granulado, sabor, olor.
- ✓ **Pérdida de masa por desecación.** Utilizando una balanza de IR (105°C , 120 segundos), se evalúa por triplicado.
- ✓ **Disolución.** Dispersamos el contenido de un sobre en 100 ml de agua de grifo y evaluamos la coloración de la disolución, el sabor.
- ✓ **Degradación química por HPLC.** Estudiamos la posible degradación química de la formulación por la presencia de agua captada de las condiciones del estudio, a través de un método en condiciones isocráticas por HPLC que desarrollamos.

A continuación las figuras 25 y 26, muestran respectivamente, los sobres de AHCC utilizados en el estudio de estabilidad (retirados del desecador para su análisis) y la siguiente imagen es el contenido de los mismos que se procedió a analizar siguiendo el protocolo antes mencionado.

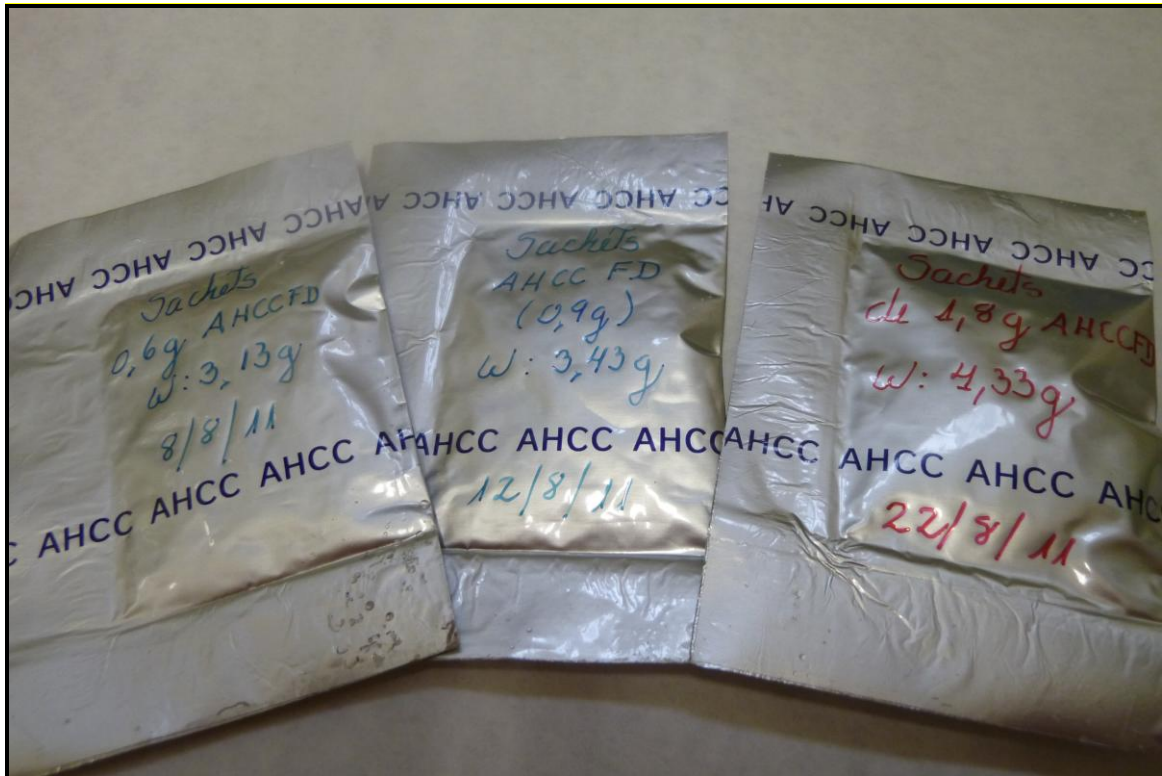


Figura 25. Sobres conteniendo diferentes dosis de AHCC-FD retirados de sus respectivos desecadores para su posterior análisis.



Figura 26. Contenido de los sobres de AHCC-FD (figura 26), que utilizamos para realizar su correspondiente análisis, siguiendo el protocolo antes mencionado.

2.2.3.6. Desarrollo de un método de análisis por HPLC para estudiar G₁

El AHCC contiene un glucósido soluble (G₁) formando parte de su estructura, un componente lábil, que nos sirvió como indicador de estrés en la formulación. Desarrollamos un método de análisis en condiciones isocráticas para analizar cuantitativamente el G₁.

- **Equipos utilizados**

- Cromatógrafo líquido modular (Jasco, Japón).
- Bomba de vacío, modelo Büchi Vac® V-500 (Büchi, Suiza).
- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de 0,1 mg ± 0,01, que mide el rango de 1 mg a 101 g.
- Agitador magnético-calefactor RCT Basic IKA. Labor Technik, Alemania.
- Baño de ultrasonido ULTRASON-H, Selecta.

- **Materiales y reactivos**

- Mortero de porcelana.
- Micropipetas Eppendorf® calibradas, volúmenes de (0,1 - 1 ml) y de (0,5 - 5 ml), Eppendorf, Hamburgo, Alemania.
- AHCC-FD (lote E15-0228-2).
- Sobres de los 3 lotes pilotos de AHCC en estabilidad (sometidos a las condiciones de estrés del estudio).
- Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Acetonitrilo (ACN), HPLC-gradiente-UV-IR, Merck, Alemania.
- Agua desionizada de Millipore Elix 3.
- Jeringuillas de 5 ml.
- Filtro para fase móvil: filtro de nitrocelulosa (\varnothing 47 mm., con diámetro de poro 0,45 μm), Millipore® Merck, Alemania.
- Filtro para muestra: filtros de GHP Acrodisc (GF/0,45 μm ., 25 mm., Pall®), Washington, USA.

- **Método Isocrático por HPLC para la determinación cuantitativa de G_1**

Desarrollamos y validamos un método isocrático para determinar la fracción G_1 presente en el AHCC-FD que contiene los sobres elaborados de AHCC. La figura 27, muestra la fórmula química de la fracción G_1 .

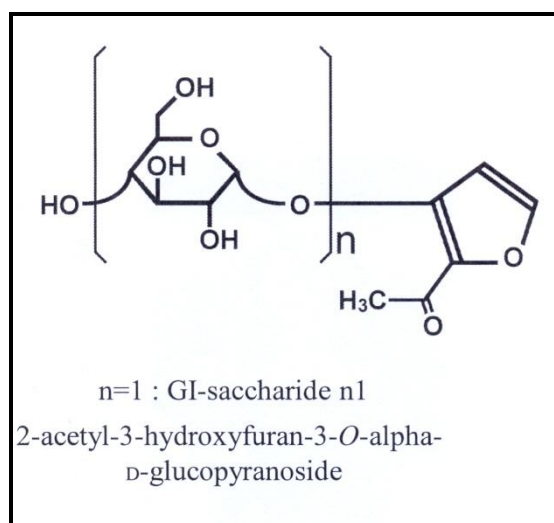


Figura 27. Estructura química de G_1 .

El método analítico se ha llevado a cabo en un equipo de cromatografía líquida, que consta de los siguientes módulos:

- Desgasificador: DG-2080-53 3-line, Degasser (Jasco, Japón).
- Mezclador: LG 2080-02, Ternary Gradient Unit (Jasco, Japón).
- Bomba: PU-1580, Intelligent HPLC Pump (Jasco, Japón).
- Inyector automático: 231 XL (Gilson, USA).
- Detector: UV-1575, Intelligent UV/VIS (Jasco, Japón).
- Ordenador interfase y programa de integración de datos, modelo Borwin 1,5 (JMBS Developments, Francia).

Las características de este método analítico isocrático para llevar a cabo la cuantificación de G₁ son las siguientes:

- **Longitud de onda de análisis:** 275 nm.
- **Fase estacionaria:** C18 Zorbax® SB-C18, 5 µm 250 x 4,6 mm (Agilent).
- **Volumen de inyección:** 100 µm.
- **Flujo:** 1 ml/min.
- **Temperatura:** ambiente.
- **Fase móvil:** es una mezcla de acetonitrilo: tampón (5:95, v / v). Tampón de NaH₂PO₄ (0,01 M) se usó para proporcionar un pH de 4,9. Esta fase móvil se filtró utilizando filtros de membrana de 0,45 µm en un equipo de filtración con bomba de vacío (Büchi Vac® V-500).
- **Tiempo de cromatograma:** 10 minutos.
- **Preparación de la disolución patrón:** se pesó exactamente 500 mg de AHCC-FD en un matraz aforado, se dispersó con agua desionizada y se llevó a un baño de ultrasonidos durante 30 segundos. Luego se enrasó con el mismo diluyente. De esta disolución con la ayuda de una pipeta automática se tomó una alícuota de 1 ml y se llevó a un matraz de 10 ml y se enrasó con agua desionizada. Concentración final: 0,5 mg/ml. Se filtró y analizó.
- **Preparación de la disolución problema:** el contenido de un sobre, se pesa y luego se vierte en un mortero y se tritura. Esta mezcla se lleva a

un matraz de 100 ml, se dispersa con agua desionizada, asimismo lo que pudiera quedar en el mortero se arrastra también con el mismo diluyente. Luego se lleva el matraz a un baño de ultrasonidos durante 30 segundos. Después se termina de enrasar con agua desionizada, de esta disolución se toma una alícuota (en función de la dosis de AHCC-FD que contiene el sobre), se llevó a un matraz de 50 ml y finalmente se enrasa con agua desionizada. Concentración final: 0,5 mg/ml. Se filtró y analizó. Cada muestra problema se preparó por triplicado, sobres conteniendo 3 dosis (0,6 g; 0,9 g y 1,8 g de AHCC-FD), en total 9 muestras problema.

- **Validación del método**

En la validación del método se estudiaron los siguientes parámetros:

Selectividad: Diferentes muestras de la formulación se ensayaron para comprobar si cualquier componente de la formulación interfiere con el pico correspondiente a la fracción G₁.

Linealidad y reproducibilidad: La linealidad del método se estudió a partir de cuatro muestras individuales distintas preparados a partir de pesadas diferentes. Las muestras siempre se diluyen con agua desionizada y se filtra a través de filtros de 0,45 micras (GHP Acrodisc GF, Pall). Las muestras tienen que ser analizadas en menos de 4 horas después de su disolución. La reproducibilidad Inter-día se estudió mediante la repetición del estudio de la linealidad durante 3 días consecutivos.

Precisión: determinamos la variabilidad del método a través del estudio de la repetibilidad.

✓ **Repetibilidad:** inyectamos 10 veces una misma muestra.

2.2.3.7. Estudio comparativo de estabilidad

En julio y agosto del 2014 y para finalizar la parte de desarrollo de formulaciones se realizó un estudio comparativo de estabilidad de varias de las formulaciones desarrolladas a lo largo de la tesis. El objetivo fue comparar el efecto del tipo de formulación, excipientes y material de envasado en las características de las formulaciones. Las características estudiadas fueron:

- Aspecto y disolución
- pH
- Pérdida de peso
- Contenido de G₁

Se han estudiado tres condiciones de almacenamiento:

- Condiciones ambientales
- Temperatura de 30°C ± 2°C y 75% ± 5% de humedad relativa
- Temperatura de 30°C ± 2°C y 96% ± 5% de humedad relativa

2.3. ESTUDIOS *IN VITRO* DE VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DEL AHCC, EN CELDA DE FLUJO CONTINUO

En el presente trabajo estudiamos el perfil de disolución *in vitro* de las 2 presentaciones del producto (AHCC-FD y AHCC-FG). Siendo, una de ellas el polvo liofilizado considerado la materia prima (AHCC-FD) y la otra la formulación hidrófoba obtenida a partir del polvo liofilizado mezclado con excipiente lipídico. Empleamos la Celda de Flujo Continuo (método IV Farmacopea Europea).

• Equipos utilizados

- Celda de Flujo Continuo (Sotax Dissotest CE₁).
- Espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700, Shimadzu, Japón.

- Agitador magnético-calefactor RCT Basic IKA. Labortecnik, Alemania.
- Balanza analítica digital Mettler Toledo AG104, con una sensibilidad de $0,1 \text{ mg} \pm 0,01$, que mide el rango de 1 mg a 101 g.
- Cronómetro calibrado.

- **Materiales y reactivos**

- Cloruro de potasio (KCl), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Ácido clorhídrico (HCl), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Hidróxido de sodio (NaOH), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Acetato de sodio trihidratado ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), Panreac Química SA., Barcelona, España.
- Agua desionizada de Millipore Elix 3.
- Solución tampón pH 1,2: para preparar este tampón ácido, se mezcló 50 ml de KCl (0,2 M) con 85 ml HCl (0,2 M) en un matraz aforado de 200 ml, y se enrasó con agua desionizada. Se preparó según las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos - Formulario Nacional (USP-NF 33, 2010).
- Solución tampón pH 4,5: para preparar este tampón, 2,99 gramos de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se solubilizaron con aproximadamente unos 300 ml de agua desionizada en un matraz aforado de 1 litro, se adicionó 14 ml de CH_3COOH al matraz y finalmente se enrasó con agua desionizada (según USP-NF 33, 2010).
- Solución tampón pH 6,8: para preparar este tampón casi neutro, en un matraz aforado de 200 ml se mezcló 50 ml de KH_2PO_4 con 22,4 ml de NaOH (0,2 M) y se enrasó con agua desionizada (según USP-NF 33, 2010).

- Filtros de la celda de flujo: filtros de fibra de vidrio GF/D, diámetro 25 mm, Whatman™, lote 1823025 y filtros de nitrocelulosa 0,45 µm HV, lote ROMN 20907, Millipore®.
- Filtros de membrana de polipropileno de 0,45 micras, hidrófilo (Acrodisc Pall ®).
- Jeringas de plástico (volumen de 5 ml).
- Pinza de metal.

2.3.1. Características del ensayo de disolución en Celda de Flujo Continuo

La Celda de Flujo Continuo, se compone de:

- ✓ Un depósito o reservorio (donde se coloca el medio de disolución), en este ensayo utilizamos 3 soluciones tampón con pH's diferentes: 1,2; 4,5; 6,8. Ajustar el pH con una aproximación de $\pm 0,05$ unidades del valor prescrito.
- ✓ Un baño de agua con un termostato, temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. En este baño se coloca el depósito, para que el tampón adquiera la temperatura del baño.
- ✓ Una bomba peristáltica, que bombea el medio de disolución manteniendo un flujo constante a través de la celda, haciendo pasar el tampón respectivo por la parte inferior de la celda, el medio de disolución entra en contacto con la muestra y finalmente atraviesa el sistema de filtros. La bomba no debe estar colocada en un nivel superior al del reservorio o depósito.
- ✓ Una celda de flujo, transparente (donde se coloca la muestra a analizar sea una cápsula, comprimido, polvo liofilizado, suspensión, jarabe), montada verticalmente, en la cuál se ubican las perlas de vidrio para ayudar a mantener el flujo laminar constante. El equipo emplea un mecanismo de abrazadera y dos juntas de goma para fijar la celda en posición vertical.

- ✓ Un sistema de filtros para retener las partículas no disueltas. En la celda, el flujo sale de la cámara por un orificio de pequeño diámetro y sube hacia el sistema de filtración. La parte central de la cubeta forma una cavidad destinada a retener los excipientes lipófilos que flotan en la superficie del medio de disolución. Una rejilla metálica hace las veces de filtro grueso, la parte superior está provista de un soporte que puede contener filtros de papel, de fibra de vidrio o de celulosa.

- ✓ Un recipiente para recibir la muestra (probetas de vidrio graduadas).

Antes de iniciar el ensayo de disolución de las 2 formulaciones de AHCC, se debe vaciar el aire de la celda (ya que las burbujas interfieren con la velocidad de flujo del equipo), mediante la aspiración con una jeringa desde el punto del circuito donde se tomarán las muestras. Existen varios tipos de celda, varían en función del tamaño (largo y diámetro), para realizar nuestros experimentos escogimos la celda de mayor diámetro, porque nos permitía trabajar con mayor cantidad de muestra.

- **Muestras**

- AHCC-FD (lote E93-0706-2).
- AHCC-FG (lote 905FE92).

- **Medios de disolución**

- Solución tampón ácido (pH: 1,2), durante los primeros 60 minutos (0-60 minutos).
- Solución tampón acetato (pH: 4,5), los siguientes 75 minutos (60-135 minutos).
- Solución tampón fosfato (pH: 6,8), los posteriores 45 minutos (135-180 minutos).

- **Tiempos de muestreo**

Cada ensayo de disolución dura 3 horas (180 minutos), durante este periodo de tiempo circula a través de la celda de flujo continuo las diferentes soluciones tamponadas y se toman muestras a través de los siguientes intervalos de tiempo (tabla 6):

Tabla 6. Tiempos de análisis con diferentes pH's.

| Intervalos de tiempo con las diferentes soluciones tampón (minutos) | | |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| pH: 1,2 | pH: 4,5 | pH: 6,8 |
| 0-5 | 60-75 | 135-150 |
| 5-10 | 75-90 | 150-165 |
| 10-15 | 90-105 | 165-180 |
| 15-30 | 105-120 | |
| 30-45 | 120-135 | |
| 45-60 | | |

- **Velocidad de flujo:** (5 - 9 ml/min.)

La velocidad de flujo varía de una solución tampón a otra y entre las formulaciones analizadas.

- **Condiciones de estudio**

Colocar el recipiente conteniendo el tampón en el baño termostatzado con un adecuado nivel de agua, encender el termostato (temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), seguidamente montar la celda, colocando dentro de ella las perlas de vidrio, primero se coloca una perla de 5 mm, de diámetro en el ápice y posteriormente se colocan las demás perlas de 1 mm, de diámetro en la base cónica de la celda (hasta una determinada altura, previa pesada de las mismas), se fija la celda en posición

vertical y se introduce la muestra, se cierra la celda con un sistema de filtros (en cada ensayo utilizamos 2 filtros, uno de nitrocelulosa y el otro de fibra de vidrio). Después, se sujeta la celda al equipo por un sistema de abrazaderas con dos juntas de goma, una más pequeña que la otra. Cuando ya tenemos la celda montada y hemos alcanzado la temperatura óptima, encendemos la bomba y empezamos el ensayo. Al activar el sistema de bombeo, el tampón ácido pasa a través de la Celda de Flujo Continuo durante los primeros 60 minutos, luego se cambia a la solución de tampón acetato los 75 minutos siguientes (el cambio de depósito se hace sin parar el equipo) y finalmente se vuelve a cambiar de depósito al tampón fosfato por un tiempo de 45 minutos. Las muestras se recogen en probetas graduadas, se miden los volúmenes en cada intervalo de tiempo y después son analizadas por espectrofotometría UV ($\lambda=275$). Se realizó los ensayos por triplicado para cada formulación de AHCC. La figura 29, muestra el ensayo de disolución en la celda de flujo continuo de la formulación AHCC-FD. Este tipo de estudio sirve para determinar una biodisponibilidad *in vitro* del AHCC.

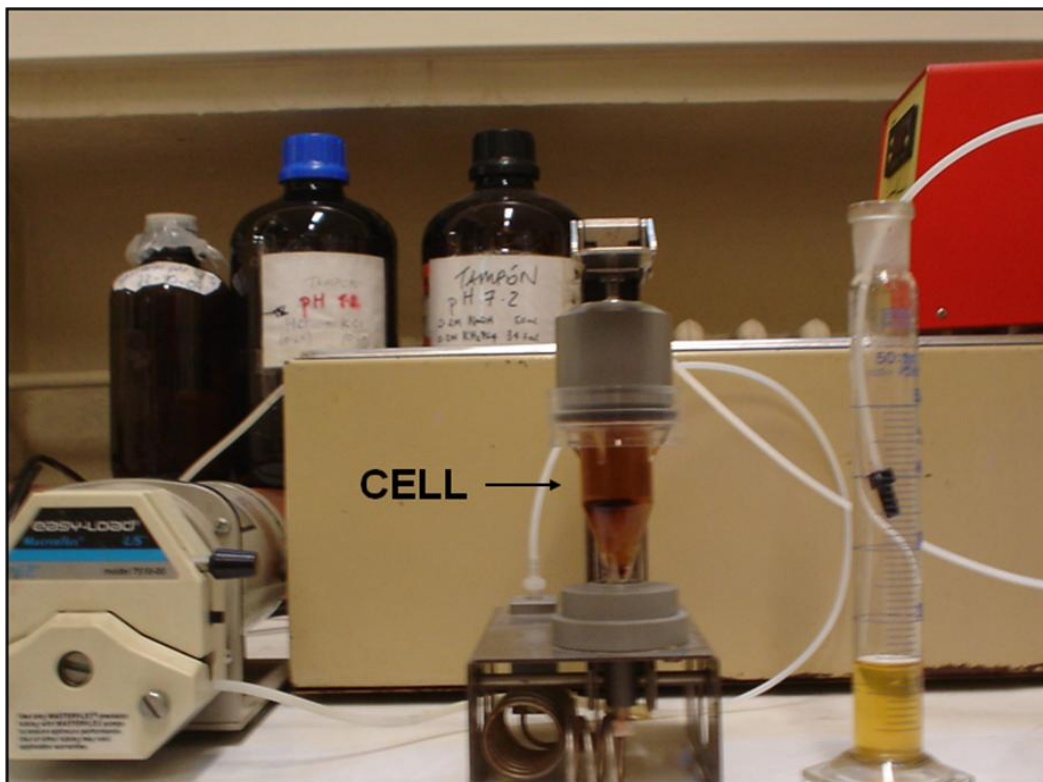


Figura 28. Ensayo de disolución en celda de flujo continuo.

2.4. CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DEL AHCC

2.4.1. Estudio químico de biodisponibilidad *in vivo* del AHCC

Diseñamos un estudio de biodisponibilidad *in vivo* del AHCC, intentando seguir distintos componentes químicos del AHCC *in vivo*. Con este fin analizamos variaciones en la glucemia después de la ingesta oral del AHCC-FD y el análisis químico mediante HPLC de componentes de AHCC como son: G₁ e isomaltol y un derivado metabólico de la ingesta: la adenosina. Las muestras biológicas proceden de voluntarios humanos sanos y animales (ratones) tras la administración de AHCC.

2.4.1.1. Determinación de glucemia tras administración oral de AHCC-FD (Congreso ICNIM, 2010)

El principal componente del AHCC son los hidratos de carbono (mayoritariamente los polisacáridos), algunos de ellos pueden transformarse en el tracto digestivo en glucosa. Aproximadamente un 18,6% de la formulación AHCC-FD (polvo liofilizado) puede ser transformada en glucosa. Estudiamos la glucemia, con la finalidad de comprobar si la glucemia puede ser un buen indicador de la biodisponibilidad *in vivo* del AHCC después de su administración por vía oral.

- **Equipo utilizado**

- Glucómetro (One Touch® Ultra, LifeScan Johnson & Johnson).
- Cronómetro calibrado.

- **Materiales y reactivos**

- AHCC-FD (Lote E93-0706-2).
- Tiras reactivas de glucosa (para equipo One Touch® Ultra).
- Agua potable de grifo.

- **Diseño experimental**

Tres voluntarios sanos (2 mujeres y 1 hombre), de edades comprendidas entre 27 y 48 años, de peso promedio 60 Kg, previo consentimiento informado, ingirieron por vía oral en condiciones de ayuno, 5 g de AHCC-FD (equivalente a 930 ± 20 mg de glucosa), disueltos en 150 ml de agua. Las muestras de sangre fueron tomadas en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos.

- **Método**

Los niveles de glucosa en plasma se midieron basándose en el método de la glucosa oxidasa, empleando tiras reactivas y un glucómetro. Un método sencillo por el cuál analizamos la glucemia en estado de ayuno (antes de la ingestión de los 5 g de AHCC-FD) y luego en los tiempos establecidos.

A raíz de los resultados obtenidos, decidimos que la glucemia no es un buen indicador de biodisponibilidad *in vivo* después de la ingestión oral del AHCC-FD.

2.4.1.2. Análisis químico mediante HPLC de G₁, isomaltol y adenosina en muestras biológicas

Químicamente la formulación AHCC-FD (polvo liofilizado) contiene un glucósido (G₁) conteniendo isomaltol. El isomaltol libre es un material de baja solubilidad, presente en una proporción muy pequeña en el AHCC-FD (0,18%). La mayoría de isomaltol está presente como un glucósido soluble (G₁). El G₁ e isomaltol libre han sido determinados mediante un método de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), que hemos optimizado.

- **Equipos utilizados**

- Cromatógrafo líquido (Jasco, Japón).
- Bomba de vacío, modelo Büchi Vac® V-500 (Büchi, Suiza).
- Centrífuga Hettich Universal 32, Génesis Instrumentación, S.L. Alemania.
- Agitador vortex IKA, modelo MS1 Minishaker.

- Agitador magnético-calefactor, RCT Basic IKA. Labortechnik, Alemania.

- **Materiales y reactivos**

- Micropipetas Eppendorf® calibradas, volúmenes de (0,1 - 1 ml) y de (0,5 - 5 ml), Eppendorf, Hamburgo, Alemania.
- Material de vidrio (uso general en laboratorio).
- Equipo de filtración de vidrio para fase móvil de HPLC.
- Tubos de vidrio para centrifuga.
- Gradillas de plástico y metal.
- Jeringas de plástico (2,5 ml; 5 ml).
- AHCC-FD (lote E93-0706-2 y E15-0228-2).
- Acetonitrilo (ACN), HPLC-gradiente-UV-IR, Merck, Alemania.
- Ácido ortofosfórico 85% (H₃PO₄), Panreac Química, España.
- Agua desionizada para HPLC, Millipore Elix 3.
- Isomaltol (C₆H₆O₃) patrón, Amino Up Chemical Co. Ltd.
- Metanol, HPLC-gradiente-UV-IR, Panreac Química, España.
- Adenosina (Adenosine free base), lote 030M1555V, Sigma Aldrich Química, S.A.
- Uretano al 15%.
- Filtro para muestra: filtros hidrofílicos de PVDF 0,45 µm, Millipore® Millex - HV, Merck, Alemania.
- Filtros estériles 0,22 µm, Millipore® Millex - GV, Merck, Alemania.
- Filtro para fase móvil: filtro de nitrocelulosa Ø 47 mm, con diámetro de poro 0,45 µm, Millipore® Merck, Alemania.

- **Diseño experimental**

Tres voluntarios sanos (2 mujeres y 1 hombre), de edades comprendidas entre 27 y 48 años, de peso promedio 60 Kg, pacientes sanos que participan en el estudio de biodisponibilidad *in vivo*, previo consentimiento informado. Los pacientes ingirieron a la misma hora, en condiciones de ayuno, 5 g de AHCC-FD, disueltos en 150 ml de agua.

- **Muestras biológicas**

Las muestras de plasma a los voluntarios (8 ml en cada intervalo de tiempo, a cada uno de ellos), se tomaron a los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 4, 7, 32 y 50 horas. Todas las muestras de plasma se congelaron hasta su respectivo análisis.

- **Método analítico optimizado por (RP-HPLC), para la identificación y cuantificación de G₁ e Isomaltol en plasma humano**

El método analítico se ha llevado a cabo en un equipo de cromatografía líquida, que consta de los siguientes módulos:

- Desgasificador: DG-2080-53 3-line, Degasser (Jasco, Japón).
- Mezclador: LG 2080-02, Ternary Gradient Unit (Jasco, Japón).
- Bomba: PU-1580, Intelligent HPLC Pump (Jasco, Japón).
- Inyector automático: 231 XL (Gilson, USA).
- Detector: UV-1575, Intelligent UV/VIS (Jasco, Japón).
- Ordenador interfase y programa de integración de datos, modelo Borwin 1,5 (JMBS Developments, Francia).

Las características de este método analítico por RP-HPLC para llevar a cabo la detección y cuantificación de G₁ e Isomaltol libre en muestras de plasma humano:

- **Longitud de onda de análisis:** 275 nm.
- **Fase estacionaria:** columna C₁₈, 5 µm RP-Aqueous, 100 Å, dimensiones (250 x 4,6 mm), referencia (1001632), Develosil®, Nomura Chemical.
- **Volumen de inyección:** 100 µl.
- **Flujo:** 1 ml/min.
- **Temperatura:** 40°C.
- **Fases móviles:** se ha utilizado 2 fases móviles que se van mezclando a lo largo del análisis, la proporción de acetonitrilo (ACN) va aumentando poco a poco desde que se inyecta la muestra hasta que finaliza el análisis. Como fase móvil A se usa una solución acuosa que contiene un

5% de acetonitrilo y un 0,1% de ácido ortofosfórico. Como fase B se usa acetonitrilo (100%), estas fases móviles se filtran previamente con filtros de membrana de 0,45 µm, utilizando un equipo de filtración con bomba de vacío (Büchi Vac® V-500).

- **Tiempo de cromatograma:** 55 minutos.
- **Tratamiento de muestras biológicas para analizar por HPLC:** A 0,5 ml de plasma se añade 1 ml de metanol (1:2, muestra: solvente) y agitamos en un vortex un par de minutos, luego centrifugamos la muestra (5000 rpm durante 5 minutos), con la ayuda de una jeringa se cogió el sobrenadante con mucho cuidado y se filtró a través de filtros de membrana (PVDF 0,45 µm).
- **Preparación de la disolución Patrón de AHCC-FD®:** se pesó exactamente 500 mg de AHCC-FD (polvo liofilizado) en un matraz aforado de 100 ml y se enrasó con agua desionizada. De esta disolución se tomó exactamente 1 ml con una pipeta automática y se llevó a un matraz de 10 ml y se enrasó con agua desionizada (concentración final de 0,5 mg/ml). La muestra se filtró por PVDF 0,45 µm.
- **Preparación de la disolución Patrón de isomaltol:** se pesó exactamente 25 mg de isomaltol ($C_6H_6O_3$), en un matraz aforado de 50 ml, se solubiliza y enrasa con metanol. De esta disolución tomar exactamente 0,2 ml (pipeta graduada de 1 ml de vidrio), se llevó a un matraz aforado de 50 ml y se enrasó con agua desionizada (concentración final de 2 µg/ml). La muestra se filtró por PVDF 0,45 µm.
- **Gradiente:** a partir del método de análisis en gradiente (SOP CA 01001 AH) proporcionado por Amino Up Chemical Co., Ltd., logramos optimizar un método de análisis utilizando un nuevo gradiente para identificar y cuantificar al glucósido (G_1) conteniendo isomaltol libre en muestras biológicas (plasma humano).

Optimización del Gradiente

La fase móvil B se va mezclando con la fase móvil A durante el análisis de la muestra, empezamos diseñando el gradiente en 2 fases (tabla 7), en la primera fase

el incremento de ACN es pequeño (5 ml) para separar selectivamente los picos que corresponden al G₁ e isomaltol libre, mientras que en la segunda fase vamos incrementando considerablemente el ACN, con la finalidad de limpiar la columna después de cada análisis de muestra biológica, para disminuir el riesgo de saturación de la columna y que además la columna retenga impurezas que puedan afectar el análisis entre una muestra y otra.

Tabla 7. Gradiente de eluyentes utilizado en el análisis.

| Tiempo (min.) | Fase móvil | |
|---------------|------------------|------------------|
| | Fase móvil A (%) | Fase móvil B (%) |
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |
| 45 | 52,6 | 47,4 |
| 46 | 52,6 | 47,4 |
| 50 | 100 | 0 |
| 55 | 100 | 0 |

La figura 29, muestra el cromatograma típico de una disolución patrón de AHCC-FD, donde apreciamos los picos de G₁ e isomaltol libre, con sus tiempos de retención: 10,3 y 19,5 minutos respectivamente. El isomaltol libre está en pequeña cantidad en AHCC-FD, la mayor cantidad se encuentra formando parte del glucósido soluble G₁.

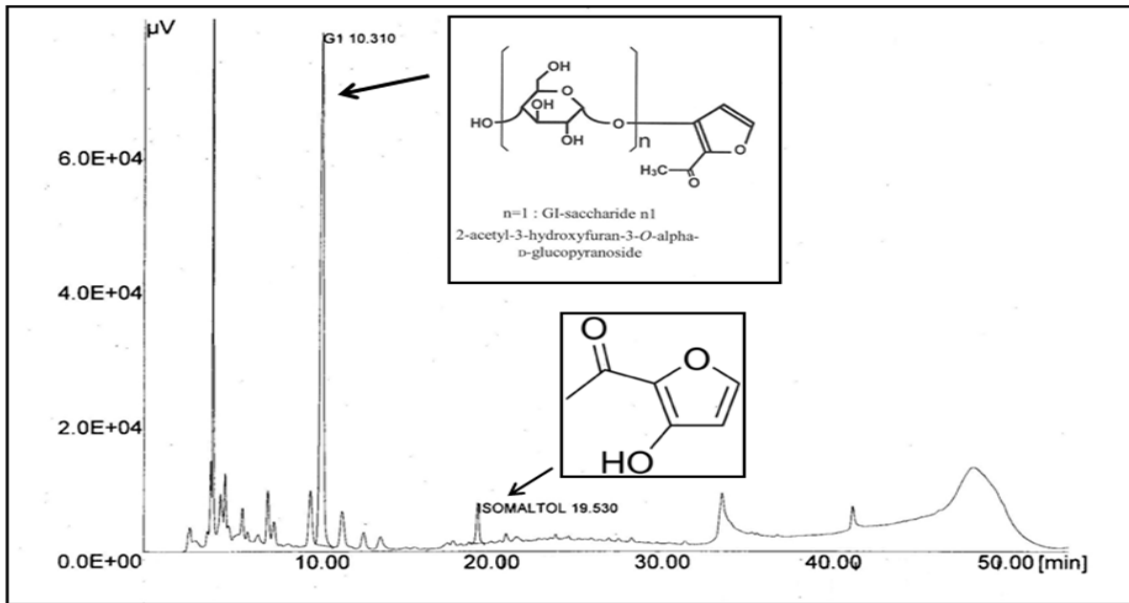


Figura 29. Cromatograma típico de AHCC-FD, muestra el G₁ e isomaltol libre.

A continuación (figura 30), se observa el cromatograma correspondiente a una muestra de plasma humano, 7 horas después de la ingesta oral de AHCC-FD, el isomaltol libre tiene un tiempo de retención de 19,9 minutos.

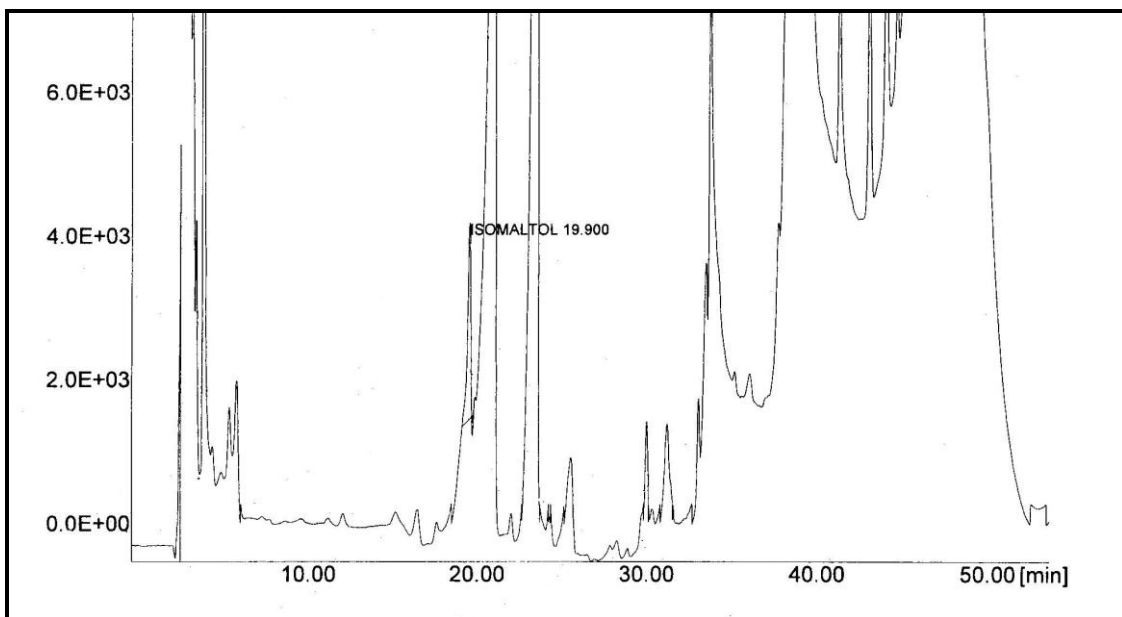


Figura 30: Muestra el tiempo de retención del isomaltol libre en plasma.

El gradiente inicial que diseñamos (tabla 7), decidimos optimizarlo, para ajustar el tiempo de análisis de las muestras, cambiando tiempos y cantidades de las fases móviles, y conseguimos un nuevo gradiente optimizado, con un tiempo de análisis total de 45 min (tabla 8).

Tabla 8. Condiciones del gradiente optimizado.

| Tiempo (min.) | Fase móvil | |
|---------------|------------------|------------------|
| | Fase móvil A (%) | Fase móvil B (%) |
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |
| 35 | 95 | 5 |
| 40 | 52,6 | 47,4 |
| 41 | 52,6 | 47,4 |
| 45 | 100 | 0 |

Con este nuevo gradiente optimizado analizamos todos los plasmas de los voluntarios obtenidos en los diferentes intervalos de tiempo. En el análisis de las muestras procedimos a enriquecer los plasmas con una cantidad conocida de disolución patrón de AHCC-FD e isomaltol, y comparar los tiempos de retención de los cromatogramas de plasma obtenidos con las disoluciones patrón.

Los resultados muestran concentraciones muy bajas de isomaltol libre, por esta razón decidimos realizar un nuevo experimento modificando el diseño experimental:

- ✓ Trabajamos con los mismos voluntarios sanos (2 mujeres y 1 hombre), previo consentimiento informado.
- ✓ La dosis de 5 g de AHCC-FD, la repartimos en 2 tomas de 2,5 g cada una de ellas (una dosis por la mañana antes de desayunar y otra dosis por la noche después de cenar). Los voluntarios acudieron al laboratorio de análisis clínicos, el día del inicio del ensayo en ayunas, para la correspondiente toma de muestra, luego ingerieron por vía oral la dosis de 2,5 g y después desayunaron. La siguiente dosis la tomaron por la noche,

después de cenar. Los voluntarios ingirieron 5 g de AHCC-FD al día (repartidos en 2 dosis), durante 7 días consecutivos, acudiendo diariamente al laboratorio de análisis clínicos para la extracción de sangre en condiciones de ayuno.

- **Método analítico optimizado por (RP-HPLC), para la identificación y cuantificación de G₁ e isomaltol en plasma de ratón**

Utilizamos el mismo cromatógrafo líquido, método y condiciones analíticas para detectar y cuantificar G₁ e Isomaltol en plasma de ratón. Utilizando el nuevo gradiente optimizado (tabla 7).

Todos los estudios en ratones que se desarrollaron en la presente tesis, se realizaron de acuerdo con las directivas de la convención para la protección de los animales usados en experimentación y con otros fines científicos establecidos por la unión europea (86/609/EEC).

Primer diseño experimental en ratones:

- **Animales de experimentación:** los animales de experimentación utilizados han sido ratones de la estirpe SWISS CD-1 (Charles River, Francia), de ambos sexos, de peso promedio similar (25-30 g), y de la misma edad. Los animales presentaban características uniformes en cuanto a peso y edad para constituir los distintos lotes experimentales. Cada lote estaba formado por 5 ratones, dispuestos en jaulas de tamaño adecuado y se mantenían en el animalario a temperatura constante de 20 - 25°C y ciclo de luz controlado, suministrándoles agua y comida *ad libitum* durante todo el periodo de experimentación.

- **Dosis a administrar:** realizamos el cálculo de la dosis en función de la cantidad administrada a un voluntario sano (5 g de AHCC-FD para un voluntario de 70 Kg). Se administró por vía oral 0,2 ml de una disolución de AHCC-FD en agua desionizada (8,9 mg/ml).

- **Preparación de la muestra a administrar a los ratones:** se preparó una disolución saturada de AHCC-FD (890 mg en 100 ml de agua desionizada) y se dejó precipitar durante 1 día, al día siguiente se centrifugó (5000 r.p.m., 5 min). El sobrenadante se filtró primero utilizando un filtro de membrana de 0,45 μm y luego la solución filtrada se esterilizó mediante un filtro de membrana estéril de 0,22 μm . Esta solución estéril es la que se administró a los animales.

- **Tiempos de muestreo:** se distribuyeron los ratones en 7 lotes (5 animales por cada lote), en total 35 ratones. Intervalo de muestreo: 0, 2, 4, 7, 12, 24 y 48 horas.

- **Obtención de las muestras de plasma de los ratones:** para la obtención de las muestras, primeramente los ratones se anestesian con uretano al 15%, una vez alcanzado el plano de anestesia quirúrgica (pérdida del reflejo óculo-palpebral), la sangre se obtiene directamente por abertura de la caja torácica, con la precaución de dejarla fluir libremente (evitando de este modo que ésta pueda quedar diluida con el contenido de fluido de los distintos órganos). La sangre se recoge mediante pipetas Pasteur limpias y heparinizadas, depositándolas individualmente en eppendorfs. Tras la extracción, la sangre se centrifuga (7500 r.p.m., 10 min). Separando el plasma del resto de los componentes sanguíneos y se congela en eppendorfs a -20°C hasta el momento de su análisis mediante el método por HPLC antes descrito.

- **Preparación de las muestras para el análisis por HPLC:** en un tubo de centrifuga se coloca 0,4 ml de plasma, luego se adicionó 0,4 ml de metanol (1:1), después se agitó en un vortex durante 3 min, luego se centrifugó (5000 r.p.m., 10 min), se filtró el sobrenadante con un filtro de membrana de 0,45 μm .

- **Análisis de las muestras:** las muestras se analizaron mediante el método analítico optimizado por (RP-HPLC), antes descrito.

Al analizar las muestras obtenidas de este primer estudio farmacocinético experimental en ratones, no detectamos el G_1 e isomaltol libre, concluimos que por la vía oral no se absorben ni isomaltol ni G_1 .

Decidimos realizar un nuevo experimento, pero sustituyendo la vía de administración oral por la vía intravenosa y aumentar los intervalos de toma de muestra a tiempos más cortos.

Segundo diseño experimental en ratones:

En este segundo experimento trabajamos con la misma estirpe de ratones, uniformes en peso y edades, de ambos sexos, la distribución y mantenimiento de los mismos según el experimento anterior. Sólo cambiamos los 2 parámetros que a continuación se detallan, todo lo demás se mantiene en las mismas condiciones.

- **Vía de administración:** se administró por vía intravenosa 0,2 ml de la disolución diluida utilizada en el experimento anterior.
- **Tiempos de muestreo:** se distribuyeron los ratones en 12 grupos (5 animales por cada grupo), en total 60 ratones. Intervalo de muestreo: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6;12; 24; 36 y 48 horas.

Al analizar las muestras según el método cromatográfico antes descrito, en los cromatogramas no detectamos los picos para G_1 e isomaltol libre. En vista de estos resultados, decidimos realizar un tercer experimento, en cuyo diseño experimental acortaríamos más los tiempos de toma de muestra durante los 120 primeros minutos.

Tercer diseño experimental en ratones:

En este tercer y último experimento en ratones modificamos los intervalos de toma de muestra, intervalos más pequeños durante los 120 primeros minutos, todas las demás variables permanecen constantes.

- **Tiempos de muestreo:** se distribuyó los ratones en 9 grupos (5 animales por cada grupo), en total 45 ratones. Intervalo de muestreo: 0, 5, 10, 15, 25, 30, 60, 90, 120 min.

Los resultados de este tercer experimento, en el cuál tampoco identificamos G₁ e isomaltol libre en las muestras de plasma de los ratones, nos permiten afirmar que ni el glucósido soluble conteniendo isomaltol (G₁), ni el isomaltol libre son útiles como indicadores de la biodisponibilidad oral de formulaciones de AHCC-FD.

- **Desarrollo de un método analítico por HPLC para la identificación y cuantificación de adenosina en plasma humano y de ratón**

La adenosina es un componente presente en AHCC y que además se puede obtener como derivado de la metabolización de AHCC-FD. La adenosina está relacionada con la actividad de AHCC mediante estudios realizados por el grupo de investigación Dr. Sato (ICNIM, congreso 2012). La adenosina como compuesto químico puro está formada por cristales de agua, prácticamente insoluble en alcohol, m.p. 234 - 235°, absorción UV máxima: 260 nm (Index Merck, 2002). A través de un estudio detallado y basándonos en referencias bibliográficas de otros investigadores diseñamos un método de análisis para adenosina por HPLC.

- ✓ **Análisis por espectrofotometría UV - Visible de adenosina**

Primero hicimos un barrido por espectrofotometría de adenosina, para ello preparamos una disolución patrón de adenosina, pesando exactamente 25 mg del patrón en un matraz aforado de 100 ml, disolver y enrasar con agua desionizada. De esta disolución tomar una alícuota de 0,2 ml en otro matraz de 100 ml y enrasar con fase móvil. Concentración final de la disolución patrón es 5 µg/ml, se filtró y analizó en el espectrofotómetro.

- ✓ **Análisis por HPLC de adenosina**

Desarrollamos un método analítico en condiciones isocráticas por HPLC para detectar y cuantificar adenosina en plasma humano y de ratón, empleando el mismo cromatógrafo líquido (Jasco, Japón), y con las siguientes condiciones de análisis:

- **Longitud de onda de análisis:** 260 nm.
- **Fase estacionaria: Volumen de inyección:** 100 µl.
- **Flujo:** 1 ml/min.
- **Fase estacionaria:** C18 Zorbax® SB-C18, 5 µm 250 x 4,6 mm (Agilent).
- **Volumen de inyección:** 100 µm.
- **Flujo:** 1 ml/min.
- **Temperatura:** ambiente.
- **Fase móvil:** es una mezcla de acetonitrilo: tampón (5:95, v / v). Tampón de NaH₂PO₄ (0,01 M) se usó para proporcionar un pH de 4,9. Esta fase móvil se filtró utilizando filtros de membrana de 0,45 µm, en un equipo de filtración con bomba de vacío (Büchi Vac® V-500).
- **Tiempo de cromatograma:** 20 minutos.
- **Preparación de la disolución patrón de AHCC-FD:** se pesó exactamente 500 mg de AHCC-FD en un matraz aforado, se dispersó con agua desionizada y se llevó a un baño de ultrasonidos durante 30 segundos. Luego se enrasó con el mismo diluyente. De esta disolución con la ayuda de una pipeta automática se tomó una alícuota de 1 ml y se llevó a un matraz de 10 ml y se enrasó con agua desionizada. Concentración final: 0,5 mg/ml. Se filtró y analizó.
- **Preparación de la disolución patrón de adenosina:** esta disolución se elaboró de la misma forma que para el análisis por espectrofotometría UV-Visible.

En la figura 31 se muestran dos cromatogramas. El primer cromatograma situado en la parte superior corresponde a la disolución patrón de adenosina y el cromatograma situado en la parte de abajo es una disolución patrón de AHCC-FD ($\lambda=260$ nm). El pico correspondiente a la adenosina en ambos cromatogramas tienen un tiempo de retención igual a 12,3 min.

Además durante el desarrollo del método procedimos a enriquecer una disolución patrón de AHCC-FD con una alícuota de 200 μ l de una disolución patrón de adenosina, los cromatogramas correspondientes a este análisis se muestran en la figura 32.

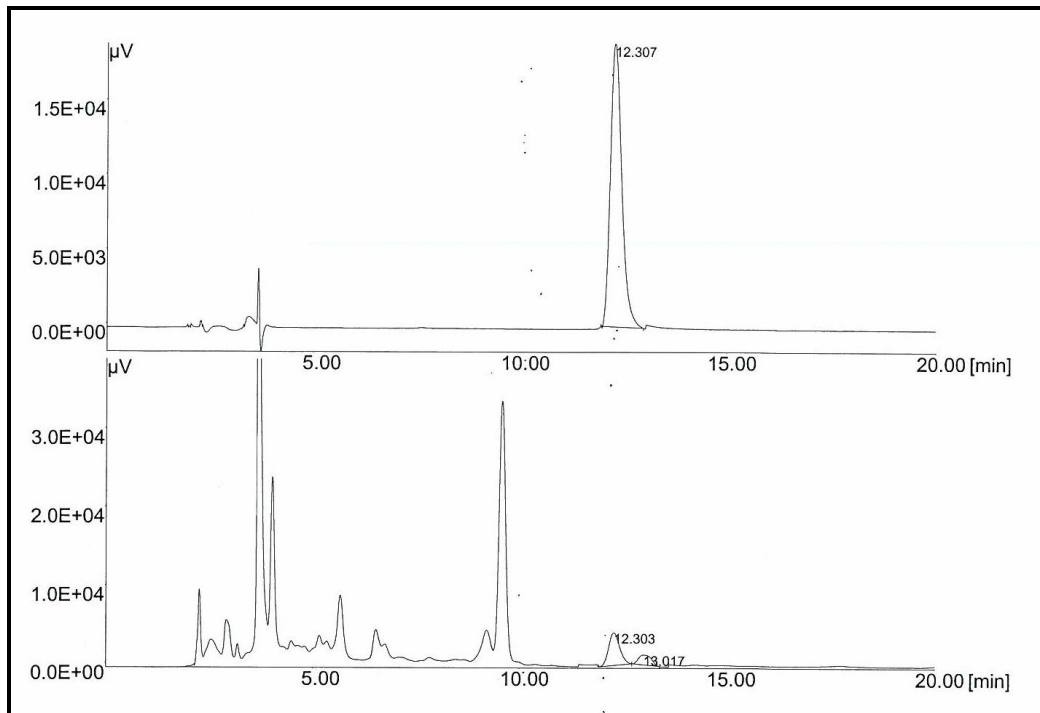


Figura 31: cromatogramas de una disolución patrón de adenosina y de una disolución patrón de AHCC-FD, respectivamente.

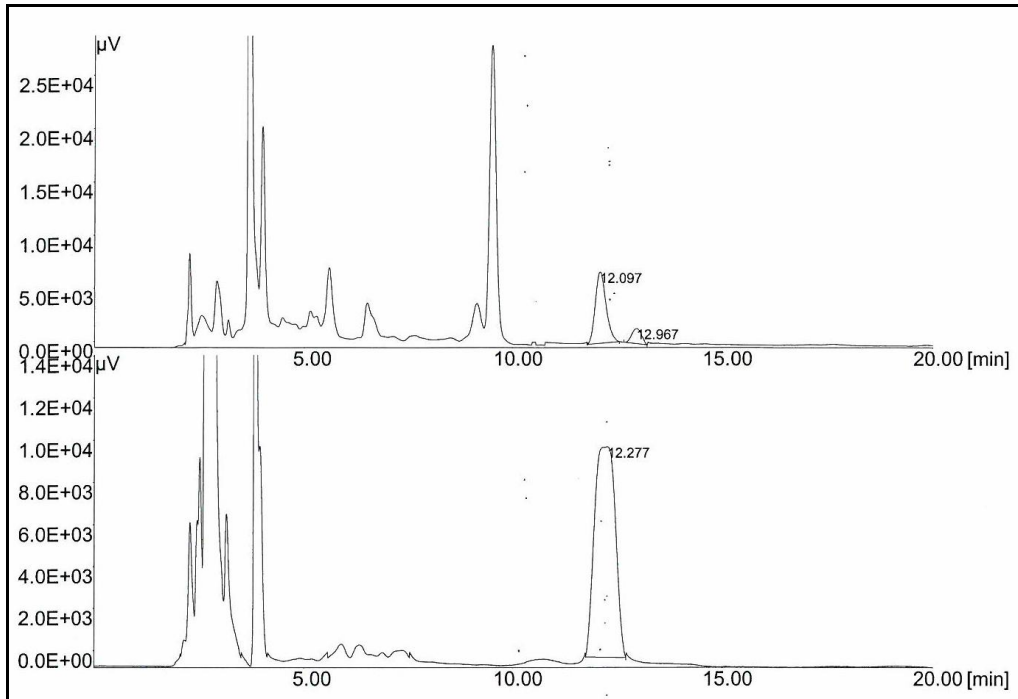


Figura 32: Superposición de 2 cromatogramas, el de arriba corresponde a una disolución patrón de AHCC-FD y el de abajo a la muestra enriquecida.

2.4.2. Actividad antiparasitaria del AHCC en un modelo experimental de *Trichinella spiralis*

Se evalúa la actividad del AHCC en el modelo experimental de ratón infectado con *T. spiralis*. El estudio se subdivide en tres fases:

- Descripción y optimización de un modelo experimental de ratón con *T. spiralis*.
- Efecto de diferentes dosis y la comparación de la formulación de sobres frente materia prima (AHCC-FD) como una prueba de bioequivalencia farmacodinámica.
- Efecto inmunológico de AHCC en el modelo experimental de ratón con *T. spiralis*.

Los experimentos los realizamos en las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

2.4.2.1. Descripción y optimización de un modelo experimental de ratón con *T. spiralis* (Congreso ICNM, 2012)

Inicialmente, el objetivo del estudio era comprobar si el AHCC podría aumentar la actividad antihelmíntica de tratamiento químico convencional con albendazol. A continuación, se describe el método parasitológico y los materiales utilizados en los experimentos:

- **Método parasitológico**

Se trabajó utilizando el modelo experimental de ratón con *T. spiralis* (un modelo de fácil mantenimiento en estos animales de laboratorio y que además presenta un ciclo biológico completo a nivel intestinal, sanguíneo y tisular), en el desarrollo de los experimentos se emplearon:

- **Animales de experimentación:** los animales de experimentación utilizados han sido ratones de la estirpe SWISS CD-1 (Charles River, Francia), de ambos sexos, de peso promedio similar (30-35 g), y de la misma edad. Los animales presentaban características uniformes en cuanto a peso y edad para constituir los distintos lotes experimentales. Cada grupo estaba formado por 10 ratones, dispuestos en jaulas de tamaño adecuado y se mantenían en el animalario a temperatura constante de 20-25°C y ciclo de luz controlado, suministrándoles agua y comida ad libitum durante todo el periodo de experimentación.

- **Dosis infectante administrada:** los grupos de ratones fueron infectados oralmente con 300 ± 50 larvas de *T. spiralis*, siguiendo la técnica (Martínez, 1978), con ligeras modificaciones, a partir de las canales de ratones infectados con *T. spiralis*, después de una digestión artificial.

- **Dosis terapéutica administrada:** se administró 0,3 ml de una disolución de AHCC-FD, que corresponde a una sola dosis por vía oral a los ratones de 43 mg/Kg (para un ratón de peso promedio de 30 g se le administró 1,3 mg de AHCC-FD diariamente). La pauta posológica se estableció mediante la

administración diaria por sonda buco gástrica desde el día 14 pre infección hasta la finalización del experimento. Los ratones del grupo control también recibieron el mismo volumen de líquido (agua de grifo), para someterlos a las mismas condiciones de estrés que el resto de los animales.

- **Tiempos de recuperación de adultos y recuento:** grupos de 10 ratones cada uno, incluimos un grupo control también con 10 ratones, que se sacrificaron después de la infección en los siguientes intervalos de días: D1, D3, D7, D10, D22. Para la recuperación y el recuento de HA y MA se realizó la técnica (Denham y Martínez, 1970).

Realizamos varios experimentos en los cuáles fuimos modificando los tiempos de recuperación de adultos, en función de los resultados obtenidos, con la finalidad de explicar que ocurre en el intestino de los animales tratados con AHCC después de la infección con *T. spiralis*.

Con los resultados obtenidos llegamos a optimizar un método parasitológico, donde demostramos la eficacia del tratamiento en la fase intestinal en el día 7 después de la infección. En nuestros experimentos es a este día 7 cuando se ha observado la máxima actividad. Con este método decidimos probar el efecto de diferentes dosis de AHCC en la respuesta biológica. Posteriormente se procedió a comparar el efecto de una formulación de sobres frente a la materia prima (AHCC-FD) como medida de bioequivalencia farmacodinámica.

2.4.2.2 Efecto de diferentes dosis en la respuesta y comparación de la formulación de sobres frente a materia prima (Congreso ICNM, 2012)

Se han llevado a cabo dos experimentos para estudiar el efecto de la dosis en la respuesta biológica. En un primer experimento se calcularon las diferentes dosis a utilizar entre las especies humana y ratón basándonos únicamente en las diferencias de peso. En un segundo experimento además se utilizó como parámetro comparador la superficie corporal. En el desarrollo experimental se han mantenido las condiciones anteriormente descritas siendo la recuperación de adultos

exclusivamente el día 7 después de la infección dado que en este día es cuándo se observaron las diferencias más importantes. Además en este experimento se utilizaron dos cepas de ratones (SWISS CD-1 y BALB/c) para estudiar posibles diferencias entre las cepas.

En el primer experimento se estudiaron las siguientes dosis:

- 0,22 mg/ratón Swiss.
- 0,44 mg/ratón Swiss.
- 1,3 mg/ratón Swiss.
- 1,3 mg/ratón Balb/c.
- 1,9 mg/ratón Swiss.
- 2,6 mg/ratón Swiss.

A la vista de los resultados obtenidos en el experimento anterior basados en la relación entre distintas dosis y efectos obtenidos, se nos planteo la duda sobre si la relación de dosis entre humanos y ratones que estábamos utilizando era la correcta. En el experimento anterior nos basábamos únicamente en el peso para hacer las correcciones de dosis entre humanos y ratones. Otro criterio es el que tiene también en cuenta la superficie corporal y que está descrito por la FDA (2005). Este último tratamiento es el descrito como dosis equivalente en humanos (HED) que utiliza un factor de corrección adicional al peso de 12,3. De esta forma para el siguiente experimento se utilizan dosis alrededor de 12 veces mayores a las anteriores. Además en este segundo experimento se comparó la eficacia de una formulación de sobres frente a la materia prima a dos dosis para estudiar la posible bioequivalencia farmacodinámica. Las dosis estudiadas en ratones y su equivalencia en humanos (HED) son:

- 1,3 mg AHCC-FD por ratón Swiss (equivalente a 0,25 g en humanos según HED).
- $0,22 \text{ mg} \times 12,3 = 2,66 \text{ mg}$ AHCC-FD por ratón Swiss (equivalente a 0,5 g humanos según HED).

- $1,3 \text{ mg} \times 12,3 = 16 \text{ mg}$ AHCC-FD por ratón Swiss (equivalente a 3 g humanos según HED).
- $1,3 \text{ mg} \times 12,3 = 16 \text{ mg}$ AHCC-FD en sobre por ratón Swiss (equivalente a 3 g humanos según HED).
- $2,6 \text{ mg} \times 12,3 = 32 \text{ mg}$ AHCC-FD en sobre por ratón Swiss (equivalente a 6 g humanos según HED).
- También se incluyó un placebo con agua.

Todos nuestros experimentos incluyeron un grupo control de infección con el cuál comparamos la eficacia de nuestros resultados con las diferentes dosis administradas.

2.4.2.3. Efecto inmunológico de AHCC en el modelo experimental de ratón con *T. spiralis*.

Desarrollamos este estudio con la finalidad de estudiar la eficacia del AHCC en el modelo de infección con *T. spiralis*.

Para realizar este experimento utilizamos:

- ✓ **Animales de experimentación:** los animales de experimentación utilizados han sido ratones de la estirpe SWISS CD-1 (Charles River, Francia), y ratones consanguíneos BALB/c, de ambos sexos, de peso promedio similar (30-35 g), y de la misma edad. Los animales presentaban características uniformes en cuanto a peso y edad para constituir los distintos grupos experimentales. Cada grupo estaba formado por 10 ratones, dispuestos en jaulas de tamaño adecuado y se mantenían en el animalario a temperatura constante de 20 - 25°C y ciclo de luz controlado, suministrándoles agua y comida *ad libitum* durante todo el periodo de experimentación.

- ✓ **Dosis infectante administrada:** mantenemos la misma dosis infectante, los grupos de ratones fueron infectados oralmente con 300 ± 50 larvas de *T. spiralis*.

- ✓ **Dosis terapéutica a administrar:** La pauta posológica se estableció mediante la administración diaria por sonda buco-gástrica de 0,3 ml de una disolución de AHCC-FD (dosis 43 mg/Kg) desde el día 14 pre infección hasta la finalización del experimento. Los ratones del grupo control también recibieron el mismo volumen de líquido (agua de grifo) para someterlos a las mismas condiciones de estrés que el resto de los animales.

- ✓ **Parámetros inmunológicos:** se analizaron TNF, IFN- γ , interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17), mediante un ensayo multiplex citometric bead array, analizado por citometría de flujo (cytometer FACSCalibur E2295, Becton Dickinson).

3. Resultados

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL AHCC

3.1.1. Análisis organoléptico

La tabla 3 mostrada en la parte experimental (apartado 2.1.1.) muestra los resultados del análisis organoléptico realizado para las dos presentaciones diferentes de AHCC (FD y FG).

3.1.2. Cuantificación de AHCC mediante espectrofotometría

3.1.2.1. Validación del método espectrofotométrico

A continuación se detallan los resultados de la validación del método espectrofotométrico para cuantificar AHCC.

- **Selectividad**

La figura 33 muestra el gráfico del espectro del barrido de una muestra igual a 0,5 mg/ml preparada a partir de la mezcla placebo. La absorbancia a 275 nm fue de solo 0,008 U.A. Por lo tanto, debido al bajo valor de la intensidad de absorción de estos excipientes se puede concluir que no se ha observado ninguna interferencia.

- **Linealidad**

La tabla 8, nos presenta los resultados de absorbancias para las diferentes muestras evaluadas en esta validación. Los resultados de los estudios de linealidad se muestran en la tabla 9 y en la figura 34.

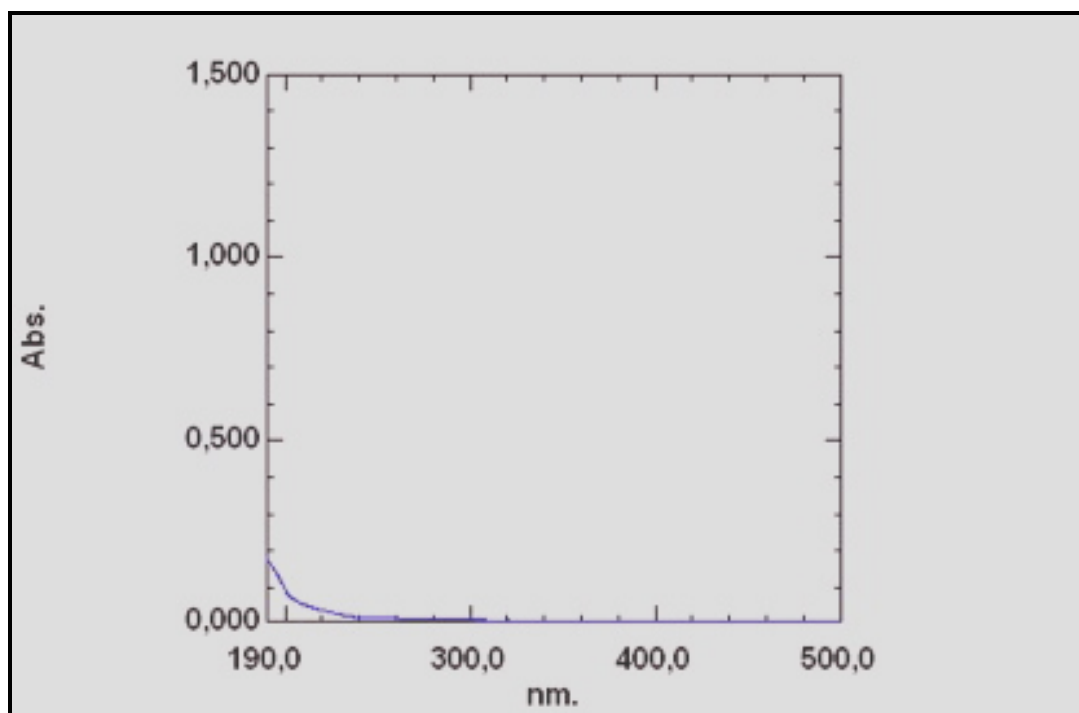


Figura 33. Muestra el espectro del barrido de la muestra placebo.

Tabla 8. Resultados de absorbancias para cada una de las muestras evaluadas.

| Concentraciones (mg/ml) | Muestras | | | | |
|----------------------------|----------|------------------------------------|-----------|----------|---------|
| | AHCC-FD | AHCC-FD- α Ciclodextrina | Muestra P | Cápsulas | AHCC-FG |
| | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 |
| 50 | 0,089 | 0,074 | 0,078 | 0,049 | 0,052 |
| 100 | 0,155 | 0,152 | 0,158 | 0,100 | 0,078 |
| 150 | 0,250 | 0,228 | 0,235 | 0,151 | 0,126 |
| 200 | 0,331 | 0,298 | 0,309 | 0,199 | 0,185 |
| 250 | 0,422 | 0,383 | 0,384 | 0,253 | 0,228 |
| 300 | 0,505 | 0,448 | 0,450 | 0,294 | 0,273 |
| 350 | 0,607 | 0,523 | 0,537 | 0,347 | 0,318 |
| 400 | 0,682 | 0,597 | 0,617 | 0,394 | 0,366 |
| 450 | 0,781 | 0,674 | 0,688 | 0,441 | 0,411 |
| 500 | 0,865 | 0,746 | 0,760 | 0,489 | 0,454 |
| 550 | 0,941 | 0,818 | 0,844 | 0,540 | 0,512 |

Tabla 9. Resultados de linealidad para cada una de las muestras analizadas.

| LINEALIDAD | | |
|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| | AHCC-FD | AHCC-FD- α Ciclodextrina |
| Ecuación de la recta | $y = a + bx$ | $y = a + bx$ |
| Ecuación de la recta | $A = -0,01098 + 0,00174C$ | $A = 0,00322 + 0,00149C$ |
| Intersección en el origen (a) | -0,01098182 | 0,00322424 |
| Pendiente (b) | 0,00174206 | 0,00148642 |
| Coeficiente de correlación (r) | 0,99969137 | 0,99992077 |

| LINEALIDAD | | | |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Muestra P | Cápsula | AHCC-FG |
| Ecuación de la recta | $y = a + bx$ | $y = a + bx$ | $y = a + bx$ |
| Ecuación de la recta | $A = 0,00362 + 0,00152C$ | $A = 0,00378 + 0,00097C$ | $A = 0,00569 + 0,00095C$ |
| Intersección en el origen (a) | 0,00361818 | 0,00377576 | 0,00569091 |
| Pendiente (b) | 0,00152067 | 0,00097418 | 0,00095436 |
| Coeficiente de correlación (r) | 0,99986605 | 0,99988824 | 0,99991764 |

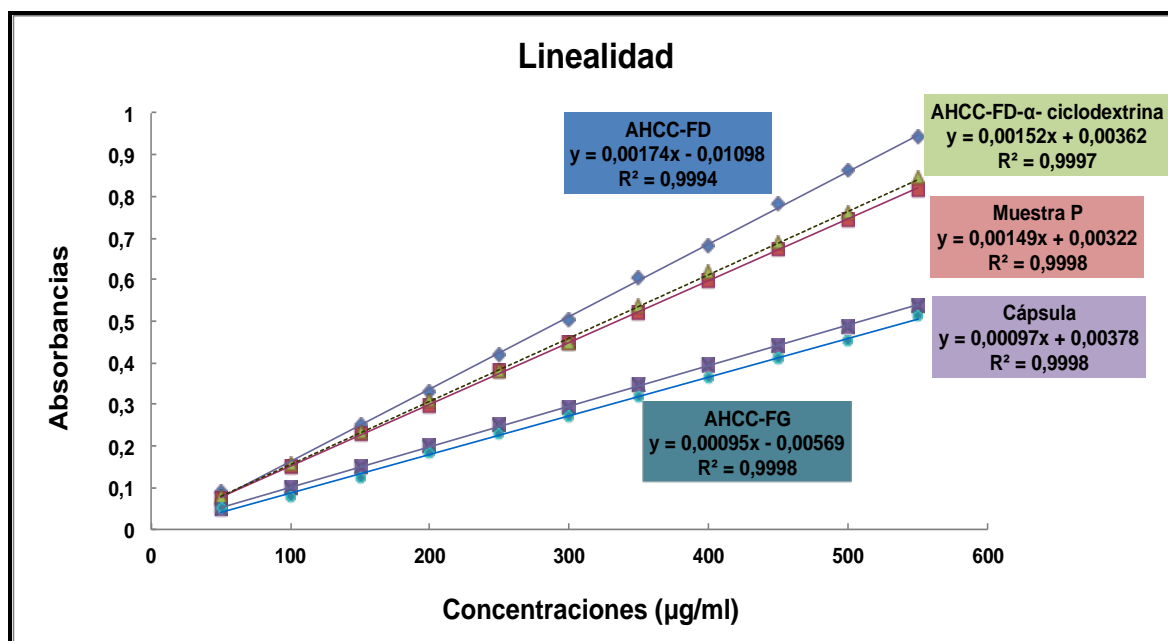


Figura 34. Resultados medios del ensayo de linealidad incluyendo los cuadrados de los coeficientes de correlación de Pearson para cada una de las muestras analizadas.

Los valores de los coeficientes de correlación son cercanos a la unidad, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Por lo tanto, el método se puede considerar lineal para las cinco muestras analizadas.

- **Precisión**

Repetibilidad y ensayo de cuantificación

La precisión intermedia se evaluó en las cinco muestras diferentes. Para cada muestra se preparó una concentración de 450 mg/ml y la absorbancia se ensayó seis veces, en 2 días consecutivos. El promedio de los resultados de la precisión inter día y el coeficiente de variación se muestran en la tabla 10. La cuantificación fue realizada tomando el AHCC-FD como referencia del 100% de pureza (Lote 84-0818-2).

Los valores del coeficiente de variación son inferiores al 2% por lo que el método tiene buenas características de repetibilidad entre días.

Para realizar los cálculos de precisión y exactitud se toma como estándar de referencia del 100% al AHCC-FD (materia prima). La figura 35, muestra la curva de calibrado de AHCC-FD (lote 84-0818-2).

Tabla 10. Resultados de precisión y cuantificación de las 5 muestras analizadas.

| Muestras | Absorbancias (U.A.) | Coefficiente de variación (%) | Cuantificación (%) |
|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------|
| AHCC-FD | 0,807 | 0,55 | 100 |
| AHCC-FD- α -ciclodextrina | 0,680 | 0,55 | 84,3 |
| Muestra P | 0,708 | 0,93 | 87,7 |
| Cápsula | 0,418 | 0,89 | 51,8 |
| AHCC-FG | 0,411 | 0,89 | 50,9 |

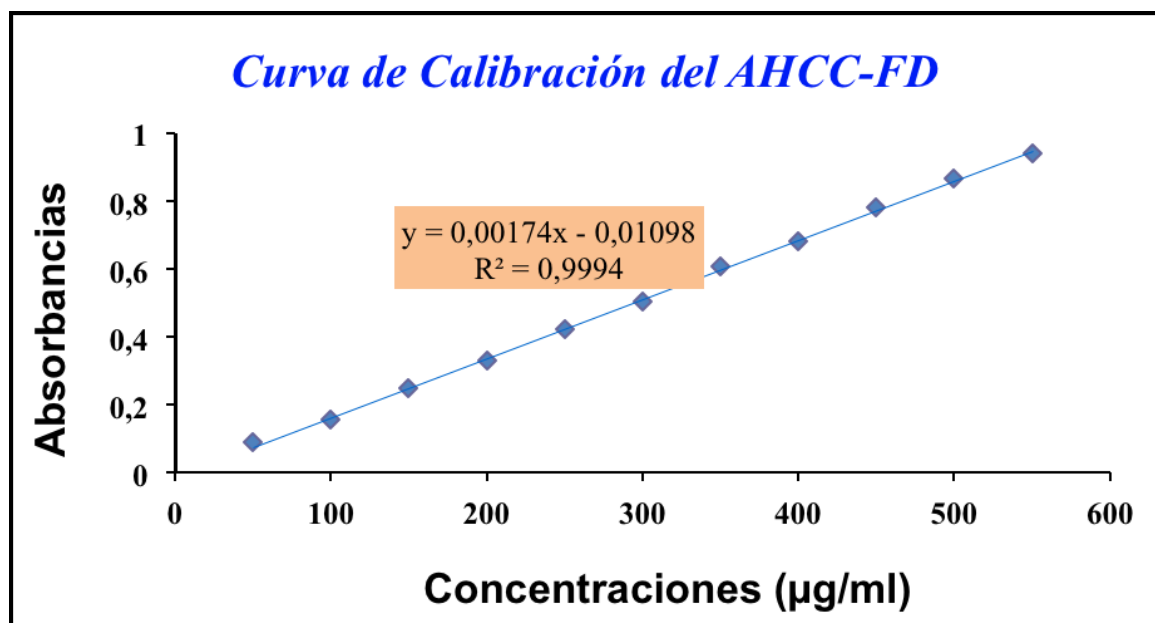


Figura 35. Curva de calibración del AHCC-FD, propuesta como estándar del 100% para cuantificar el AHCC.

- **Exactitud**

En la tabla 11 se muestran los resultados de exactitud expresados en porcentaje de recuperación de cada una de las muestras analizadas.

Los resultados son cercanos a $100 \pm 5\%$. El margen que se considera aceptable está entre 95% y 105%, por lo tanto podemos considerar que el método analítico nos ofrece una exactitud adecuada.

Tabla 11. Muestra los resultados de exactitud expresados en porcentaje de recuperación para cada una de las muestras analizadas.

| Muestras | % Teórico | % Práctico | % Recuperación (CV) |
|----------------------------------|-----------|------------|---------------------|
| AHCC-FD | 80 | 82,85 | 103,56 (0,34) |
| | 100 | 103,62 | 103,62 (0,33) |
| | 120 | 124,52 | 103,77 (0,16) |
| AHCC-FD- α -ciclodextrina | 80 | 79,89 | 99,87 (0,33) |
| | 100 | 100,39 | 100,39 (0,17) |
| | 120 | 116,88 | 97,4 (0,19) |
| Muestra P | 80 | 80,21 | 100,26 (0,49) |
| | 100 | 100,30 | 100,30 (0,22) |
| | 120 | 118,63 | 98,86 (0,36) |
| Cápsula | 80 | 77,75 | 97,18 (0,92) |
| | 100 | 99,55 | 99,55 (0,60) |
| | 120 | 120,07 | 100,06 (0,11) |
| AHCC-FG | 80 | 77,63 | 97,04 (1,10) |
| | 100 | 98,54 | 98,54 (0,14) |
| | 120 | 118,94 | 99,12 (0,61) |

- **Robustez**

Los resultados de la robustez los expresamos a través de los obtenidos con la adecuación del método para la cuantificación de los gránulos de AHCC-FG, donde estudiamos el efecto de añadir un agente surfactante y someter las muestras a calentamiento. Los resultados se muestran en la tabla 12.

La cuantificación se realizó con los datos mostrados en la figura 35, usando la ecuación de la recta de calibrado.

Tabla 12. Muestra los resultados de robustez para la formulación de AHCC-FG. Clave: SLS Sodio Lauril Sulfato.

| Minutos | Absorbancias | | C (µg/ml) | | C (%) | |
|-----------------------------------------------------------|--------------|---------|-----------|---------|---------|---------|
| | Sin SLS | con SLS | Sin SLS | Con SLS | Sin SLS | Con SLS |
| Condición 1 (30 min, agitación magnética) | 0,480 | 0,497 | 282,18 | 291,95 | 56,44 | 58,39 |
| | 0,478 | 0,495 | 281,03 | 290,80 | 56,21 | 58,16 |
| | 0,475 | 0,495 | 279,31 | 290,80 | 55,86 | 58,16 |
| Condición 1 + 30 min (Sonicado+calor) T: 42°C | 0,490 | 0,511 | 287,93 | 300,00 | 57,59 | 60,00 |
| | 0,491 | 0,512 | 288,51 | 300,57 | 57,70 | 60,11 |
| | 0,490 | 0,514 | 287,93 | 301,72 | 57,59 | 60,34 |
| Condición 1 + 60 min (Sonicado+calor) T: 54°C | 0,491 | 0,522 | 288,51 | 306,32 | 57,70 | 61,26 |
| | 0,490 | 0,523 | 287,93 | 306,90 | 57,59 | 61,38 |
| | 0,490 | 0,520 | 287,93 | 305,17 | 57,59 | 61,03 |
| Condición 1 + 90 min (Sonicado+calor) T: 64°C | 0,497 | 0,541 | 291,95 | 317,24 | 58,39 | 63,45 |
| | 0,498 | 0,542 | 292,53 | 317,82 | 58,51 | 63,56 |
| | 0,498 | 0,545 | 292,53 | 319,54 | 58,51 | 63,91 |

Hay diferencias estadísticamente significativas (t-Student, $P < 0,01$) entre los resultados. Es evidente que al adicionar el tensioactivo (SLS) al medio de disolución, aumentó la liberación en alrededor de un 5%. La concentración final obtenida es cercana al contenido teórico de AHCC en los gránulos de AHCC-FG. Los resultados muestran que el contenido de los gránulos se encuentra cerca del 60% (contenido teórico), debido a que los excipientes representan un 40% en el AHCC-FG. Por lo tanto, este método podría ser útil para una cuantificación simple del fino granulado de AHCC-FG. A efectos cuantitativos, es interesante el uso de

energía ultrasónica, porque esta energía permite mejorar la extracción y solubilización de hasta un 10% adicional a los valores obtenidos por agitación mecánica convencional, en el fino granulado de AHCC-FG.

La tabla 13, muestra los resultados promedios del ensayo realizado con las cápsulas conteniendo AHCC-FD, utilizando las tres condiciones descritas en la tabla.

Tabla 13. Muestra los resultados promedios de las tres condiciones del ensayo de extracción de AHCC-FD (día 1 de ensayo).

| Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) | Absorbancias $\lambda=275\text{ nm}$ | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| | Condición 1 (con SLS) + 30 min (Sonicado+calor) T: 42°C | Condición 2 = 1 (con SLS) + 60 min (Sonicado+calor) T: 54°C | Condición 3 = 1 (con SLS) + 90 min (Sonicado+calor) T: 64°C |
| 100 | 0,017 | 0,027 | 0,037 |
| 150 | 0,068 | 0,090 | 0,098 |
| 200 | 0,114 | 0,121 | 0,145 |
| 250 | 0,167 | 0,179 | 0,201 |
| 300 | 0,232 | 0,230 | 0,255 |
| 350 | 0,250 | 0,287 | 0,312 |
| 400 | 0,324 | 0,346 | 0,371 |
| 450 | 0,381 | 0,395 | 0,428 |
| 500 | 0,430 | 0,459 | 0,485 |
| 550 | 0,483 | 0,508 | 0,556 |
| 600 | 0,537 | 0,560 | 0,604 |

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos al día siguiente. Los resultados obtenidos en el día 1 se compararon con los resultados obtenidos en el día 2 por una prueba t de Student (Excel, Microsoft Office 2008) y no se observaron diferencias estadísticas ($P=0,49$) entre los resultados obtenidos en el día 1 y los resultados obtenidos en el día 2. Sin embargo, cuando los resultados obtenidos

utilizando las condiciones 1 se compararon con los obtenidos en las condiciones 3 si se observaron diferencias significativas ($P < 0,001$) hasta un contenido de 10% adicional se obtuvo mediante el uso de la energía ultrasónica con las cápsulas de AHCC-FD, un valor muy similar al obtenido con los gránulos de AHCC-FG.

Tabla 14. Se muestran los resultados obtenidos al realizar el mismo ensayo de extracción de AHCC-FD al día siguiente (día 2 de ensayo) en las tres condiciones estudiadas de extracción.

| Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancias $\lambda=275\text{nm}$ | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| | Condición 1 (con SLS) + 30 min (Sonicado+calor) T: 42°C | Condición 2 = 1 (con SLS) + 60 min (Sonicado+calor) T: 42°C | Condición 3 = 1 (con SLS) + 90 min (Sonicado+calor) T: 42°C |
| 100 | 0,023 | 0,029 | 0,029 |
| 150 | 0,057 | 0,066 | 0,092 |
| 200 | 0,132 | 0,112 | 0,142 |
| 250 | 0,186 | 0,191 | 0,199 |
| 300 | 0,238 | 0,214 | 0,256 |
| 350 | 0,298 | 0,270 | 0,313 |
| 400 | 0,350 | 0,320 | 0,374 |
| 450 | 0,410 | 0,368 | 0,430 |
| 500 | 0,462 | 0,434 | 0,483 |
| 550 | 0,517 | 0,487 | 0,553 |
| 600 | 0,564 | 0,572 | 0,602 |

3.2. DESARROLLO DE FORMULACIONES ORALES DE AHCC

3.2.1. Cápsulas de AHCC

3.2.1.1. Mezcla directa a encapsular

Al realizar el análisis de la mezcla directa que formulamos para encapsular 100 cápsulas número "1" de HPMC opacas conteniendo AHCC-FD, obtuvimos los siguientes resultados:

- ✓ $Tg\alpha = (3,2)/(4,8) = 0,67 \rightarrow \alpha = 33,7^\circ$ (con agitación).
No presenta buenas propiedades de flujo y fluye solo con agitación.
- ✓ $V_0 = 74$ ml
- ✓ $V_{1250} = 55$ ml
- ✓ Índice de Carr (%) = $[(\rho_{\text{apelmazada}} - \rho_{\text{aparente}}) \times 100] / \rho_{\text{apelmazada}}$
Índice de Carr (%) = 25,7%
- ✓ Índice de Hausner = $[(\rho_{\text{apelmazada}}) \times 100] / \rho_{\text{aparente}}$
- ✓ Índice de Hausner = 1,33

La mezcla directa a encapsular presenta un índice de Carr de 25,7 que nos indica que el flujo de nuestra mezcla es malo, que necesitamos incorporar un deslizante para mejorar la capacidad de flujo de la mezcla. El índice de Hausner está por encima de 1,25 lo que nos indica un flujo de la mezcla inadecuado.

- **Fórmula mejorada a encapsular**

El análisis de la fórmula mejorada que planteamos para cápsulas presentó los siguientes resultados:

- ✓ Mezcla homogénea y de buen aspecto, que difiere mucho de la anterior.
- ✓ Presenta mejor propiedad de flujo que la formulación preliminar.
- ✓ $\alpha = 31^\circ$
- ✓ $V_0 = 97$ ml

- ✓ $V_{1250} = 74 \text{ ml}$
- ✓ $\rho \text{ aparente} = 0,526 \text{ g/ml}$
- ✓ $\rho \text{ apelmazada} = 0,690 \text{ g/ml}$
- ✓ Índice de Carr: 23,77%
- ✓ Índice de Hausner: 1,31

Esta mezcla presenta un aspecto uniforme y un flujo mejor que la formulación anterior pero que aún así se debe mejorar con la adición de un deslizante para obtener un flujo más aceptable.

El peso promedio de 10 cápsulas número "1" vacías es 75,34 mg. El peso promedio de 10 cápsulas número "1" conteniendo la formulación es: 386,68 mg.

Las tablas 15 y 16, muestran los resultados del análisis de granulometría del AHCC-FD (lote 84-0818-2 y E93-0706-2).

Según los resultados del análisis de granulometría para las muestras de AHCC-FD de diferentes lotes, la fracción mayoritaria de partículas del polvo liofilizado está comprendida entre (0,100-0,125) para el lote 84-0818-2 y (0,125-0,199; 0,199-0,297) para el lote E93-0706-2 de AHCC-FD respectivamente.

Tabla 15. Resultado del análisis de granulometría.

| AHCC-FD (lote 84-0818-2) | | | | | |
|--------------------------|----------------|----------------|-----------------------|------------|----------------------|
| Luz de malla (mm) | Peso vacío (g) | Peso lleno (g) | Cantidad retenida (g) | % retenido | % retenido acumulado |
| < 0.040 | 73,61 | 75,88 | 2,27 | 4,7920608 | 4,79 |
| 0,040-0,100 | 77,67 | 89,45 | 11,78 | 24,868051 | 29,66 |
| 0,100-0,125 | 79,96 | 98,21 | 18,25 | 38,52648 | 68,19 |
| 0,125-0,199 | 73,95 | 87,10 | 13,15 | 27,760176 | 95,95 |
| 0,199-0,297 | 74,76 | 76,47 | 1,71 | 3,6098784 | 99,56 |
| 0,297-0,350 | 78,50 | 78,55 | 0,05 | 0,105552 | 99,66 |
| 0,350-0,500 | 79,00 | 79,08 | 0,08 | 0,1688832 | 99,83 |
| 0,500-0,710 | 79,16 | 79,18 | 0,02 | 0,0422208 | 99,87 |
| >0,710 | 89,51 | 89,57 | 0,06 | 0,1266624 | 99,99 |
| | | Total | 47,37 | 99,999965 | |

Tabla 16. Resultado del análisis de granulometría.

| AHCC-FD (lote E93-0706-2) | | | | | |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------------|------------|----------------------|
| Luz de malla (mm) | Peso vacío (g) | Peso lleno (g) | Cantidad retenida(g) | % retenido | % retenido acumulado |
| < 0,040 | 73,61 | 73,667 | 0,057 | 0,139821 | 0,139 |
| 0,040-0,100 | 77,67 | 78,489 | 0,819 | 2,009007 | 2,148 |
| 0,100-0,125 | 79,96 | 84,720 | 4,760 | 11,67628 | 13,82 |
| 0,125-0,199 | 73,95 | 88,300 | 14,35 | 35,20055 | 49,01 |
| 0,199-0,297 | 74,76 | 89,710 | 14,95 | 36,67235 | 85,68 |
| 0,297-0,350 | 78,50 | 82,920 | 4,420 | 10,84226 | 96,53 |
| 0,350-0,500 | 79,00 | 9,438 | 0,438 | 1,074414 | 97,6 |
| 0,500-0,710 | 79,16 | 79,745 | 0,585 | 1,434024 | 99,02 |
| >0,710 | 89,51 | 89,892 | 0,382 | 0,937046 | 99,97 |
| | | Total | 40,7606 | | |

3.2.1.2. Granulado con etanol

El análisis correspondiente de los granulados elaborados a partir de las tres fórmulas propuestas para realizar granulaciones con etanol, presenta los resultados que se muestran en la tabla 17. Las formulaciones con las condiciones G1, G3, G5 y G7 se descartaron por cambio de coloración.

Tabla 17. Resultados de los granulados con etanol elaborados.

| Granulados | V _f (g/s) | Volumen aparente (ml) | Volumen apelmazado (20 golpes) (ml) | Humedad (% de pérdida de peso por deseccación) |
|------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| G2 | 4,67 | 36 | 34 | 2,22 |
| G4 | 3,50 | 18 | 16 | 4,06 |
| G6 | 4,67 | 38 | 35 | 4,50 |
| G8 | 4,67 | 38 | 33 | 4,63 |
| G9 | 7,50 | 35 | 30 | 4,32 |
| G10 | 5,0 | 39 | 31 | 3,89 |

El análisis del tamaño de partícula por granulometría (tabla 18), nos indica que la fracción mayoritaria de partículas de los granulados está comprendida entre 0,840 y 1,19 mm.

Tabla 18. Fracciones de tamaño mayoritarias obtenidas con los diferentes granulados elaborados con etanol.

| Granulados | Luz de malla (mm) con mayor porcentaje retenido |
|------------|----------------------------------------------------|
| G2 | (0,840-1,190) |
| G4 | (0,210-0,350) y (0,840-1,190) |
| G6 | (0,840-1,190) |
| G8 | (0,840-1,190) |
| G9 | (0,840-1,190) |
| G10 | (0,210-0,350) y (0,840-1,190) |

3.2.1.3. Estudio de estabilidad de cápsulas con AHCC

A través del estudio de estabilidad de cápsulas conteniendo AHCC-FD, comparamos la formulación desarrollada y encapsulada en cápsulas número “1” de HPMC blancas, con la formulación hidrófoba japonesa (AHCC-FG) contenida en cápsulas de HPMC incoloras, fabricada por un laboratorio en Madrid bajo la supervisión de Amino Up Chemical. Además, este estudio de estabilidad nos permitió comparar tres tipos de cápsula (cápsulas de gelatina dura incolora, cápsulas de HPMC incoloras y cápsulas de HPMC blancas) todas del mismo tamaño.

La diferencia entre los resultados obtenidos se relaciona con el tipo de cápsula que contiene la formulación. Los resultados de las características estudiadas en diferentes tiempos de muestreo son los siguientes:

- **Aspecto**

La figura 36 (que incluye A, B y C) muestra el aspecto del contenido de las cápsulas después de 15 días de estar sometidas a una HR 75% \pm 5% y temperatura de 30°C \pm 2°C. Asimismo, la figura 37 (que incluye A, B y C) muestra el aspecto del

contenido y el estado de las cápsulas que lo contienen, también después de 15 días de estar sometidas a una HR $96\% \pm 5\%$ y temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Es evidente que sin un aislamiento eficiente del medio ambiente, es decir que las cápsulas estén dispuestas en su respectivo envase primario, tal como un bote de plástico con tapón rosca, blíster de aluminio o un sobre de aluminio - aluminio, el polvo liofilizado de AHCC (AHCC-FD), presenta un proceso de degradación rápida captando la humedad del medio, lo que ocasiona un apelmazamiento del contenido y se forma un aglomerado más oscuro. Este proceso de degradación ocurrió en las dos condiciones ambientales estudiados (HR: $75\% \pm 5\%$ y $96\% \pm 5\%$, T: $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), después de solo dos semanas el producto fue claramente degradado como podemos observar en las figuras 36 y 37, respectivamente. Por lo tanto, es un punto crítico escoger el envase primario ideal, que presente las características óptimas para detener de manera eficiente la degradación observada en las cápsulas sin estar contenidas en su respectivo envase primario. Ninguna de las cápsulas evaluadas fue capaz de evitar el proceso de degradación del contenido (apelmazamiento, aglomeramiento, cambio de coloración), que inicialmente presentaba características óptimas de fluidez. Los dos tipos de cápsulas de HPMC (blancas o incoloras) presentaron un contenido apelmazado pero son las de primera elección en comparación a las cápsulas de gelatina dura incoloras que mostraron un contenido cuyo aspecto fue peor que las cápsulas de HPMC.

En la figura 36 A, podemos observar que el contenido está más apelmazado y presenta un color más oscuro que las figuras 36 B y C (muestra el contenido en cápsulas de HPMC blancas e incoloras, respectivamente). El mismo efecto se observó en la figura 37 (A, B y C), donde observamos un mayor apelmazamiento del contenido y cambio en la coloración en la figura 37 A, que corresponde a las cápsulas de gelatina dura incoloras, siendo las demás (37 B y C, las correspondientes a cápsulas de HPMC).

Por otra parte, en relación con la propia cápsula de HPMC, estas cápsulas son menos frágiles de las cápsulas de gelatina. Las cápsulas de gelatina con alto contenido de HR ($96\% \pm 5\%$) se adhieren al contenido mientras que en las cápsulas

de HPMC el contenido se podía sacar de la cápsula con la ayuda de una espátula (figura 38 A, B y C).

Además, el efecto de degradación es mayor en las condiciones de estudio donde el producto está sometido a una HR extrema ($96\% \pm 5\%$), expuestas durante 45 días, tal como se muestra en la figura 38 (A, B y C). En estas condiciones extremas, las cápsulas de gelatina al abrirlas para evaluar su contenido no pudieron permanecer intactas, mientras que las cápsulas de HPMC se abrieron fácilmente para después evaluar el aspecto de su contenido.

Con estos resultados, se puede concluir que las cápsulas de HPMC son ideales para contener formulaciones de AHCC y la propia cápsula de HPMC soporta mejor las condiciones de estabilidad extremas a diferencia de las cápsulas de gelatina dura. Siendo, la opción ideal para contener el producto las cápsulas de HPMC blancas (opacas), porque enmascararía mejor una posible degradación del contenido que las cápsulas de HPMC incoloras o translúcidas.

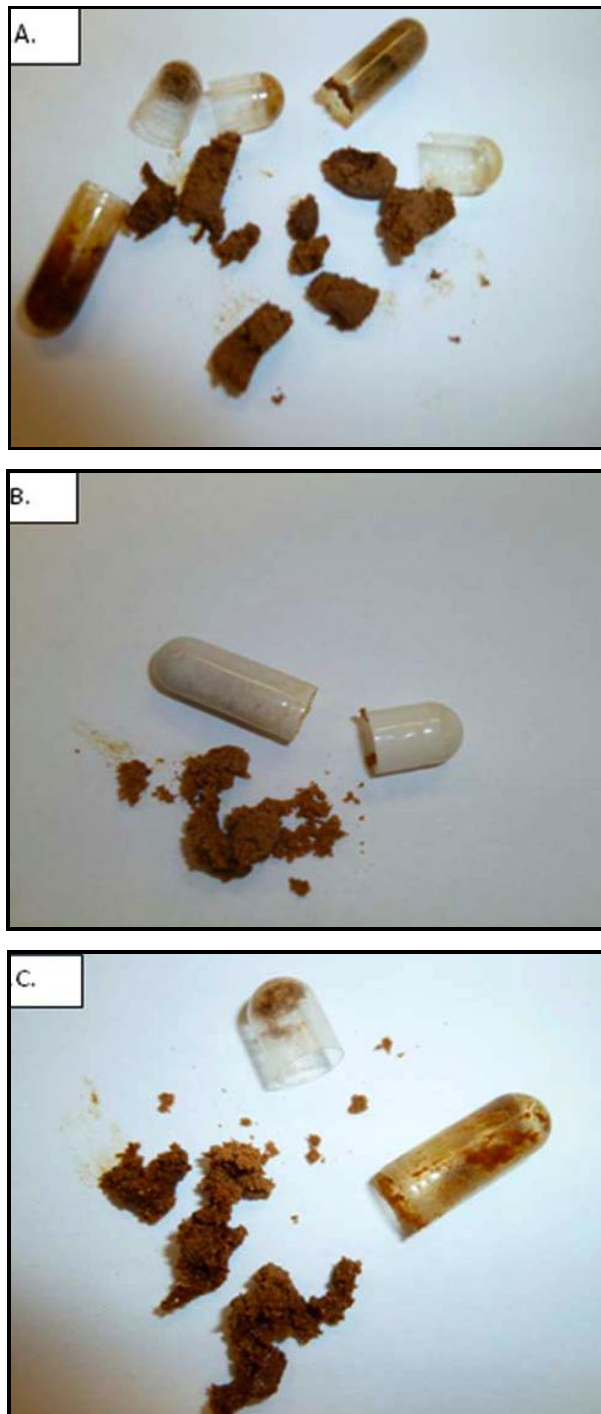


Figura 36. Efecto de la HR ($75\% \pm 5\%$) y T ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante 15 días en cápsulas convencionales de gelatina dura incolora (A.), cápsulas de HPMC blancas (B.) y cápsulas de HPMC incoloras o translúcidas (C.).



Figura 37. Efecto de la HR ($96\% \pm 5\%$) y T ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante 15 días en cápsulas convencionales de gelatina dura incolora (A.), cápsulas de HPMC blancas (B.) y cápsulas de HPMC incoloras o translúcidas (C.).



Figura 38. Efecto de la HR ($96\% \pm 5\%$) y T ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante 45 días en cápsulas convencionales de gelatina dura incolora (A.), cápsulas de HPMC blancas (B.) y cápsulas de HPMC incoloras o translúcidas (C.).

- **Contenido de humedad (% pérdida de peso por desecación)**

La tabla 19, muestra el contenido de humedad del AHCC (medido como la pérdida de peso por desecación) en cápsulas de gelatina y HPMC, almacenadas a una HR de 75% ($\pm 5\%$) y temperatura de 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), durante un periodo de 15 días.

Tabla 19. Pérdida de peso por desecación del contenido de AHCC en las diferentes cápsulas evaluadas (resultado promedio y la desviación estándar, $n=3$), condiciones de HR (75% $\pm 5\%$) y temperatura (30°C $\pm 2^\circ\text{C}$).

| Tiempo (días) | Cápsulas de gelatina incoloras | Cápsulas de HPMC blancas | Cápsulas de HPMC incoloras |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 | 1,72 \pm 0,6 | 1,72 \pm 0,6 | 1,72 \pm 0,6 |
| 2 | 2,36 \pm 0,6 | 3,28 \pm 0,6 | 2,65 \pm 0,6 |
| 4 | 1,91 \pm 0,2 | 2,02 \pm 0,07 | 2,03 \pm 0,04 |
| 9 | 2,02 \pm 0,13 | 1,8 \pm 0,2 | 1,92 \pm 0,14 |
| 15 | 1,99 \pm 0,06 | 2,00 \pm 0,04 | 1,79 \pm 0,27 |

A continuación la tabla 20 muestra el contenido de humedad del AHCC dentro de los diferentes tipos de cápsulas almacenadas en condiciones extremas de HR 96% ($\pm 5\%$) y temperatura 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante un periodo de 45 días.

De los resultados obtenidos, es importante destacar que la absorción de agua no se puede correlacionar directamente con la degradación observada en el contenido de las cápsulas (apelmazamiento, color más oscuro), porque si observamos la figura 39 A, el contenido de las cápsulas de gelatina está degradado (contenido apelmazado, con un color más oscuro) a los 15 días de experimento presentando una pérdida de peso por desecación de 1,99 \pm 0,06 que no difiere mucho del valor inicial de 1,72 \pm 0,6 (véase tabla 20).

Tabla 20. Pérdida de peso por desecación del contenido de las cápsulas (resultado promedio y la desviación estándar, n=3), condiciones de HR de 96% ($\pm 5\%$) y temperatura 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

| Tiempo (días) | Cápsulas de gelatina incoloras | Cápsulas de HPMC blancas | Cápsulas de HPMC incoloras |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 | 1,72 \pm 0,6 | 1,72 \pm 0,6 | 1,72 \pm 0,6 |
| 1 | 2,95 \pm 0,01 | 2,33 \pm 0,56 | 2,96 \pm 0,01 |
| 2 | 2,97 \pm 0,98 | 2,91 \pm 1,26 | 3,01 \pm 0,03 |
| 4 | 2,83 \pm 0,26 | 2,35 \pm 0,58 | 2,68 \pm 0,56 |
| 9 | 2,03 \pm 0,12 | 2,01 \pm 0,03 | 2,01 \pm 0,04 |
| 15 | 2,09 \pm 0,17 | 1,70 \pm 0,22 | 2,00 \pm 0,05 |
| 24 | 2,00 \pm 0,40 | 1,85 \pm 0,30 | 1,93 \pm 0,16 |
| 45 | 2,15 \pm 0,26 | 2,54 \pm 0,23 | 2,37 \pm 0,12 |

En vista de los resultados del contenido de humedad, es importante mencionar que inicialmente el contenido en las diferentes cápsulas capta humedad de las condiciones a las cuáles está sometido hasta que llega a un punto de equilibrio donde ya no absorbe agua y se mantiene constante. Si observamos la figura 39 (A, B y C), podemos ver claramente la degradación que sufre el contenido de las cápsulas durante los 45 días mantenidas a condiciones de estabilidad extremas. Pero basta solo con un día en condiciones extremas para que el contenido presente una degradación en su aspecto (apelmazándose y cambiando de coloración).

En relación con las propias cápsulas que utilizamos para nuestros ensayos de estabilidad en la tabla 21 mostramos los resultados de un análisis del contenido de humedad de cápsulas vacías de gelatina, HPMC blancas y HPMC incoloras almacenadas en condiciones de humedad extrema de 96% ($\pm 5\%$) y temperatura 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 17 días. En esta tabla podemos observar que el contenido inicial de agua en las cápsulas de gelatina es casi el doble que el de las cápsulas de HPMC y ambos tipos de cápsulas captan humedad ambiental hasta un valor similar (8-9%). El contenido de agua presente en las cápsulas es importante porque el agua puede migrar desde la cubierta (cápsula en sí) al interior (contenido de la cápsula),

ésto puede explicar el comportamiento más frágil de las cápsulas de gelatina en comparación con las cápsulas de HPMC.

Tabla 21. Contenido de humedad en cápsulas vacías.

| Tiempo (días) | Cápsulas de gelatina incoloras | Cápsulas de HPMC blancas | Cápsulas de HPMC incoloras |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 | 7,04 | 4,0 | 4,02 |
| 1 | 7,98 | 7,55 | 7,98 |
| 6 | 8,02 | 8,03 | 8,06 |
| 17 | 8,12 | 8,61 | 8,70 |

Por lo tanto, podemos establecer que la pérdida de peso por desecación no es un buen parámetro con el cuál se pueda correlacionar la degradación del contenido de AHCC en los diferentes tipos de cápsulas ensayadas.

- **Ensayo de disgregación**

La tabla 22 muestra los resultados de disgregación realizado a las cápsulas con AHCC almacenadas en las siguientes condiciones HR de 75% (\pm 5%) y temperatura de 30°C (\pm 2°C).

Tabla 22. Resultados del ensayo de disgregación (minutos).

| Tiempo (días) | Cápsulas de gelatina incoloras | Cápsulas de HPMC blancas | Cápsulas de HPMC incoloras |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 | 30,4 | 30,5 | 29,6 |
| 15 | 35,4 | 29,2 | 27,2 |

El tiempo de disgregación especificado para cápsulas (Farmacopea Europea 6,0; p.718, 2008) es menos de 30 minutos. Según nuestros resultados las cápsulas estarían fuera del límite de la especificación. Las cápsulas de gelatina conteniendo el producto a los 15 días aumentan el tiempo de disgregación, en cambio las cápsulas de HPMC mantienen el tiempo de disgregación inicial. Esto nos indica que

las cápsulas de HPMC tienen un comportamiento más estable que las cápsulas de gelatina.

Si consideramos como criterio para determinar el tiempo de disgregación el tiempo necesario para que se forma una masa blanda en lugar de la disgregación completa (Farmacopea Europea 6,3; 2009), entonces los tiempos de disgregación descritos en la tabla 22, serían menores. Al repetir el ensayo de disgregación pero utilizando este criterio de tiempo de disgregación y con discos los tiempos obtenidos para cápsulas con AHCC mantenidas en condiciones de estabilidad extrema se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Ensayo de disgregación con cápsulas de AHCC en estabilidad de HR de 96% ($\pm 5\%$) y temperatura de 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) almacenadas durante 45 días.

| Tiempo (días) | Cápsulas de gelatina incoloras | Cápsulas de HPMC blancas | Cápsulas de HPMC incoloras |
|---------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 0 | 21,5 | 20,0 | 15,7 |
| 45 | 36,8 | 13,2 | 13,2 |

Los resultados obtenidos en la tabla 23 confirman nuevamente que el tiempo de disgregación de las cápsulas de HPMC es más rápido que el de las cápsulas de gelatina conteniendo AHCC (véase tabla 22), cumpliendo la especificación de la farmacopea. Observamos que el tiempo de disgregación para las cápsulas de HPMC es menor en las dos condiciones de estabilidad ensayadas. Por lo tanto, en relación a las características de disgregación, las cápsulas de HPMC cumplen las especificaciones y presentan una disgregación rápida en comparación con las cápsulas de gelatina.

Estos resultados del estudio de estabilidad de las cápsulas con AHCC nos permiten afirmar que tanto en aspecto y disgregación las cápsulas de HPMC son mejores que las cápsulas de gelatina dura para contener el producto, siendo un indicador óptimo de estabilidad el aspecto que presentan las cápsulas.

Asimismo, es importante comentar que las cápsulas con AHCC almacenadas en un frasco de vidrio opaco con tapón rosca de plástico, en condiciones ambientales durante más de 4 años presentan una degradación de su contenido, el granulado inicial de color marrón con flujo libre ha cambiado a un producto aglomerado, duro de color marrón muy oscuro, esto se debe a la reacción de Maillard que sufre el producto con el transcurso del almacenamiento (figura 39).



Figura 39. Aspecto de las cápsulas hidrófilas almacenados en condiciones ambientales durante más de 4 años.

3.2.2. Comprimidos con AHCC

Los resultados de los comprimidos elaborados con AHCC se detallan a continuación:

3.2.2.1. Primera fórmula

Las características farmacotécnicas de los comprimidos obtenidos con esta formulación se detallan en el apartado 2.2.2.1. de este trabajo. El principal inconveniente de estos comprimidos es que tardan en disgregar más de 20 minutos.

3.2.2.2. Segunda fórmula

En la tabla 24 se detallan los pesos (g) de los comprimidos (C) elaborados utilizando la segunda fórmula.

Tabla 24. Detalla el peso en gramos de los 40 comprimidos elaborados.

| C | Pesos | C | Pesos | C | Pesos | C | Pesos |
|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| P1 | 1,249 | P11 | 1,290 | P21 | 1,300 | P31 | 1,330 |
| P2 | 1,247 | P12 | 1,285 | P22 | 1,320 | P32 | 1,300 |
| P3 | 1,298 | P13 | 1,310 | P23 | 1,335 | P33 | 1,310 |
| P4 | 1,350 | P14 | 1,325 | P24 | 1,350 | P34 | 1,350 |
| P5 | 1,340 | P15 | 1,352 | P25 | 1,355 | P35 | 1,351 |
| P6 | 1,332 | P16 | 1,360 | P26 | 1,342 | P36 | 1,340 |
| P7 | 1,325 | P17 | 1,350 | P27 | 1,338 | P37 | 1,330 |
| P8 | 1,350 | P18 | 1,300 | P28 | 1,300 | P38 | 1,326 |
| P9 | 1,362 | P19 | 1,322 | P29 | 1,312 | P39 | 1,300 |
| P10 | 1,350 | P20 | 1,344 | P30 | 1,320 | P40 | 1,310 |

En total hicimos 40 comprimidos masticables con sabor ligeramente a café, de óptima resistencia a la fractura y aspecto. Evaluamos las características de espesor, longitud y altura de 20 comprimidos y los resultados se muestran en la tabla 25.

Los comprimidos elaborados con esta segunda formulación tienen un tiempo de disgregación promedio de 17,3 minutos.

Tabla 25. Resultados de espesor, longitud y altura de los comprimidos de la segunda fórmula.

| Comprimidos | Espesor (mm) | Longitud (mm) | Altura (mm) |
|-------------|--------------|---------------|-------------|
| C1 | 10,02 | 20,62 | 7,72 |
| C2 | 10,02 | 20,61 | 7,70 |
| C3 | 10,03 | 20,64 | 7,74 |
| C4 | 10,02 | 20,64 | 7,73 |
| C5 | 10,02 | 20,60 | 7,72 |
| C6 | 10,02 | 20,63 | 7,72 |
| C7 | 10,02 | 20,61 | 7,73 |
| C8 | 10,04 | 20,64 | 7,72 |
| C9 | 10,02 | 20,62 | 7,72 |
| C10 | 10,02 | 20,60 | 7,73 |
| C11 | 10,01 | 20,62 | 7,73 |
| C12 | 10,02 | 20,63 | 7,70 |
| C13 | 10,02 | 20,60 | 7,72 |
| C14 | 10,02 | 20,61 | 7,74 |
| C15 | 10,02 | 20,62 | 7,70 |
| C16 | 10,01 | 20,64 | 7,71 |
| C17 | 10,01 | 20,62 | 7,72 |
| C18 | 10,01 | 20,61 | 7,72 |
| C19 | 10,00 | 20,60 | 7,70 |
| C20 | 10,00 | 20,62 | 7,71 |

3.2.2.3. Tercera fórmula

Los resultados de los pesos de los comprimidos elaborados con esta formulación se muestran en la tabla 26.

Los comprimidos elaborados con esta tercera fórmula tienen un tiempo de disgregación promedio de 14,2 minutos. Al aumentar la cantidad de disgregante conseguimos comprimidos que disgregan bastante rápido. Al almacenar estos comprimidos en frascos de vidrio topacio con tapón rosca a temperatura ambiente,

al cabo de un par de meses captan humedad y adquieren un color más oscuro que el inicial, posiblemente debido a una reacción de Maillard, que está relacionada con el tiempo de almacenamiento de las muestras. Además la resistencia a la fractura aumenta y esto hace difícil masticarlos. El envase primario ideal para comprimidos sería bolsas de aluminio con cierre hermético.

Tabla 26. Peso en gramos de los comprimidos elaborados de la tercera fórmula.

| Comprimidos | Pesos | Comprimidos | Pesos |
|-------------|-------|-------------|-------|
| P1 | 1,340 | P11 | 1,336 |
| P2 | 1,332 | P12 | 1,347 |
| P3 | 1,378 | P13 | 1,340 |
| P4 | 1,350 | P14 | 1,352 |
| P5 | 1,348 | P15 | 1,350 |
| P6 | 1,352 | P16 | 1,325 |
| P7 | 1,355 | P17 | 1,362 |
| P8 | 1,350 | P18 | 1,340 |
| P9 | 1,360 | P19 | 1,350 |
| P10 | 1,350 | P20 | 1,353 |

3.2.3. Sobres con AHCC

Los resultados de las características farmacotécnicas de las cuatro mezclas distintas y de sus respectivos granulados se recogen respectivamente en las tablas 27 (mezclas) y 28 (granulados).

De todas las mezclas elaboradas solo la M1 fluye, las demás son mezclas excesivamente cohesivas que no fluyen adecuadamente. Se concluye que la mezcla que presenta óptimas características es la M1.

Con relación a los granulados es el G1 el que presenta las mejores características farmacotécnicas y organolépticas, seguido del G4. En cuanto a su solubilidad en agua, el G1 y el G4 presentan buena solubilidad y forman una disolución de buen aspecto en agua. Los granulados G2 y G3 forman un precipitado y cuesta más su disolución en agua. Los granulados disueltos en agua presentan un sabor ligeramente a café, el G4 tiene un sabor dulce, ninguno de los granulados dejan residuos. Todos presentan buena dispersión en agua (hidrófilos). El G4 es el que presenta las mejor fluidez.

Tabla 27. Características farmacotécnicas de las mezclas elaboradas.

| Mezclas | Aspecto | V _f (g/s) | α | Pérdida de peso (%) (n=3) |
|---------|-----------|----------------------|-----------------|------------------------------|
| M1 | homogéneo | 8,43 | 29,1 | 2,96 |
| M2 | homogéneo | no fluye | mezcla cohesiva | 3,03 |
| M3 | homogéneo | no fluye | mezcla cohesiva | 3,05 |
| M4 | homogéneo | no fluye | mezcla cohesiva | 4,68 |

Tabla 28. Características farmacotécnicas de los granulados elaborados.

| Mezclas | Aspecto | V _f (g/s) | α | Pérdida de peso (%) (n=3) |
|---------|-----------|----------------------|----------|------------------------------|
| G1 | homogéneo | 4,13 | 32,5° | 2,98 |
| G2 | homogéneo | 4,75 | 37,5° | 2,04 |
| G3 | homogéneo | 8,50 | 27° | 2,04 |
| G4 | homogéneo | 8,75 | 22,8° | 3,00 |

En cuanto al análisis de granulometría realizado a los granulados elaborados, los granulados G1, G2 y G3 presentan el mayor porcentaje de partículas retenidas entre la fracción de tamaño 0,840 - 1,190 mm y el G4 tiene el mayor porcentaje de partículas retenidas entre 0,210 - 0,350 mm.

3.2.3.1. Primeros estudios de estabilidad de las formulaciones de sobres

Los resultados de los estudios iniciales de estabilidad realizados a las cuatro formulaciones de mezclas con sus respectivos granulados (M1, M2, M3, M4 y G1, G2, G3, G4) se muestran en las tablas 29-35.

Tabla 29. Resultados del contenido de humedad antes de iniciar el estudio.

| Muestras | Pérdida de peso (%) | | | |
|----------|---------------------|------|------|------|
| M1 | 2,98 | 2,94 | 2,95 | 2,96 |
| G1 | 3,00 | 2,95 | 2,99 | 2,98 |
| M2 | 2,97 | 3,04 | 3,09 | 3,03 |
| G2 | 1,96 | 2,03 | 2,05 | 2,01 |
| M3 | 3,05 | 3,06 | 3,05 | 3,05 |
| G3 | 1,99 | 2,04 | 2,05 | 2,03 |
| M4 | 5,02 | 5,07 | 3,94 | 4,68 |
| G4 | 2,97 | 3,02 | 3,00 | 3,00 |

Tabla 30. Resultados del contenido de humedad de las mezclas envasadas en bolsas de plástico.

| TIEMPO (DÍAS) | HR 75% ($\pm 5\%$) y temperatura 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) | | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|------|------|------|
| | PLÁSTICO | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 |
| 0 | 2,96 | 3,03 | 3,05 | 4,68 |
| 2 | 3,64 | 4,36 | 3,99 | 3,68 |
| 8 | 3,97 | 6,32 | 5,30 | 5,37 |
| 16 | 4,87 | 5,80 | 5,75 | 5,68 |
| 43 | 5,66 | 9,46 | 9,21 | 8,40 |

En la tabla 30, observamos como las mezclas almacenadas en pequeñas bolsas de plástico captan humedad, originando mezclas humedecidas y apelmazadas, siendo mayor la captación de agua cuanto más días estén las muestras sometidas a las condiciones del estudio de estabilidad. En la tabla 31, se recogen los resultados de las muestras envasadas en sobres de aluminio herméticamente selladas con calor.

Tabla 31. Resultados del contenido de humedad de las mezclas en sobres de aluminio.

| Tiempo (días) | HR 75% (\pm 5%) y temperatura 30°C (\pm 2°C) | | | |
|---------------|----------------------------------------------------|------|------|------|
| | ALUMINIO | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 |
| 0 | 2,96 | 3,03 | 3,05 | 4,68 |
| 2 | 3,35 | 3,00 | 2,98 | 4,97 |
| 8 | 3,14 | 2,96 | 3,00 | 3,95 |
| 16 | 3,01 | 3,33 | 3,01 | 5,09 |
| 43 | 3,54 | 2,97 | 2,97 | 4,97 |

Los resultados nos demuestran que las muestras envasadas en sobres de aluminio-aluminio selladas con calor, protegen mejor al producto de la humedad y mantienen su aspecto inicial. La tabla 32, nos muestra los resultados del análisis de la pérdida de peso por desecación de los granulados.

Tabla 32. Resultados de la pérdida de peso de las mezclas en sobres de aluminio.

| Tiempo (días) | HR 75% (\pm 5%) y temperatura 30°C (\pm 2°C) | | | |
|---------------|----------------------------------------------------|------|------|------|
| | ALUMINIO | | | |
| | G1 | G2 | G3 | G4 |
| 0 | 2,98 | 2,01 | 2,03 | 3,00 |
| 2 | 3,50 | 2,34 | 3,04 | 4,02 |
| 8 | 3,65 | 2,39 | 2,70 | 3,97 |
| 16 | 3,07 | 2,72 | 2,25 | 3,82 |
| 43 | 3,26 | 2,10 | 2,70 | 3,33 |

Las siguientes tablas muestran los resultados de las muestras (mezclas y granulados), sometidas a condiciones de estabilidad extrema durante 43 días.

Tabla 33. Resultados del contenido de humedad de las mezclas almacenadas en bolsas de plástico.

| TIEMPO (DÍAS) | HR 96% ($\pm 5\%$) y temperatura 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) | | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
| | PLÁSTICO | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 |
| 0 | 2,96 | 3,03 | 3,05 | 4,68 |
| 2 | 4,03 | 5,31 | 4,02 | 5,33 |
| 8 | 4,66 | 9,31 | 6,01 | 6,65 |
| 16 | 6,01 | 6,98 | 8,66 | 7,66 |
| 43 | 7,58 | 16,39 | 13,64 | 12,72 |

En la tabla 33 observamos como en condiciones extremas de estabilidad la degradación de las muestras es mayor. También queda claro que el envase de bolsa de plástico no protege a la muestra y éstas captan gran cantidad de agua del ambiente, degradando el contenido por apelmazamiento de las muestras.

La tabla 34 muestra los resultados obtenidos al utilizar sobres de aluminio como material de acondicionamiento. Con los resultados obtenidos en la tabla 34 podemos afirmar que los envases de aluminio protegen mejor al contenido en situaciones de estabilidad extrema que los envases de plástico (resultados tabla 33). La tabla 35, nos muestra los resultados del contenido de humedad en los granulados elaborados con AHCC envasados en sobres de aluminio almacenados en condiciones de humedad extrema.

Tabla 34. Resultados del contenido de humedad de las mezclas almacenadas en sobres de aluminio.

| Tiempo (días) | HR 96% ($\pm 5\%$) y temperatura 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) | | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|------|------|------|
| | ALUMINIO | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 |
| 0 | 2,96 | 3,03 | 3,05 | 4,68 |
| 2 | 4,02 | 3,99 | 3,65 | 4,82 |
| 8 | 3,50 | 3,63 | 2,67 | 4,69 |
| 16 | 3,54 | 3,36 | 2,98 | 5,00 |
| 43 | 3,27 | 3,65 | 3,49 | 5,00 |

Tabla 35. Resultados del contenido de humedad de las mezclas almacenadas en sobres de aluminio.

| Tiempo (días) | HR 96% (\pm 5%) y temperatura 30°C (\pm 2°C) | | | |
|---------------|----------------------------------------------------|------|------|------|
| | ALUMINIO | | | |
| | G1 | G2 | G3 | G4 |
| 0 | 2,98 | 2,01 | 2,03 | 3,00 |
| 2 | 3,00 | 2,42 | 2,97 | 3,68 |
| 8 | 3,08 | 2,68 | 2,31 | 3,68 |
| 16 | 3,67 | 3,03 | 2,72 | 3,99 |
| 43 | 3,76 | 2,98 | 3,33 | 3,63 |

De este estudio inicial de estabilidad podemos concluir que un envase primario de aluminio-aluminio sellado con calor protege mejor a las formulaciones de mezclas y granulados desarrolladas para sobres con AHCC, inclusive en condiciones de estabilidad extrema. En cambio con un envase de plástico primario, el agua rápidamente llega al producto y lo degrada.

3.2.3.2. Efecto del diluyente en sobres con AHCC-FD

En el apartado 2.2.3.2. de este trabajo ya se mostraron los resultados de comparar los dos tipos de isomalt (GalenIQ® 721 e isomalt GalenIQ® 800). El isomalt 800 es ideal para realizar granulados y además contiene en su composición menor cantidad de agua en comparación con el otro isomalt 721 de mayor tamaño de partícula y más adecuado para mezclas directas.

3.2.3.3. Elaboración de tres lotes de sobres con AHCC a escala piloto

Los resultados del análisis de producto terminado de los sobres de AHCC elaborados a escala piloto se muestran a continuación:

- Sobres de 0,6 g AHCC-FD (200 sobres)

La tabla 36 muestra los resultados del análisis de producto terminado para este lote de sobres conteniendo una dosis de 0,6 g de AHCC-FD.

Tabla 36. Resultado del análisis del granulado conteniendo una dosis de 0,6 g de AHCC-FD.

| ENSAYOS | RESULTADOS |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASPECTO | Bueno, granulado seco, color pardo, presenta dispersión en el tamaño de los gránulos, presencia de polvo fino. |
| PÉRDIDA DE PESO POR DESECACIÓN | PROMEDIO = 3,73% |
| CAPACIDAD DE FLUJO | V1 = 2,08 g/s V2 = 2,02 g/s V3 = 2,61 g/s |
| ANGULO DE REPOSO | $\alpha = 28,7^\circ$ |
| DISTRIBUCIÓN GRANULOMÉTRICA | El análisis del tamaño de partícula por granulometría nos indica que la fracción mayoritaria de partículas está comprendida entre 0,840-1,190 mm, que representa el 22,12% de la fracción retenida. |
| UNIFORMIDAD DE MASA | Masa promedio= 3,125 g 3,13 ± 0,23 g. |
| PRUEBA DE CIERRE | Aspecto: el cierre es hermético, el granulado conserva su aspecto inicial, de color pardo, no hay presencia de la solución de azul de metileno en los gránulos. |

- Sobres de 0,9 g AHCC-FD (200 sobres)

La tabla 37 muestra los resultados del análisis de producto terminado para este lote de sobres conteniendo una dosis de 0,9 g de AHCC-FD.

Tabla 37. Resultado del análisis del granulado conteniendo una dosis de 0,9 g de AHCC-FD.

| ENSAYOS | RESULTADOS |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASPECTO | Bueno, granulado seco, color pardo, presenta dispersión en el tamaño de los gránulos, presencia de polvo fino. |
| PÉRDIDA DE PESO POR DESECACIÓN | PROMEDIO = 4,04% |
| CAPACIDAD DE FLUJO | V1 = 2,01 g/s V2 = 2,79 g/s V3 = 2,13 g/s |
| ANGULO DE REPOSO | $\alpha = 24^\circ$ |
| DISTRIBUCIÓN GRANULOMÉTRICA | El análisis del tamaño de partícula por granulometría nos indica que la fracción mayoritaria de partículas está comprendida entre 0,840-1,190 mm, que representa el 25,53% de la fracción retenida. |
| UNIFORMIDAD DE MASA | Masa promedio = 3,45 g 3,43 ± 0,26 g |
| PRUEBA DE CIERRE | Aspecto: el cierre es hermético, el granulado conserva su aspecto inicial, de color pardo, no hay presencia de la solución de azul de metileno en los gránulos. |

- Sobres de 1,8 g AHCC-FD (200 sobres)

La tabla 38 muestra los resultados del análisis de producto terminado para este lote de sobres conteniendo una dosis de 1,8 g de AHCC-FD.

Tabla 38. Resultado del análisis del granulado conteniendo una dosis de 1,8 g de AHCC-FD.

| ENSAYOS | RESULTADOS |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASPECTO | Bueno, granulado seco, color pardo, presenta dispersión en el tamaño de los gránulos, presencia de polvo fino. |
| PÉRDIDA DE PESO POR DESECACIÓN | PROMEDIO = 4,70% |
| CAPACIDAD DE FLUJO | V1 = 1,95 g / s V2 = 1,67 g / s V3 = 1,97 g / s |
| ANGULO DE REPOSO | $\alpha = 27^\circ$ |
| DISTRIBUCIÓN GRANULOMÉTRICA | El análisis del tamaño de partícula por granulometría nos indica que la fracción mayoritaria de partículas está comprendida entre 0,840-1,190 mm, que representa el 23,71% de la fracción retenida. |
| UNIFORMIDAD DE MASA | Masa promedio = 4,24 g 4,33 \pm 0,32 g. |
| PRUEBA DE CIERRE | Aspecto: el cierre es hermético, el granulado conserva su aspecto inicial, de color pardo, no hay presencia de la solución de azul de metileno en los gránulos. |

Todos los granulados elaborados presentan buenas propiedades de flujo, el color varía en función de la dosis de AHCC presente en la formulación (véase la figura 21), siendo más oscuro el granulado con mayor dosis de AHCC, la solubilidad en 100 ml de agua es buena, se dispersa con facilidad con una ligera agitación y el sabor también depende de la cantidad de AHCC presente en la fórmula.

3.2.3.4. Efecto del diluyente en la estabilidad de AHCC-FD

A continuación se muestran los resultados de estabilidad obtenidos con dos excipientes diferentes: isomalt e isomaltulosa. Los nombres comerciales son: GalenIQ®800 y Palatinose®. Las formulaciones y condiciones del estudio se describen en el apartado 2.2.3.4. de esta tesis. La finalidad del estudio es comprobar si la isomaltulosa puede ser una alternativa al diluyente GalenIQ®800 en la elaboración de sobres con AHCC.

- **Estudio comparativo del efecto de isomalt o isomaltulosa en la estabilidad de formulaciones para sobres con una dosis de 0,6 g de AHCC-FD**

Los resultados de este estudio de estabilidad se midieron en relación con el aspecto y el contenido de humedad:

- **Aspecto.** Ambos granulados captan agua aunque la formulación que incluye isomalt tiene un mejor aspecto debido a que el granulado fluye, el efecto de apelmazamiento se observa con la formulación que contiene isomaltulosa. Por otra parte, el granulado con isomaltulosa tiene un color más oscuro que el granulado elaborado con isomalt como se muestra en la figura 41. Esto puede ser indicativo de una reacción de Maillard facilitada por la presencia de azúcares reductores (hexosa) que presenta el compuesto que ocurre en el granulado con isomaltulosa debido a que ésta contiene aproximadamente el 50% de sacarosa. Por lo tanto, el isomalt tiene mejores condiciones de estabilidad para sobres de AHCC.

- **Contenido de humedad (%).** Los resultados se muestran en la tabla 39. Podemos observar que la isomaltulosa es un diluyente con baja higroscopicidad, pero a pesar que la formulación con isomalt presenta un mayor contenido de humedad, no presenta apelmazamiento, esto debido al gran efecto de antiapelmazamiento del isomalt que hace que los gránulos no se aglomeren.

Tabla 39. Resultados del contenido de humedad de las formulaciones con isomalt e isomaltulosa.

| Tiempo de muestreo (días) | Formulación para sobres con isomalt (0,6 g AHCC-FD) | Formulación para sobres con isomaltulosa (0,6 g AHCC-FD) |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 0 | 3,23% | 3,11% |
| 1 | 6,34% | 4,19% |
| 3 | 8,75% | 5,00% |
| 4 | 9,28% | 5,64% |
| 6 | 9,61% | 6,83% |
| 10 | 10,05% | 7,91% |
| 17 | 9,57% | 7,54% |
| 30 | 9,29% | 7,26% |



Figura 40. Aspecto de los granulados con isomalt e isomaltulosa después de 1 mes en condiciones de estabilidad.

Con los resultados obtenidos comprobamos que la isomaltulosa no es una buena alternativa de sustitución al isomalt en la formulación para sobres con AHCC.

3.2.3.5. Estudio de estabilidad de lotes piloto

El estudio de estabilidad duró 32 meses en las condiciones detalladas en el apartado 2.2.3.5. de este trabajo. Los resultados siguiendo el protocolo de estabilidad se muestran a continuación.

- **Aspecto y disolución.** Las muestras sometidas a condiciones extremas de HR 96% ($\pm 5\%$) presentan apelmazamiento después de 32 meses de almacenamiento, pero después de 24 meses las muestras en las mismas condiciones de estabilidad no presentaron apelmazamiento, el granulado contenido en los sobres presentaba buen aspecto, flujo y el color característico dependiente de la dosis. Los sobres sometidos a HR de ($75\% \pm 5\%$) no presentaron este efecto de apelmazamiento del granulado durante todo el tiempo que duró el estudio. La figura 41 muestra el efecto del apelmazamiento observado en las muestras en condiciones extremas de HR.



Figura 41. Efecto de apelmazamiento en los granulados almacenados.

El color del granulado está relacionado con la cantidad de AHCC presente en la muestra, dosis mayores de AHCC presentan un color más oscuro. En cuanto a la disolución en agua, todas las formulaciones para sobres muestran buena dispersión, incluso aquellas muestras que presentan aglomerados ya que éstos no interfieren en la fácil dispersión del producto en agua. La figura 42 muestra la disolución del

contenido de un sobre de AHCC antes de iniciar el ensayo y luego una vez finalizado podemos ver claramente el cambio de coloración en la disolución debido a la reacción de Maillard que sufre el producto relacionada con el tiempo de almacenamiento de la muestra.

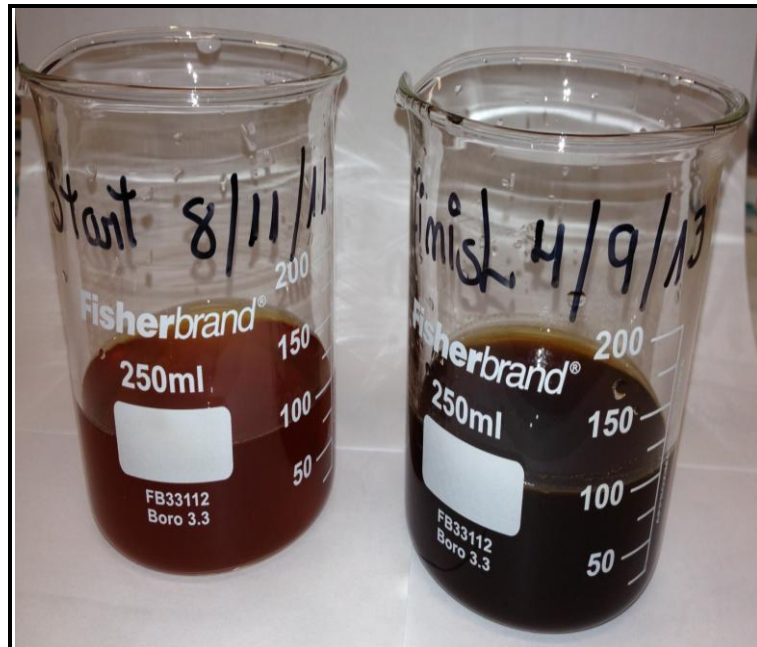


Figura 42. Cambio en la coloración de la disolución observada en todas las muestras (reacción de Maillard).

- **pH.** Las formulaciones hidrófilas para sobres presentan un pH entre 4,0 y 4,6. El AHCC-FD tiene un pH de $4,65 \pm 0,11$, muy similar a la formulación hidrófoba japonesa. En las formulaciones donde sustituimos el isomalt por isomaltulosa el pH está entre 4,4 y 4,7.

- **Contenido de humedad (%).** A continuación en las tablas 40-45 y figuras 43-49 se muestra el contenido de agua en las muestras de sobres con AHCC durante el estudio de estabilidad.

Tabla 40. Contenido de humedad en los sobres con 0,6 g de AHCC-FD.

| Sobres con AHCC | Pérdida de peso por desecación (%) | | | |
|-----------------|------------------------------------|------|------|----------|
| | Humedad relativa 75% (\pm 5%) | | | |
| Tiempo | Sobres con 0,6 g de AHCC-FD | | | Promedio |
| Inicio | 3,84 | 3,09 | 2,74 | 3,22 |
| 1 semana | 4,52 | 3,39 | 3,37 | 3,76 |
| 6 semanas | 4,28 | 4,09 | 4,00 | 4,12 |
| 3 meses | 4,17 | 4,34 | 3,84 | 4,12 |
| 6 meses | 4,69 | 4,61 | 4,03 | 4,44 |
| 9 meses | 3,36 | 3,96 | 3,83 | 3,72 |
| 12 meses | 3,76 | 3,66 | 3,64 | 3,69 |
| 18 meses | 3,88 | 4,12 | 3,69 | 3,90 |
| 24 meses | 3,30 | 4,10 | 3,98 | 3,79 |
| 32 meses | 3,79 | 4,00 | 3,33 | 3,71 |

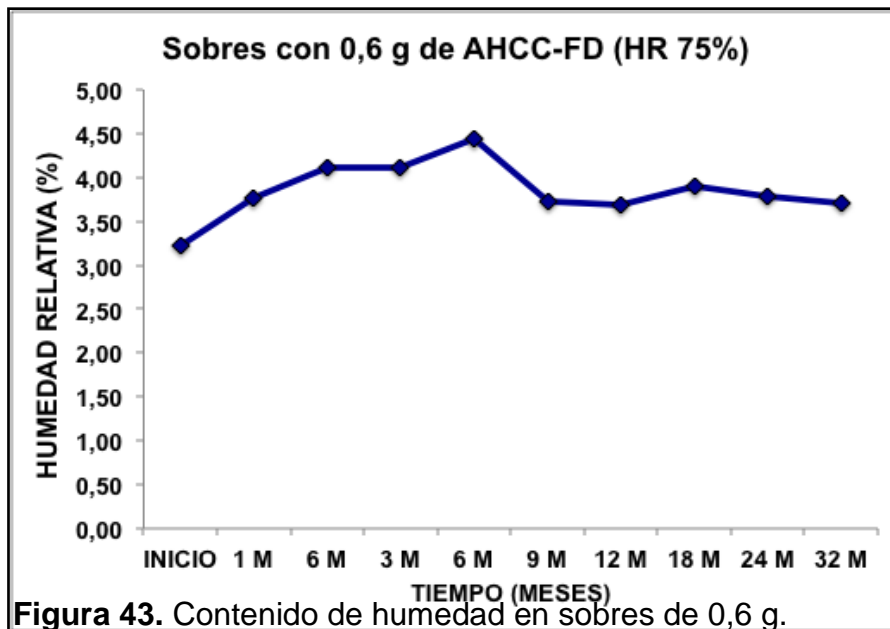


Figura 43. Contenido de humedad en sobres de 0,6 g.

Tabla 41. Contenido de humedad en los sobres con 0,9 g de AHCC-FD.

| Sobres con AHCC | Pérdida de peso por desecación (%) | | | |
|-----------------|------------------------------------|------|----------|------|
| | Humedad relativa 75% ($\pm 5\%$) | | | |
| Tiempo | Sobres con 0,9 g de AHCC-FD | | Promedio | |
| Inicio | 3,83 | 3,78 | 3,79 | 3,80 |
| 1 semana | 4,06 | 4,37 | 3,73 | 4,05 |
| 6 semanas | 4,43 | 4,27 | 4,46 | 4,39 |
| 3 meses | 4,32 | 4,79 | 4,42 | 4,51 |
| 6 meses | 4,82 | 4,89 | 4,98 | 4,90 |
| 9 meses | 4,12 | 3,73 | 3,76 | 3,87 |
| 12 meses | 4,14 | 3,97 | 3,98 | 4,03 |
| 18 meses | 4,60 | 4,04 | 3,56 | 4,07 |
| 24 meses | 4,00 | 3,98 | 3,70 | 3,89 |
| 32 meses | 4,04 | 3,56 | 3,61 | 3,74 |

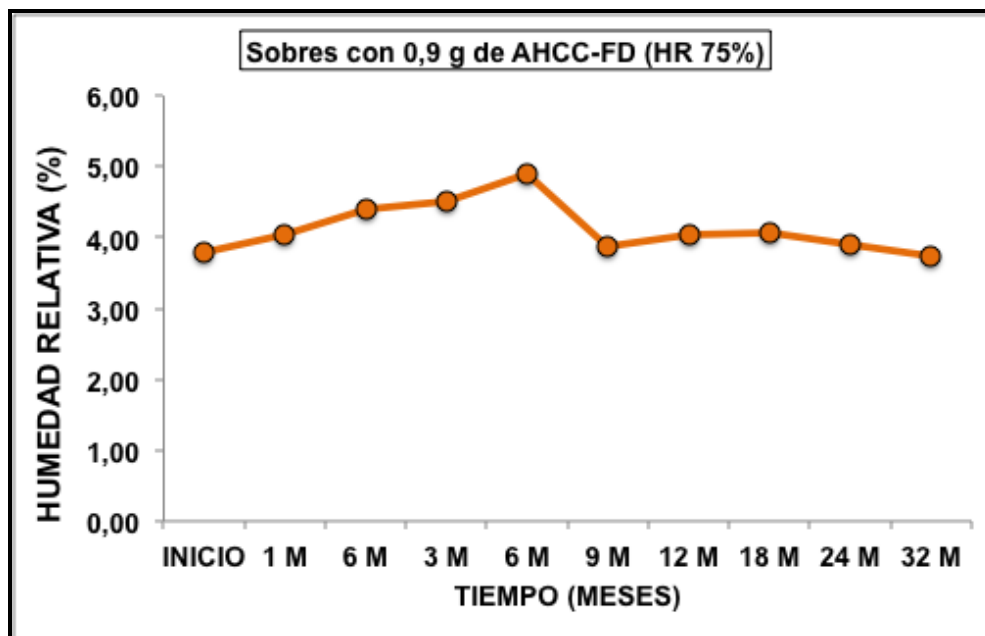


Figura 44. Contenido de humedad en sobres de 0,9 g.

Tabla 42. Contenido de humedad en los sobres con 1,8 g de AHCC-FD.

| Sobres con AHCC | Pérdida de peso por desecación (%) | | | |
|-----------------|------------------------------------|------|------|----------|
| | Humedad relativa 75% ($\pm 5\%$) | | | |
| Tiempo | Sobres con 1,8 g de AHCC-FD | | | Promedio |
| Inicio | 4,17 | 4,69 | 4,93 | 4,60 |
| 1 semana | 4,50 | 4,70 | 5,01 | 4,74 |
| 6 semanas | 4,99 | 5,00 | 5,01 | 5,00 |
| 3 meses | 4,93 | 5,10 | 5,00 | 5,01 |
| 6 meses | 4,82 | 5,02 | 5,00 | 4,95 |
| 9 meses | 4,97 | 4,72 | 4,85 | 4,85 |
| 12 meses | 5,24 | 4,68 | 4,60 | 4,84 |
| 18 meses | 4,12 | 5,43 | 4,81 | 4,79 |
| 24 meses | 4,40 | 4,90 | 4,10 | 4,47 |
| 32 meses | 4,82 | 4,20 | 4,21 | 4,41 |

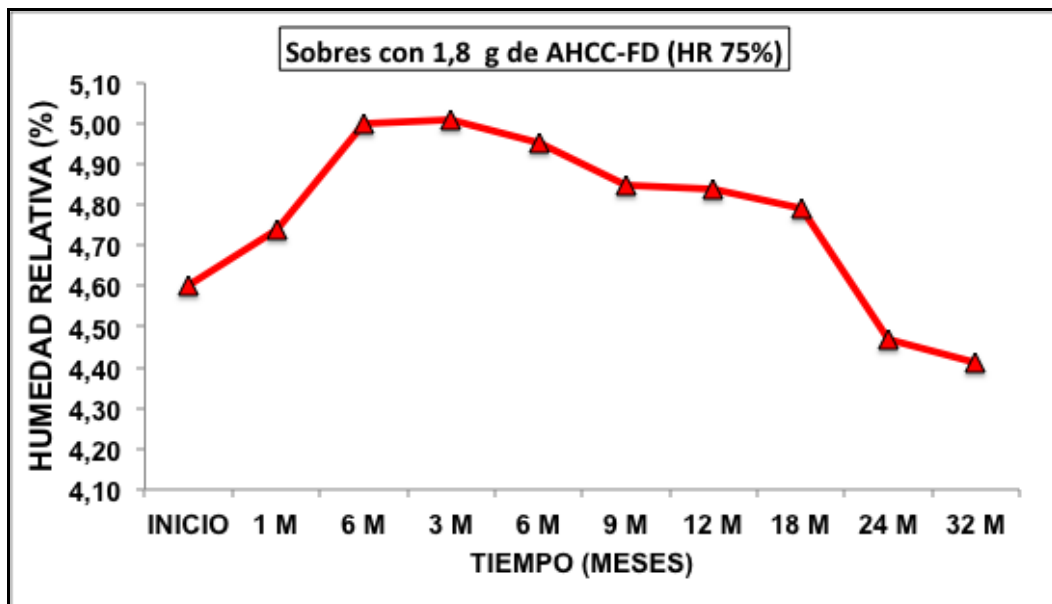


Figura 45. Contenido de humedad en sobres de 1,8 g.

En las gráficas 43-45 podemos observar que los sobres con AHCC captan humedad ambiental hasta llegar a un punto de equilibrio, a partir del cuál empiezan a descender sus valores.

Tabla 43. Contenido de humedad en los sobres con 0,6 g de AHCC-FD.

| Sobres con AHCC | Pérdida de peso por desecación (%) | | | |
|-----------------|------------------------------------|------|------|----------|
| | Humedad relativa 96% ($\pm 5\%$) | | | |
| Tiempo | Sobres con 0,6 g de AHCC-FD | | | Promedio |
| Inicio | 3,84 | 3,09 | 2,74 | 3,22 |
| 1 semana | 4,44 | 4,64 | 4,72 | 4,60 |
| 6 semanas | 4,60 | 4,61 | 4,59 | 4,60 |
| 3 meses | 5,00 | 4,85 | 4,80 | 4,88 |
| 6 meses | 4,46 | 4,52 | 4,97 | 4,65 |
| 9 meses | 4,06 | 3,76 | 3,97 | 3,93 |
| 12 meses | 4,86 | 4,51 | 3,44 | 4,27 |
| 18 meses | 4,18 | 3,92 | 4,22 | 4,11 |
| 24 meses | 4,12 | 4,52 | 3,90 | 4,18 |
| 32 meses | 2,96 | 5,10 | 4,22 | 4,09 |

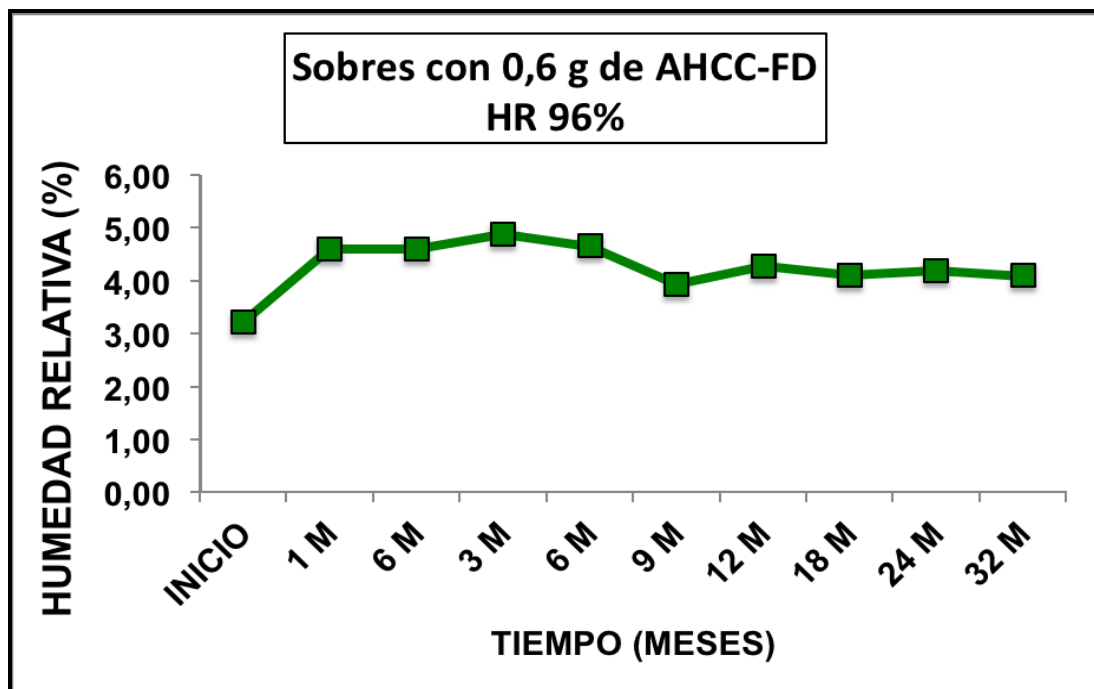


Figura 46. Contenido de humedad en sobres de 0,6 g de AHCC-FD.

Tabla 44. Contenido de humedad en los sobres con 0,9 g de AHCC-FD.

| Sobres con AHCC | Pérdida de peso por desecación (%) | | | |
|-----------------|------------------------------------|------|------|----------|
| | Humedad relativa 96% ($\pm 5\%$) | | | |
| Tiempo | Sobres con 0,9 g de AHCC-FD | | | Promedio |
| Inicio | 3,83 | 3,78 | 3,79 | 3,80 |
| 1 semana | 4,59 | 5,05 | 4,10 | 4,58 |
| 6 semanas | 5,04 | 4,40 | 4,41 | 4,62 |
| 3 meses | 5,00 | 4,46 | 4,97 | 4,81 |
| 6 meses | 5,02 | 4,90 | 4,97 | 4,96 |
| 9 meses | 4,72 | 3,96 | 3,98 | 4,22 |
| 12 meses | 5,33 | 4,01 | 4,62 | 4,65 |
| 18 meses | 4,70 | 4,63 | 3,78 | 4,37 |
| 24 meses | 3,50 | 3,12 | 3,42 | 3,35 |
| 32 meses | 3,68 | 2,72 | 3,61 | 3,34 |

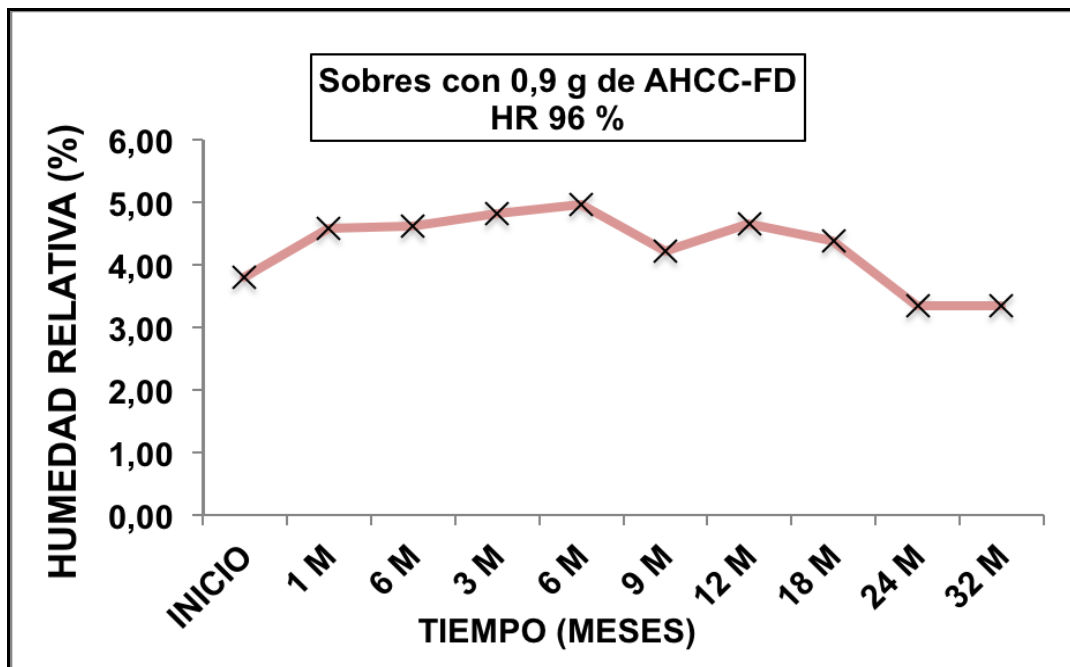


Figura 47. Contenido de humedad en sobres de 0,9 g de AHCC-FD.

Tabla 45. Contenido de humedad en los sobres con 1,8 g de AHCC-FD.

| Sobres con AHCC | Pérdida de peso por desecación (%) | | | |
|-----------------|------------------------------------|------|----------|------|
| | Humedad relativa 96% (\pm 5%) | | | |
| Tiempo | Sobres con 1,8 g de AHCC-FD | | Promedio | |
| Inicio | 4,17 | 4,69 | 4,93 | 4,60 |
| 1 semana | 4,58 | 4,84 | 4,85 | 4,76 |
| 6 semanas | 4,71 | 5,02 | 4,78 | 4,84 |
| 3 meses | 5,25 | 5,23 | 5,11 | 5,20 |
| 6 meses | 5,24 | 5,29 | 5,49 | 5,34 |
| 9 meses | 5,11 | 5,03 | 4,99 | 5,04 |
| 12 meses | 5,20 | 5,07 | 4,92 | 5,06 |
| 18 meses | 5,03 | 4,64 | 4,89 | 4,85 |
| 24 meses | 4,54 | 4,38 | 4,26 | 4,39 |
| 32 meses | 4,69 | 3,99 | 4,46 | 4,38 |

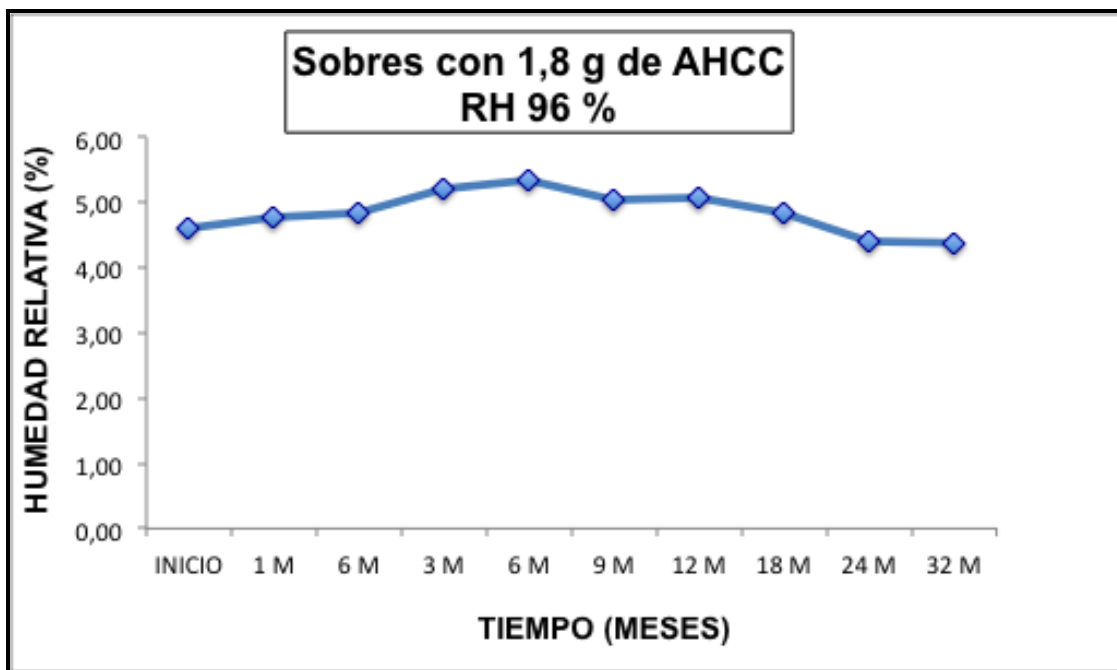


Figura 48. Contenido de humedad en sobres de 1,8 g de AHCC-FD.

En relación con los resultados obtenidos, podemos concluir que todas las formulaciones de sobres captan humedad, siendo ésta mayor cuanto mayor sea las condiciones de humedad extrema. Además todas las formulaciones captan agua hasta un punto donde alcanzan el equilibrio y luego el contenido de humedad empieza a descender.

- **Degradación química por HPLC.** Los resultados de la validación del método isocrático por HPLC para determinar cuantitativamente el compuesto G₁, indicador de la estabilidad en las formulaciones, se muestran a continuación:

- **Linealidad**

Los resultados de regresión lineal correspondiente al estudio de linealidad realizado en tres días diferentes se muestran a continuación:

- Día 1: Área = - 12,3 + 1932,9 C (mg/ml)

- Día 2: Área = 0,2 + 1902,3 C (mg/ml)

- Día 3: Área = 3,7 + 1 865 C (mg/ml)

Los coeficientes de regresión individuales para cada uno de ellos fue mayor que 0,999. La línea de regresión de los datos obtenidos de los tres días fue:

$$\text{Area} = -9,3 + 1913,4 \times C \text{ (mg/ml)}$$

El coeficiente de regresión (r) fue de 0,9996 y P<0,0001 (ANOVA) mostrando una relación significativa entre el área y la concentración de AHCC para el pico obtenido en 8,9 minutos. Estos datos demuestran que el método es lineal. La figura 50, muestra los resultados de linealidad y reproducibilidad del método.

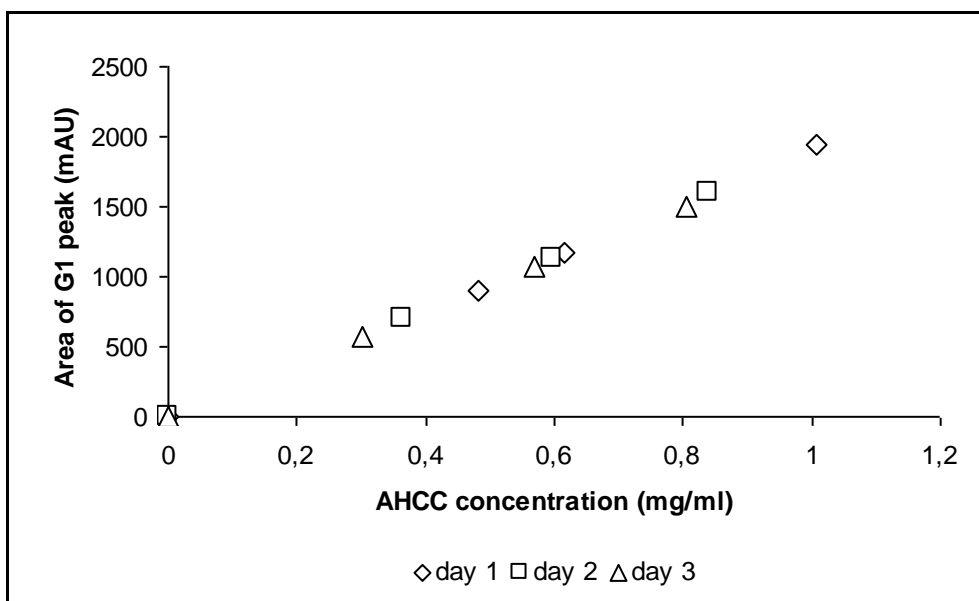


Figura 49. Resultados de linealidad del método en los tres días estudiados.

- **Reproducibilidad (Coeficiente de variación)**

Se estudia la reproducibilidad a tres concentraciones diferentes: 0,3; 0,617 y 1,0 mg/ml. Se analizan diez veces cada muestra. Los coeficientes de variación obtenidos son siempre menores del 2% lo que indica que el método es reproducible.

- **Reproducibilidad inter-día**

Los valores de las pendientes entre la línea de regresión promedio y la línea de regresión lineal obtenida cada día fueron (expresados en coeficientes de variación) de 1,0% el primer día, 0,6% el segundo día y 2,5% el tercer día. Todas las diferencias fueron inferiores al 3%, lo que es indicativo de una buena reproducibilidad entre días del método.

La figura 50, muestra los cromatogramas típicos del método, siendo el primer cromatograma una muestra de agua desionizada, seguido por la formulación hidrófoba japonesa y finalmente se puede observar el cromatograma de la formulación hidrófila desarrolla para sobres.

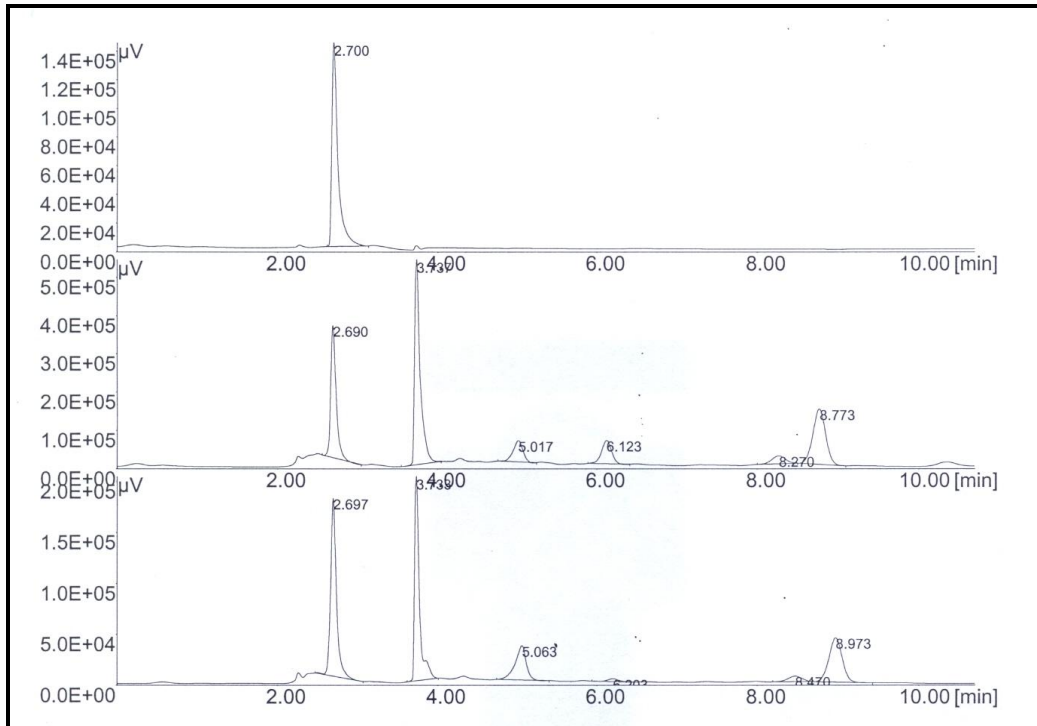


Figura 50. Cromatogramas correspondientes a muestra de agua desionizada (arriba), formulación hidrófoba japonesa (centro) y formulación hidrófila para sobres (abajo).

Observamos que los perfiles de los picos son similares entre ambas formulaciones (hidrófoba e hidrófila), el pico correspondiente a 6,1 es menor en la formulación hidrófila, razón por la cuál decidimos analizar otras muestras para compararlas y claramente está presente el pico en cuestión (figura 51).

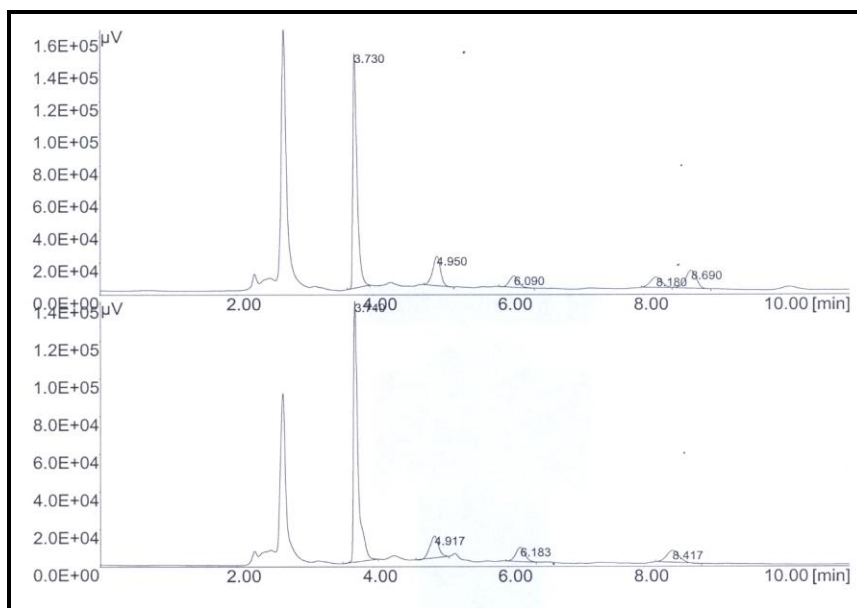


Figura 51. Cromatogramas de otras formulaciones hidrófilas.

La figura 52 y 53 ilustran el efecto de la estabilidad en el pico G_1 (8,8 min), los cromatogramas corresponden a la misma disolución, analizada recién preparada y después de tres días a temperatura ambiente y expuesta a la luz.

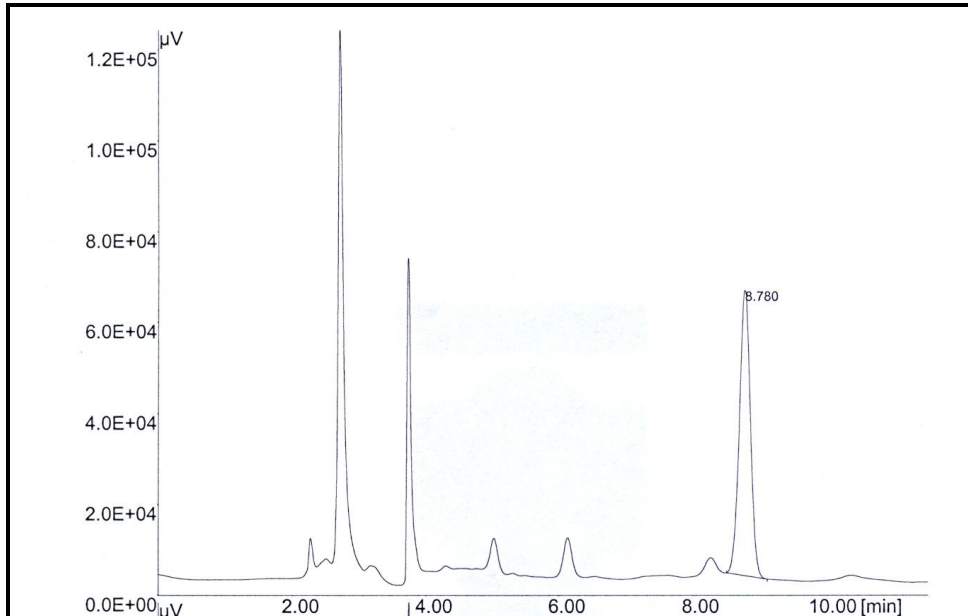


Figura 52. Cromatogramas de una disolución de AHCC-FD, el pico correspondiente a G_1 tiene un tiempo de retención de 8,8 minutos.

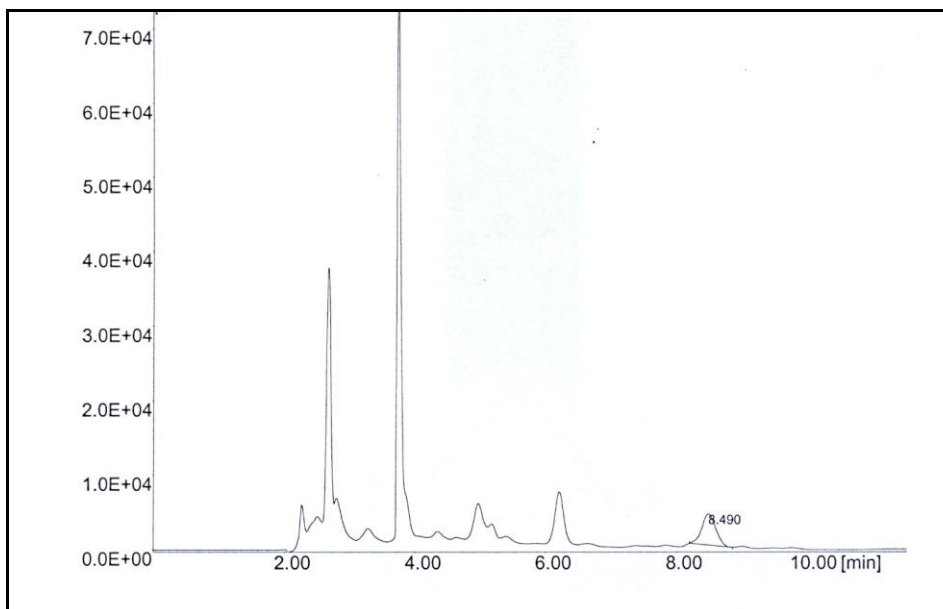


Figura 53. Cromatogramas de la disolución de AHCC-FD, analizada después de 72 horas.

Ambas figuras muestran cómo se transforman los dos picos iniciales de 8,2 y 8,8 minutos (figura 52), en un pico de tiempo de retención de 8,5 minutos (figura 53).

Una vez disuelto el contenido de los sobres en agua la fracción G_1 empieza a degradarse y con el transcurso del tiempo se transforma en otro pico. El G_1 es indicativo de cómo el agua degrada la muestra.

Es importante señalar que la actividad del AHCC-FD no está relacionada únicamente al contenido de G_1 . Por lo tanto, este parámetro no se debe utilizar para una medición indirecta de la potencia de AHCC en la formulación. Los resultados del análisis de las muestras nos sugieren que la dosis de AHCC está inversamente relacionada con el contenido de G_1 . Las formulaciones que contienen 0,6 g de AHCC tienen mayor proporción de G_1 que los sobres con 1,8 g.

3.2.3.6. Resultados de estudio de estabilidad final.

Las formulaciones estudiadas en este apartado se han identificado con unas claves que se muestran en la tabla 46.

Los resultados del estudio en las diferentes condiciones de almacenamiento se muestran en las tablas 47- 49. Los datos mostrados son la media y desviación estándar de tres muestras diferentes.

Tabla 46. Composición y características de las formulaciones estudiadas en el estudio final de estabilidad.

| Clave | Dosis AHCC | Composición (g)/sobre | Peso final | Fecha de fabricación | Diluyente |
|-----------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------|--------------|
| Formulación hidrófoba | 0,5 g | AHCC-FG | 0,8 g | 6/10/2009 | Confidencial |
| Cápsulas | 0,343 g | AHCC.....0,343 Aerosil.....0,008 Precirol..... 0,012 F-Melt-F1... 0,025 Swelstar PD-1..0,012 | 0,4 g | 16/5/2011 | F-Melt-F1 |
| Comprimido | 0,6 g | Variante de fórmula 3 | 1,3 g | | |
| HS1 | 0,6 g | AHCC.....0,6 isomalt.....2,5 Aerosil.....0,03 | 3,13 g | 8/8/2011 | isomalt |
| HS2 | 0,9 g | AHCC.....0,9 isomalt.....2,5 Aerosil.....0,03 | 3,43 g | 12/8/2011 | isomalt |
| HS3 | 1,8 g | AHCC.....1,8 isomalt.....2,5 Aerosil.....0,03 | 4,33 g | 22/8/2011 | isomalt |
| HS4 | 0,9 g | AHCC.....0,9 isomalt.....2,07 Aerosil.....0,03 | 3 g | 5/3/2012 | isomalt |
| HS5 | 1,8 g | AHCC.....1,8 isomalt.....1,17 Aerosil.....0,03 | 3 g | 27/8/2012 | isomalt |
| HS6 | 0,6 g | AHCC.....0,6 isomaltulosa..2,5 Aerosil.....0,03 | 3,13 g | 23/1/2012 | isomaltulosa |
| HS7 | 0,9 g | AHCC.....0,9 isomaltulosa..2,07 Aerosil.....0,03 | 3 g | 1/2/2012 | isomaltulosa |

Tabla 47. Resultados del estudio de estabilidad de las muestras almacenadas a temperatura ambiente. Clave: En formulación entre paréntesis el primer número indica la cantidad (g) de AHCC-FD por fórmula, el segundo número contenido total (g) y el último nombre el tipo de diluyente.

| Formulación | Tiempo de almacenamiento (meses) | Acondicionamiento primario | Aspecto y disolución | pH | Pérdida de peso (%) | Contenido de G ₁ (%) |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------------------|
| Formulación hidrófoba | > 12 | Al-Al | Fino granulado de color marrón con buena fluidez y mala dispersabilidad | 4,6±0,1 | 1,0±0,0 | 52,4±1,5 |
| Cápsulas | >48 | vidrio | Cápsula de buen aspecto exterior pero el contenido está aglomerado y oscuro | 4,1±0,0 | 3,7±0,3 | 3,8±0,2 |
| Comprimidos | 43 | vidrio | Comprimido sólido que al triturarse es un polvo fino de flujo libre | 5,6±0,1 | 5,5±0,7 | 27,9±1,0 |
| HS1 (0,6; 3,13; isomalt) | 35,5 | Al-Al | Granulado fino de color marrón, con buen flujo y buena dispersión en agua | 4,3±0,0 | 4,4±0,5 | 6,5±0,1 |
| HS1 (0,6; 3,13; isomalt, plástico) | 34,5 | PVC plástico | Polvo fino de color marrón claro, con buen flujo y buena dispersión en agua | 4,6±0,0 | 4,4±0,3 | 5,8±1,1 |
| HS2 (0,9; 3,43; isomalt) | 35,5 | Al-Al | Granulado fino de color marrón, con buen flujo y buena dispersión en agua | 4,3±0,0 | 4,7±0,5 | 4,2±0,4 |
| HS3 (1,8; 4,33; isomalt) | 35 | Al-Al | Granulado fino de color marrón oscuro, con buen flujo y buena dispersión en agua | 4,2±0,0 | Muestra insuficiente | 6,0±0,2 |
| HS3 (1,8; 4,33; isomalt; plástico) | 35,5 | PVC plástico | Polvo marrón oscuro, con buen flujo y dispersión en agua | 4,5±0,1 | 4,3±0,4 | 3,2±0,1 |
| HS4 (0,9; 3; isomalt) | 28,5 | Al-Al | Fino granulado de color marrón, buen flujo y dispersión en agua | 4,6±0,0 | 4,3±0,3 | 18,3±0,3 |
| HS5 (1,8; 3; isomalt) | 23 | Al-Al | Granulado con aglomerados, marrón oscuro, mala fluidez, buena dispersión en agua | 4,4±0,0 | 5,4±0,2 | 7,7±0,4 |
| HS5 (1,8; 3; isomalt, plástico) | 22,5 | PVC plástico | Polvo pardo oscuro aglomerado, mala fluidez, buena dispersión en agua. | 4,5±0,0 | 4,7±0,3 | 11,5±0,3 |
| HS6 (0,6; 3,13, isomaltulosa) | 30 | Al-Al | Granulado fino de color marrón claro, con buen flujo y dispersión en agua | 4,7±0,0 | 3,6±0,6 | 21,4±0,3 |
| HS7 (0,9; 3, isomaltulosa) | 30 | Al-Al | Granulado fino de color marrón, buen flujo y dispersión en agua | 4,7±0,0 | 3,0±0,5 | 38,5±0,5 |

Tabla 48. Resultados del estudio de estabilidad de las muestras almacenadas a 30°C y 75% de humedad relativa. Clave: En formulación entre paréntesis el primer número indica la cantidad (g) de AHCC-FD por fórmula, el segundo número contenido total (g) y el último nombre el tipo de diluyente.

| Formulación | Tiempo de almacenamiento (meses) | Acondicionamiento primario | Aspecto y disolución | pH | Pérdida de peso (%) | Contenido de G ₁ (%) |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------|---------------------------------|
| HS1 (0,6; 3,13; isomalt) | 35,5 | Al-Al | Granulado aglomerado de color marrón, buena dispersión en agua | 4,0±0,0 | 3,8±0,4 | 32,2±1,0 |
| HS2 (0,9; 3,43; isomalt) | 35,5 | Al-Al | Granulado aglomerado de color marrón, buena dispersión en agua | 4,2±0,0 | 4,1±0,3 | 25,8±0,5 |
| HS3 (1,8; 4,33; isomalt) | 35 | Al-Al | Granulado aglomerado de color marrón oscuro, buena dispersión en agua | 4,1±0,0 | 5,3±0,6 | 19,9±0,3 |
| HS4 (0,9; 3; isomalt) | 22,5 | Al-Al | Granulado marrón, que fluye y tiene buena dispersión en agua | 4,3±0,0 | 3,7±0,2 | 4,0±0,2 |
| HS5 (1,8; 3; isomalt) | 27,5 | Al-Al | Granulado aglomerado, de color marrón oscuro, fluye y se dispersa bien en agua | 4,3±0,0 | 3,8±0,3 | 5,4±0,1 |
| HS6 (0,6; 3,13; isomaltulosa) | 30 | Al-Al | Granulado fino, de color marrón claro, buen flujo y dispersión en agua | 4,4±0,0 | 2,6±0,5 | 4,1±0,0 |

Tabla 49. Resultados del estudio de estabilidad de las muestras almacenadas a 30°C y 96% de humedad relativa. Clave: En formulación entre paréntesis el primer número indica la cantidad (g) de AHCC-FD por fórmula, el segundo número contenido total (g) y el último nombre el tipo de diluyente.

| Formulación | Tiempo de almacenamiento (meses) | Acondicionamiento primario | Aspecto y disolución | pH | Pérdida de peso (%) | Contenido de G ₁ (%) |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------|---------------------------------|
| HS1 (0,6; 3,13; isomalt) | 35,5 | Al-Al | Polvo aglomerado de color marrón claro, buena dispersión | 4,1±0,1 | 4,5±0,8 | 43,5±0,3 |
| HS2 (0,9; 3,43; isomalt) | 35,5 | Al-Al | Polvo aglomerado de color marrón, buena dispersión en agua | 4,2±0,0 | 4,4±0,7 | 25,4±0,8 |
| HS3 (1,8; 4,33; isomalt) | 35 | Al-Al | Polvo bastante aglomerado de color marrón oscuro, buena dispersión en agua | 4,2±0,1 | 4,9±0,6 | 13,9±0,1 |
| HS4 (0,9; 3; isomalt) | 22,5 | Al-Al | Polvo bastante aglomerado de color marrón, buena dispersión en agua | 4,3±0,1 | 4,7±0,7 | 11,1±0,2 |
| HS5 (1,8; 3; isomalt) | 27,5 | Al-Al | Polvo bastante aglomerado de color marrón oscuro, buena dispersión en agua | 4,2±0,0 | 4,2±0,8 | 5,3±0,1 |

3.3. ESTUDIOS *IN VITRO* DE VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DEL AHCC

En los ensayos de disolución utilizando el dispositivo de Celda de Flujo Continuo para evaluar la biodisponibilidad *in vitro* de las dos presentaciones de AHCC caracterizadas (AHCC-FD y AHCC-FG) se obtuvieron los siguientes resultados de velocidad de flujo (V_f) o velocidad de disolución en mg/ml que se muestran en las tablas 50 y 51.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las presentaciones.

Tabla 50. Resultados de velocidad de flujo (V_f) en mg/ml en los ensayos de disolución utilizando la Celda de Flujo Continuo para el AHCC-FD.

| V_f (AHCC-FD-E1) | V_f (AHCC-FD-E2) | V_f (AHCC-FD-E3) | V_f Promedio | T intervalo (min) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 66,8312 | 74,5157 | 68,2770 | 69,8746 | 2,5 |
| 23,6159 | 33,9243 | 19,8941 | 25,8114 | 7,5 |
| 12,5309 | 11,1653 | 6,5064 | 10,0675 | 12,5 |
| 3,8639 | 4,2489 | 4,0338 | 4,0489 | 22,5 |
| 0,5052 | 0,5232 | 0,5574 | 0,5286 | 37,5 |
| 0,0289 | 0,0244 | 0,0244 | 0,0259 | 52,5 |
| 0,0237 | 0,0241 | 0,0241 | 0,0240 | 67,5 |
| 0,0237 | 0,0192 | 0,0192 | 0,0207 | 82,5 |
| 0,0095 | 0,0144 | 0,0144 | 0,0128 | 97,5 |
| 0,0047 | 0,0144 | 0,0096 | 0,0096 | 112,5 |
| 0 | 0,0144 | 0,0096 | 0,0080 | 127,5 |
| 0 | 0,0033 | 0,0033 | 0,0022 | 142,5 |
| 0 | 0 | 0,0033 | 0,0011 | 157,5 |
| 0 | 0 | 0 | 0,0000 | 172,5 |

Tabla 51. Resultados de velocidad de flujo (V_f) en mg/ml obtenidos en los ensayos de disolución utilizando la Celda de Flujo Continuo para el AHCC-FG.

| V_f (AHCC-FG-E1) | V_f (AHCC-FG-E2) | V_f (AHCC-FG-E3) | V_f Promedio | T intervalo (min) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30,0656 | 28,1967 | 19,6995 | 25,9873 | 2,5 |
| 12,3552 | 15,7013 | 69,3115 | 32,4560 | 7,5 |
| 5,6918 | 11,9854 | 49,6503 | 22,4425 | 12,5 |
| 4,1005 | 6,725 | 3,4633 | 4,7629 | 22,5 |
| 2,8383 | 5,4426 | 2,5598 | 3,6136 | 37,5 |
| 2,2798 | 4,5319 | 2,2060 | 3,0059 | 52,5 |
| 3,4577 | 2,4863 | 2,5902 | 2,8447 | 67,5 |
| 1,9439 | 1,3989 | 1,3825 | 1,5751 | 82,5 |
| 1,5529 | 1,1421 | 1,3825 | 1,3592 | 97,5 |
| 1,5305 | 1,0546 | 1,5847 | 1,3899 | 112,5 |
| 1,1395 | 0,9508 | 1,0109 | 1,0337 | 127,5 |
| 0,7418 | 0,5825 | 0,5078 | 0,6107 | 142,5 |
| 0,4232 | 0,5277 | 0,2987 | 0,4165 | 157,5 |
| 0,4080 | 0,3303 | 0,1892 | 0,3092 | 172,5 |

Asimismo, en la siguiente tabla 52, se comparan los resultados promedios de V_f de las dos formulaciones ensayadas, en determinados intervalos de tiempo, con sus respectivas desviaciones estándar (σ) de cada una de las presentaciones de AHCC ensayadas.

Tabla 52. Resultados del promedio de velocidad de flujo (V_f) y desviación estándar (DS/2) de las dos presentaciones de AHCC ensayadas utilizando la Celda de Flujo Continuo.

| T intervalo (min) | V_f Promedio | V_f Promedio | AHCC-FD | AHCC-FG |
|-------------------|----------------|----------------|---------|----------|
| | AHCC-FD | AHCC-FG | DS/2 | DS/2 |
| 0 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 | 0,00000 |
| 2,5 | 69,87463 | 25,98727 | 2,04189 | 2,76248 |
| 7,5 | 25,81143 | 32,45600 | 3,63411 | 15,98081 |
| 12,5 | 10,06753 | 22,44250 | 1,57936 | 11,88592 |
| 22,5 | 4,04887 | 4,76293 | 0,09647 | 0,86441 |
| 37,5 | 0,52860 | 3,61357 | 0,01326 | 0,79505 |
| 52,5 | 0,02590 | 3,00590 | 0,00130 | 0,66103 |
| 67,5 | 0,02397 | 2,84473 | 0,00012 | 0,26669 |
| 82,5 | 0,02070 | 1,57510 | 0,00130 | 0,15975 |
| 97,5 | 0,01277 | 1,35917 | 0,00141 | 0,10320 |
| 112,5 | 0,00957 | 1,38993 | 0,00243 | 0,14583 |
| 127,5 | 0,00800 | 1,03373 | 0,00367 | 0,04820 |
| 142,5 | 0,00220 | 0,61070 | 0,00095 | 0,05976 |
| 157,5 | 0,00110 | 0,41653 | 0,00095 | 0,05732 |
| 172,5 | 0,00000 | 0,30917 | 0,00000 | 0,05546 |

En la figura 54, podemos observar los resultados del ensayo de disolución *in vitro* de las dos presentaciones diferentes de AHCC (AHCC-FD y AHCC-FG) empleando la Celda de Flujo Continuo. Es evidente que el proceso de disolución es muy rápido, para ambas muestras. El AHCC-FG presenta un perfil de liberación lento en comparación con la liberación casi inmediata de AHCC-FD, pudiendo ser debido al gran porcentaje de componente lubricante utilizado en la fabricación de los gránulos de AHCC-FG que dificultad la solubilidad en el medio.

Ambas presentaciones de AHCC, liberan la mayor parte de sus componentes activos en la primera parte del tracto gastrointestinal. El AHCC-FD (polvo liofilizado) libera más del 85% de su composición en medio ácido (pH:1,2) en un tiempo menor a 15 minutos.

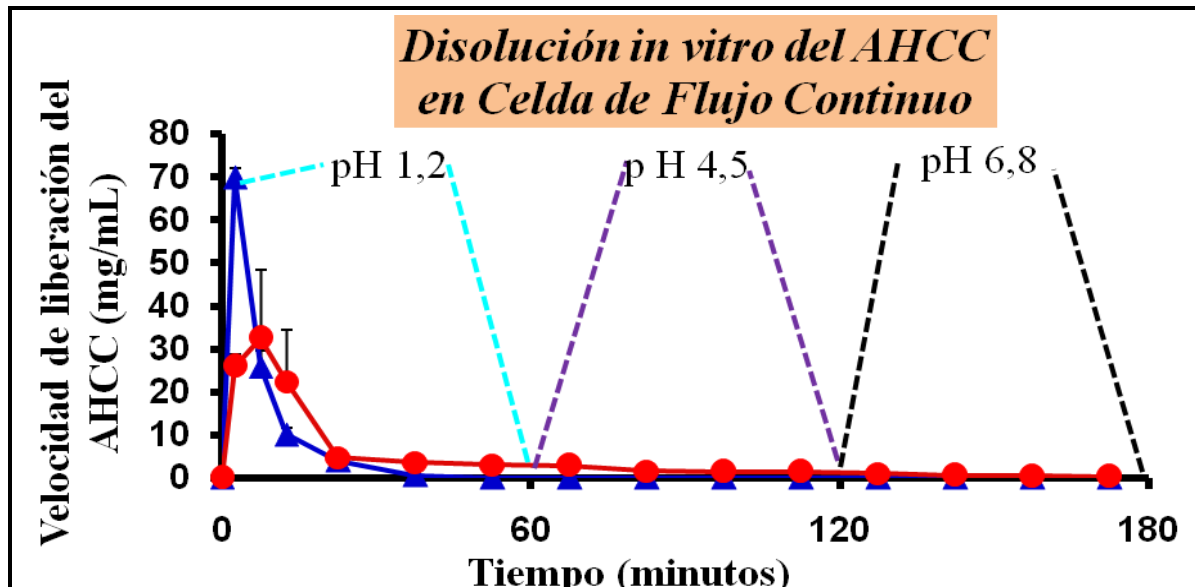


Figura 54. Muestra la velocidad de liberación (mg/ml) *in vitro* de **AHCC-FD** y **AHCC-FG** en función del tiempo, empleando diferentes pH.

3.4. CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* DEL AHCC

3.4.1. Estudio químico de la biodisponibilidad *in vivo* del AHC

Los resultados del estudio químico de la biodisponibilidad *in vivo* del AHC se agrupan en dos partes.

3.4.1.1. Glucemia después de la ingesta oral del AHCC-FD

Los resultados de la medida de glucosa se muestran en la tabla 53.

Tabla 53. Resultados de glucemia en tres voluntarios sanos.

| Glucemia (mg/dl) | | | |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Tiempo (min) | Voluntario 1 | Voluntario 2 | Voluntario 3 |
| 0 | 98 | 102 | 98 |
| 15 | 100 | 104 | 111 |
| 30 | 89 | 93 | 109 |
| 45 | 88 | 94 | 94 |
| 70 | 88 | 95 | 103 |
| 90 | 76 | 93 | 99 |
| 120 | 82 | 85 | 95 |

La medida promedio de glucosa en el momento "0" en condiciones de ayuno fue $99,3 \pm 2,3$ mg/dl. El valor máximo de glucemia en los tres voluntarios durante las 2 horas fue $105 \pm 5,6$ mg/dl. La ingesta oral de 5 g de AHCC-FD que se empleó en este experimento es equivalente a 930 ± 20 mg de glucosa.

La figura 55 muestra los cambios de glucemia observados en los tres voluntarios. Estos cambios en la glucemia, incluso después de la ingesta oral de 5 g de AHCC-FD, no son significativamente diferentes de glucemia basal (t-Student, $P < 0,05$) en los voluntarios sanos, incluso con una dosis alta del producto.

Por lo tanto, la glucemia no es un buen indicador de la biodisponibilidad *in vivo* del AHCC después de su ingestión oral.

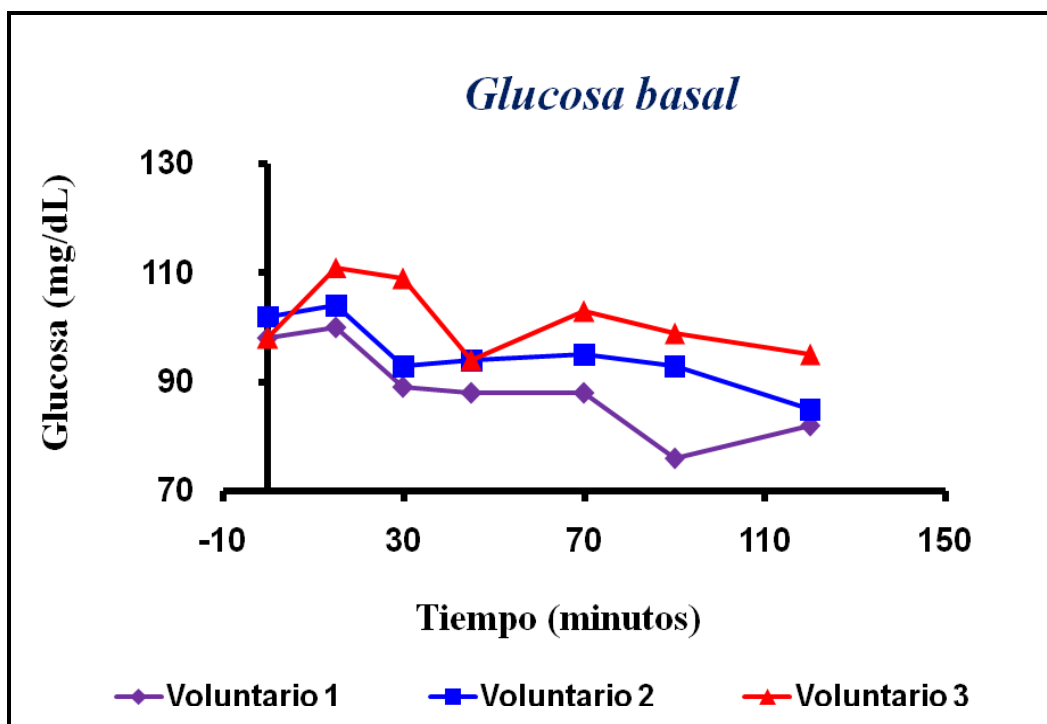


Figura 55. Resultados de glucosa basal en tres voluntarios sanos después de la ingesta oral del producto.

3.4.1.2. Análisis químico mediante HPLC de G₁, isomaltol y adenosina en muestras biológicas

El G₁ e Isomaltol fue analizado en plasma humano y de ratón mediante el método analítico optimizado por RP-HPLC. El AHCC-FD contiene una proporción muy pequeña de isomaltol libre, la mayor parte está presente como un glucósido soluble (G₁), el cuál no se detecta en ninguna de las muestras biológicas analizadas, el G₁ es un compuesto polar difícil de ser absorbido por vía oral. No es raro que este tipo de moléculas se hidrolice en el tracto gastrointestinal para producir isomaltol libre pudiendo producir tanto hidrólisis enzimática como no enzimática. La hidrólisis ácida es una reacción no enzimática común. Aunque inicialmente se detectó isomaltol libre en concentraciones muy bajas cuando esos experimentos se repitieron con una ingesta oral repartida en dos tomas de 2,5 g por voluntario dos veces al día (5 g/día) durante 7 días consecutivos en los tres voluntarios sanos, no se detectó isomaltol libre en las muestras de plasma humano, lo mismo ocurre para el G₁. Se obtuvieron resultados similares en ratones después de la administración oral del producto utilizando una sonda buco-gástrica.

Se concluyó que ni G_1 ni isomaltol son útiles como indicadores de la biodisponibilidad oral de formulaciones con AHCC.

Además, los resultados del método analítico desarrollado en condiciones isocráticas para estudiar la farmacocinética de la adenosina (presente en la composición del AHCC), relacionada con la actividad del producto mediante investigaciones realizadas por el Dr. Sato (ICNIM, congreso 2012), no detectaron esta molécula en las muestras biológicas. Desafortunadamente, la adenosina también es una sustancia endógena. Por lo tanto, la presencia de adenosina no puede ser solo relacionada con la ingesta del AHCC, además la adenosina tiene una rápida degradación *in vivo* (la vida media de esta molécula es de aproximadamente 2 minutos). Muchas sustancias químicas relacionadas con la adenosina están presentes en las muestras biológicas lo que complica su respectivo análisis de cuantificación *in vivo*.

3.4.2. Actividad antiparasitaria del AHCC en un modelo experimental de *Trichinella spiralis*

Los resultados de la actividad antiparasitaria del AHCC en un modelo experimental de ratón infectado con *Trichinella spiralis* se enumeran a continuación:

- **Primer experimento de la actividad en fase intestinal del AHCC**

Dosis ensayadas:

- ✓ Control
- ✓ AHCC (43 mg/Kg equivalente a la dosis en humanos de 0,24 g)
- ✓ Albendazol (ABZ), dosis única de 3,33 mg/Kg
- ✓ Combinación de ABZ (3,33 mg/Kg) + AHCC (43 mg/kg).

Los resultados se muestran en la tabla 54 y en la figura 56.

Tabla 54. Resultados del primer ensayo en fase intestinal del AHCC.

| Ratones | CONTROL DE INFECCIÓN | CONTROL DE TRATAMIENTO ABZ | AHCC | ABZ + AHCC |
|-------------|----------------------|----------------------------|-------|------------|
| 1 | 116 | 115 | 74 | 42 |
| 2 | 171 | 44 | 97 | 68 |
| 3 | 134 | 43 | 81 | 46 |
| 4 | 172 | 89 | 64 | 32 |
| 5 | 154 | 62 | 156 | 37 |
| 6 | 118 | 80 | 153 | 46 |
| 7 | 196 | 46 | 54 | 32 |
| 8 | 180 | | | |
| 9 | 169 | | | |
| 10 | | | | |
| MEDIA | 156,67 | 68,43 | 97,00 | 43,29 |
| DESVEST | 28,18 | 27,43 | 41,51 | 12,39 |
| % REDUCCION | | 56,32 | 38,09 | 72,37 |

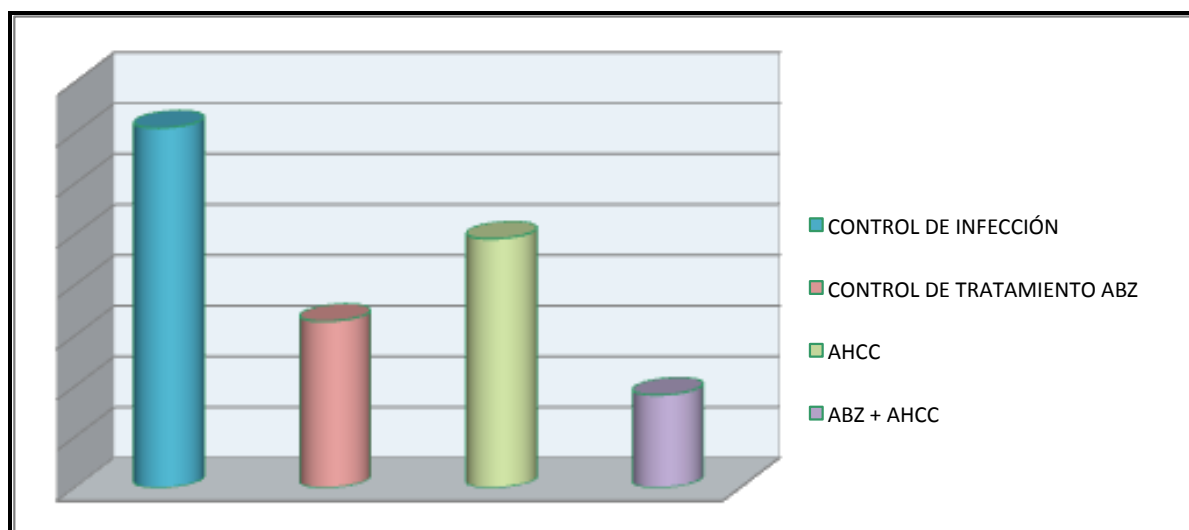


Figura 56. Porcentajes de reducción de parásitos frente a las dosis.

Con este experimento podemos comprobar que el AHCC por si solo ejerce un efecto antiparasitario, que se ve aumentado en dosis conjunta con albendazol (efecto sinérgico).

- **Ensayo de la actividad en fase intestinal del AHCC frente a un grupo control (optimización del modelo experimental)**

✓ **Dosis ensayada de AHCC:** 43 mg/kg

- ✓ El grupo control recibe el equivalente de AHCC pero en agua para someterlo a las mismas condiciones de estrés.

Los resultados se muestran en la tabla 55 y en las figuras 57 y 58.

Tabla 55. Resultados del ensayo en fase intestinal del AHCC frente a un grupo control.

| Ratones | Día 1 p.i. | | Día 3 p.i. | | Día 7 p.i. | | Día 10 p.i. | | Día 22 p.i. | |
|-------------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | CONTROL | AHCC | CONTROL | AHCC | CONTROL | AHCC | CONTROL | AHCC | CONTROL | AHCC |
| 1 | 83 | 130 | 163 | 151 | 178 | 114 | 4? | 106 | 0 | 0 |
| 2 | 77 | 108 | 145 | 195 | 207 | 68 | 127 | 32 | | |
| 3 | 159 | 121 | 109 | 191 | 96 | 130 | 79 | 4? | | |
| 4 | 51 | 153 | 155 | 133 | 159 | 116 | 115 | 52 | | |
| 5 | 91 | 110 | 112 | 121 | 158 | 161 | 97 | 43 | | |
| 6 | 90 | 114 | 151 | 156 | 157 | 105 | 35 | 106 | | |
| 7 | 91 | 93 | 179 | 101 | 189 | 96 | 57,5 | 133 | | |
| 8 | 104 | 89 | 142 | 150 | 213 | 101 | 40 | 128 | | |
| 9 | 87 | 114 | 178 | 125 | 182 | 73 | 57 | 120 | | |
| 10 | 163 | 165 | 163 | 184 | 160 | 108 | 83 | | | |
| MEDIA | 99,60 | 119,70 | 149,70 | 150,70 | 169,90 | 107,20 | 76,72 | 90,00 | 0,00 | 0,00 |
| DESVEST | 35,14 | 24,08 | 24,04 | 31,71 | 32,99 | 26,69 | 32,20 | 40,92 | 0,00 | 0,00 |
| % REDUCCION | | -20,18 | | -0,67 | | 36,90 | | -17,31 | 100,00 | 100,00 |

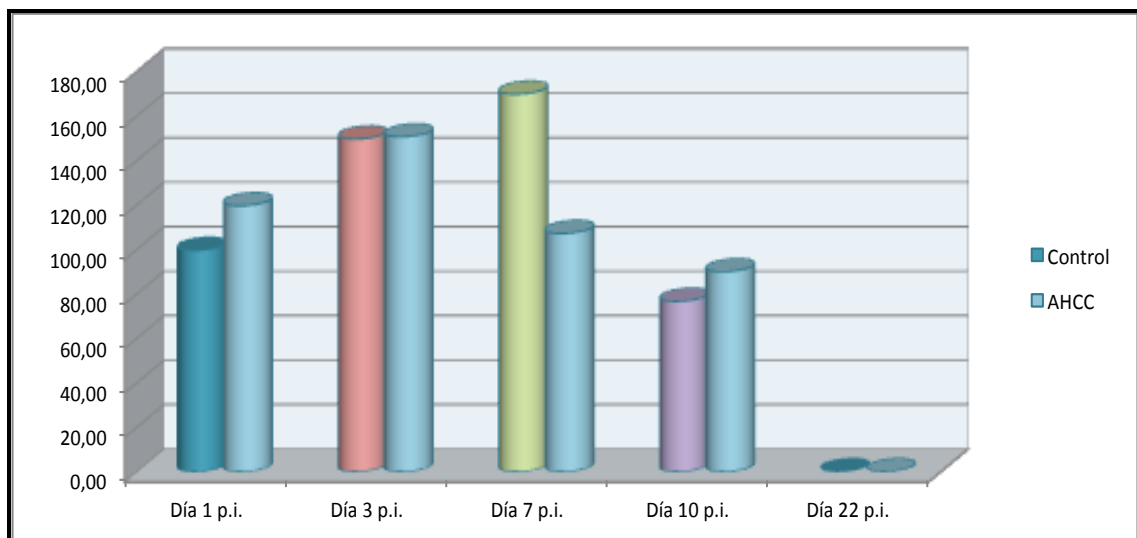


Figura 57. Porcentajes de reducción de parásitos del AHCC frente a un grupo control.

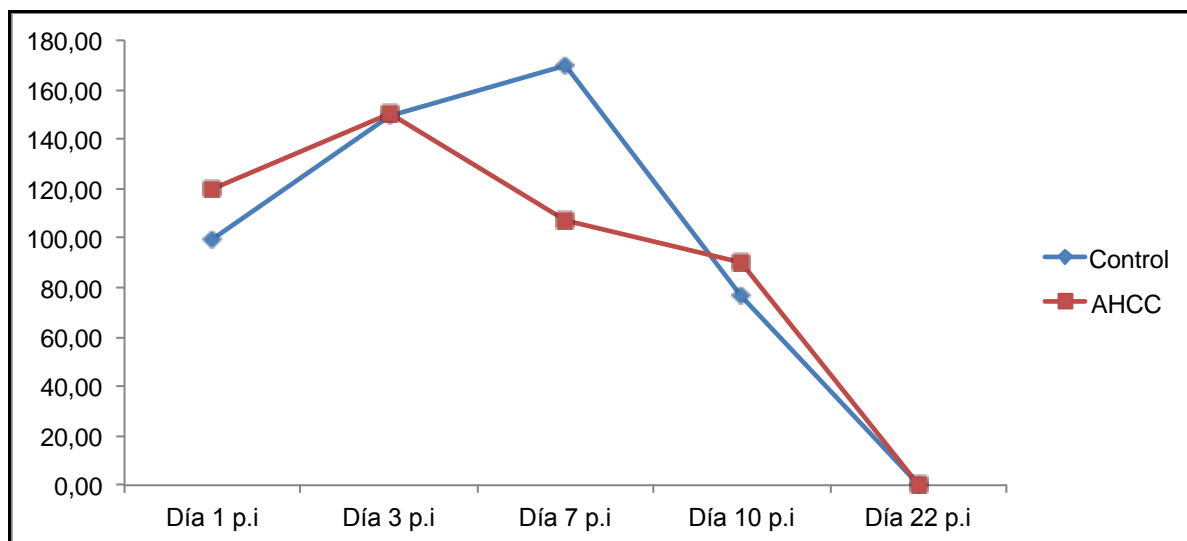


Figura 58. Evolución del número de gusanos en el intestino dependiendo de la infección tratamiento y post días.

Los resultados nos permiten observar que en el día 22 de tratamiento después de la infección no hay parásitos, entonces decidimos optimizar el modelo y acortar los días de tratamiento, planteamos una duración de los ensayos de 14 días previos de tratamiento (antes de la infección) y 7 días de tratamiento después de la infección, cambiamos la duración de los ensayos a 22 días en total.

Además, el efecto máximo se observó en el día 7 después de la infección. Debido a este resultado, la eficacia del tratamiento contra las fases de pre-adultos se evaluará en el día 7 después de la infección, después de sacrificar a los ratones, donde hemos observado la máxima actividad (%). La eliminación de *T. spiralis* comienza antes en el grupo tratado con AHCC que en el grupo control, este hecho se ha observado en tres experimentos independientes. La eficacia observada siempre ha sido muy similar: 36,7; 30,8 y 38,1%. Por lo tanto, el modelo parece ser muy reproducible.

Una posible explicación de la eliminación más rápida del parásito en el grupo tratado con AHCC que en el grupo control puede estar relacionado con un aumento en la transición de Th0 a la respuesta efectora de Th2. De alguna manera la estimulación producida por AHCC en la diferenciación de respuesta Th0 a Th2 parece ser la implicada en esta brusca reducción de la carga parasitaria,

produciendo en este modelo una aceleración en el proceso de expulsión de los adultos intestinales.

Los datos aportados por las muestras recogidas el día 10 después de la infección nos señalan un brusco descenso de la carga parasitaria en el grupo control, mientras que el grupo tratado con AHCC ve disminuido el número de adultos de forma escasa, presentado valores muy similares a los observado el día 7 después de la infección, esto podría deberse a un retraso en la eliminación de los adutos que finalmente consiguieron pasar el filtro del día 7 y debido a que en su proceso de eliminación modifican la respuesta de Th1 a Th2, este hecho podría derivar en una lucha por el equilibrio de respuestas, de forma que no se incremente la respuesta de eliminación de una manera tan marcada como en el grupo control.

- **Efecto de diferentes dosis en la actividad de AHCC**

El efecto de las diferentes dosis en la eficacia se estudio en dos experimentos. En el primero utilizando únicamente el criterio de peso para relacionar especie humana con ratón y cuyo resultados se muestran en la tabla 56. En el segundo experimento utilizamos la superficie corporal para relacionar las dos especies (tratamiento HED) y los resultados se muestran en la tabla 57. De los datos de la tabla 57 se hace un tratamiento estadístico cuyos resultados se muestran en la tabla 58.

Tabla 56. Resultados del efecto de diferentes dosis en la actividad del AHCC. Para facilitar la comparación de las tablas 52 y 53 las dosis utilizadas en el primer experimento se muestran con su equivalencia HED. Así 0,22 mg ratón Swiss CD-1 son 0,04 g humano; 0,44 mg ratón Swiss CD-1 son 0,08 g humano; 1,3 mg ratón Swiss CD-1 o Balb/c son 0,24 g humano; 1,9 mg ratón Swiss CD-1 son 0,32 g humano y 2,6 mg ratón Swiss CD-1 son 0,49 g humano.

| Animal | Control Inf. | Control ABZ | AHCC 0,04 g | AHCC 0,08 g | AHCC 0,24 g Balb/c | AHCC 0,24 g CD-1 | AHCC 0,32 g | AHCC 0,49 g |
|----------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------------|------------------|---------------|--------------|
| 1 | 192 | 1 | 45 | 216 | 109 | 206 | 209 | 131 |
| 2 | 104 | 8 | 231 | 149 | 143 | 162 | 118 | 81 |
| 3 | 200 | 0 | 52 | 69 | 92 | 102 | 114 | 65 |
| 4 | 217 | 16 | 70 | 92 | 123 | 100 | 85 | 79 |
| 5 | 140 | 33 | 113 | 123 | 75 | 132 | 154 | 58 |
| 6 | 244 | 3 | 85 | 66 | 49 | 54 | 145 | 82 |
| 7 | 109 | 21 | 189 | 95 | 32 | 98 | 98 | 126 |
| 8 | 210 | 15 | 83 | 121 | 82 | 93 | 142 | 42 |
| 9 | 120 | 6 | 221 | 162 | 141 | 151 | 148 | 80 |
| 10 | 192 | 70 | 89 | 47 | 85 | | 70 | 130 |
| Promedio | 172,80 | 17,30 | 117,80 | 114,00 | 93,10 | 122,00 | 128,30 | 87,40 |
| Desviación Estándar | 50,06 | 21,16 | 69,59 | 51,34 | 36,71 | 45,45 | 40,18 | 31,32 |
| Reduction (%) | | 89,99 | 31,83 | 34,03 | 46,12 | 29,40 | 25,75 | 49,42 |

Tabla 57. Efecto de diferentes dosis (en valores equivalentes humanos, HED) en la actividad de AHCC.

| Animal | Control | Placebo | 0,24 g | 0,5 g | 3 g | 3 g sobres | 6 g sobres |
|----------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | 116 | 65 | 34 | 70 | 54 | 58 | 33 |
| 2 | 136 | 154 | 119 | 43 | 47 | 52 | 86 |
| 3 | 120 | 233 | 57 | 117 | 64 | 79 | 64 |
| 4 | 139 | 58 | 96 | 31 | 69 | 110 | 32 |
| 5 | 89 | 105 | 75 | 88 | 70 | 50 | 64 |
| 6 | 137 | 142 | 100 | 133 | 98 | 61 | 96 |
| 7 | 99 | 56 | 78 | 43 | 68 | 48 | 43 |
| 8 | 140 | 144 | 68 | 77 | 59 | 135 | 92 |
| 9 | 101 | 99 | 32 | 84 | 76 | 42 | 40 |
| 10 | 107 | 151 | 53 | 89 | 35 | 49 | 61 |
| Promedio | 118,4 | 120,7 | 71,2 | 77,5 | 64,0 | 68,4 | 61,1 |
| Desviación estándar | 18,9 | 55,3 | 28,4 | 32,5 | 17,1 | 30,8 | 24,1 |
| % reducción | | -1,94 | 39,9 | 34,5 | 45,95 | 42,2 | 48,4 |

Tabla 58. Comparación estadística de los resultados obtenidos en la tabla 57.

| Comparación estadística | t-Student | | |
|-------------------------------------------|-------------|------------------|---------------|
| | | | |
| control vs placebo | 0,903282374 | No Significativo | |
| control vs 3 g MP | 0,000493448 | Significativo | |
| control vs HED 0,5 | 0,003847731 | Significativo | |
| control vs HED 3g | 2,70156E-06 | Significativo | |
| control vs HED 6 g sobre | 1,67637E-05 | Significativo | |
| control vs HED 3 g sobre | 0,00054954 | Significativo | |
| HED 3 g vs sobre 3 g | 0,698805198 | No Significativo | |
| Correlación de dosis f (número de larvas) | ANOVA | P=0,0003 | Significativo |

Los datos de la tabla 56 muestran claramente que el AHCC tiene un efecto significativo en la reducción del número de helmintos ($P=0,01$; Anova). Para la dosis equivalencia en humanos (HED) de AHCC (0,24 g) se utilizaron dos tipos de ratones: suizo y BALB/c. No se observó linealidad ($R=0,3$) entre las dosis administrada y la eficacia obtenida. Las figuras 60 y 61 muestran gráficamente los resultados obtenidos con las dosis equivalentes en humanos (HED).

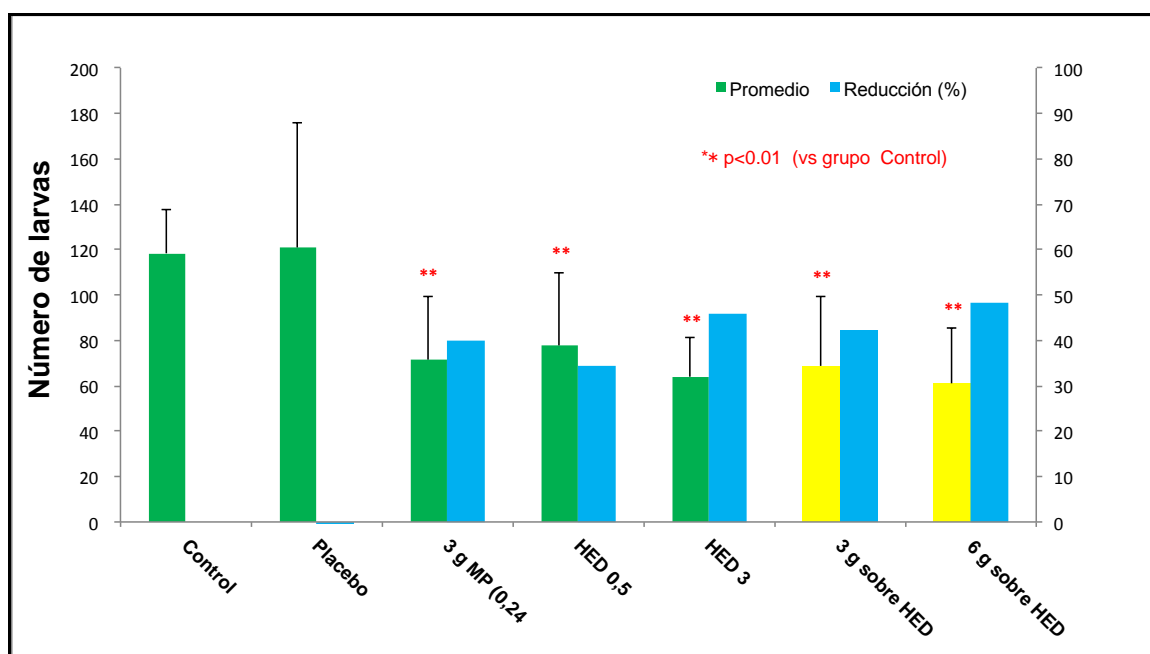


Figura 59. Número promedio de larvas en cada grupo (con desviación estándar) y la reducción obtenida en función del tratamiento del experimento dos (datos mostrados en tabla 57).

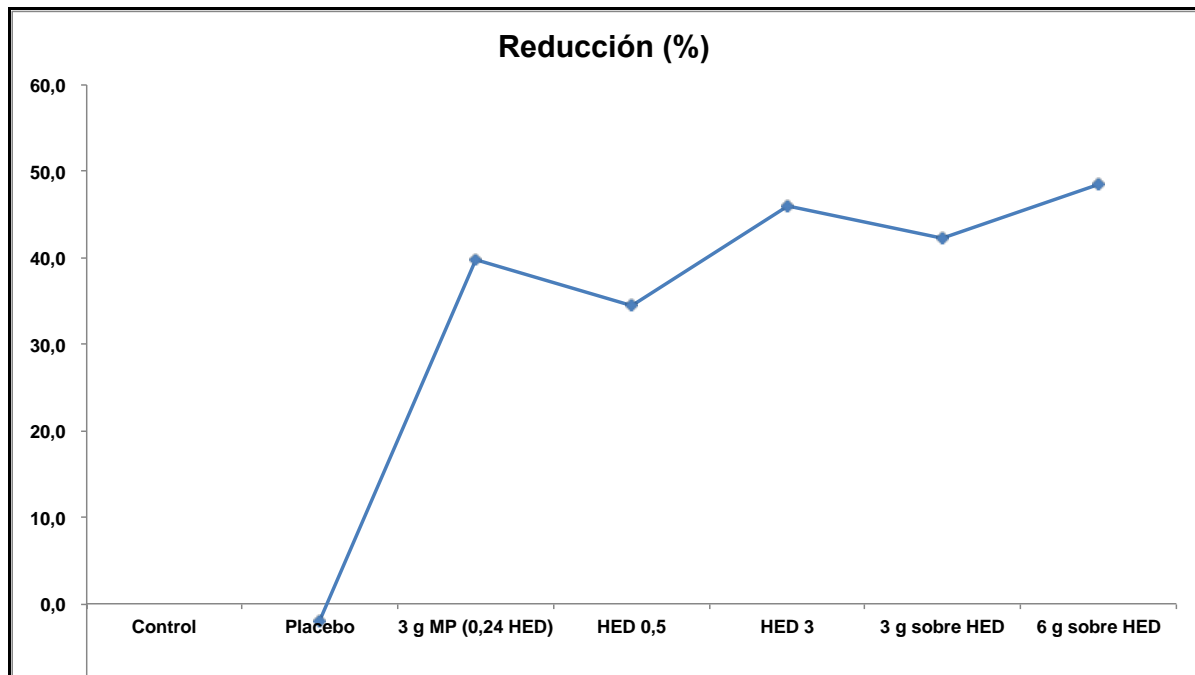


Figura 60. Reducción obtenida en función de la dosis utilizada en el segundo experimento.

De los experimentos anteriores podemos concluir que el AHCC disminuye significativamente ($P < 0,01$) el número de larvas. Incluso a dosis muy bajas de AHCC (equivalente a la dosis humana de 0,24 g). Existe una relación significativa ($P < 0,001$) entre la dosis y el número de larvas, aunque esta relación no es lineal. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,1$) entre la materia prima y la formulación de AHCC desarrollada para sobres. Esto podría sugerir una bioequivalencia *in vivo* entre los sobres y el producto. Aunque la falta de linealidad entre la dosis y la eficacia hace difícil la exactitud de biodisponibilidad.

- **Efecto inmunológico del AHCC en el modelo experimental de ratón con *T. spiralis***

Los resultados inmunológicos en los diferentes parámetros evaluados se muestran en las figuras 61-66.

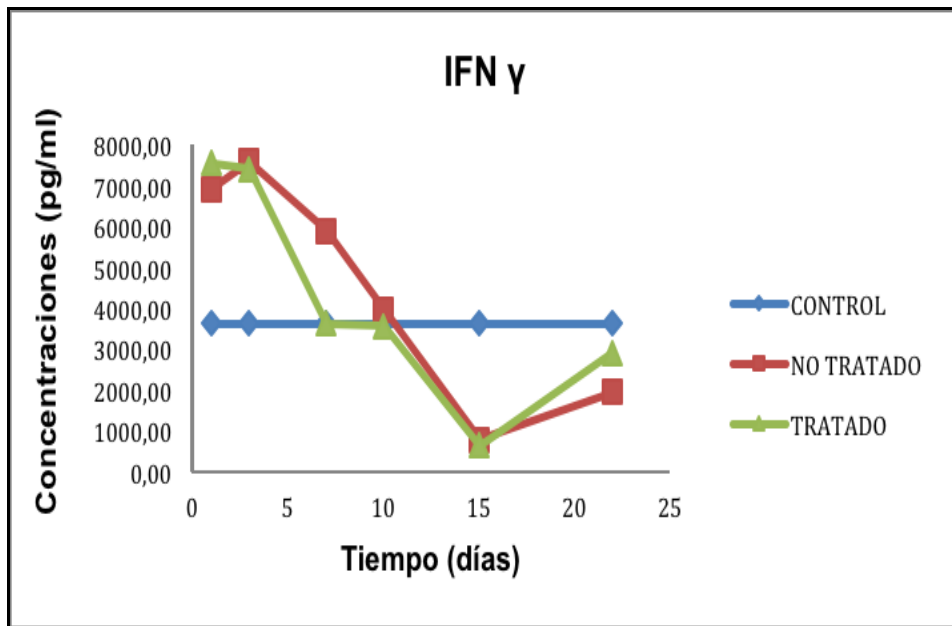


Figura 61. Media y desviación estándar de IFNY.

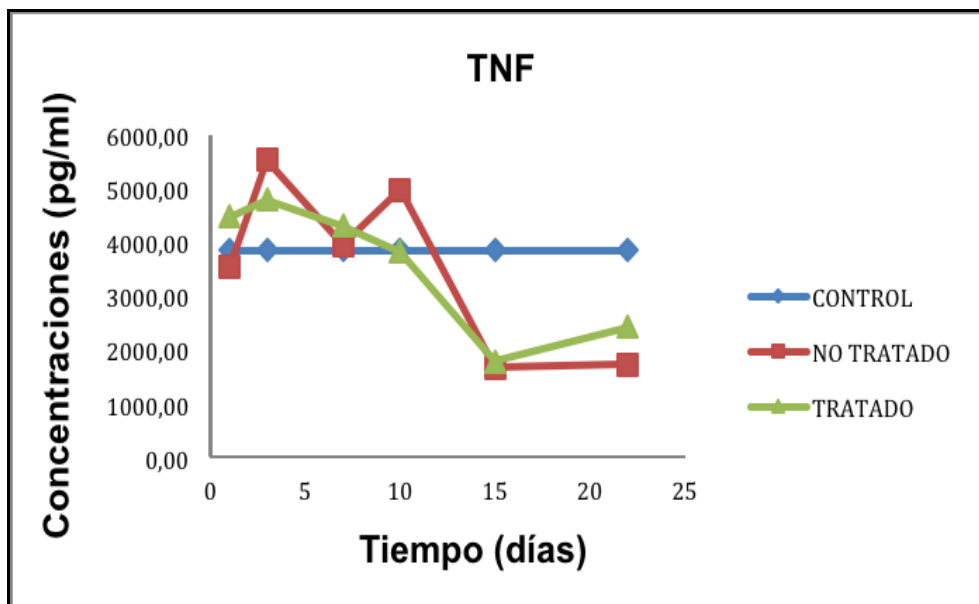


Figura 62. Media y desviación estándar de TNF.

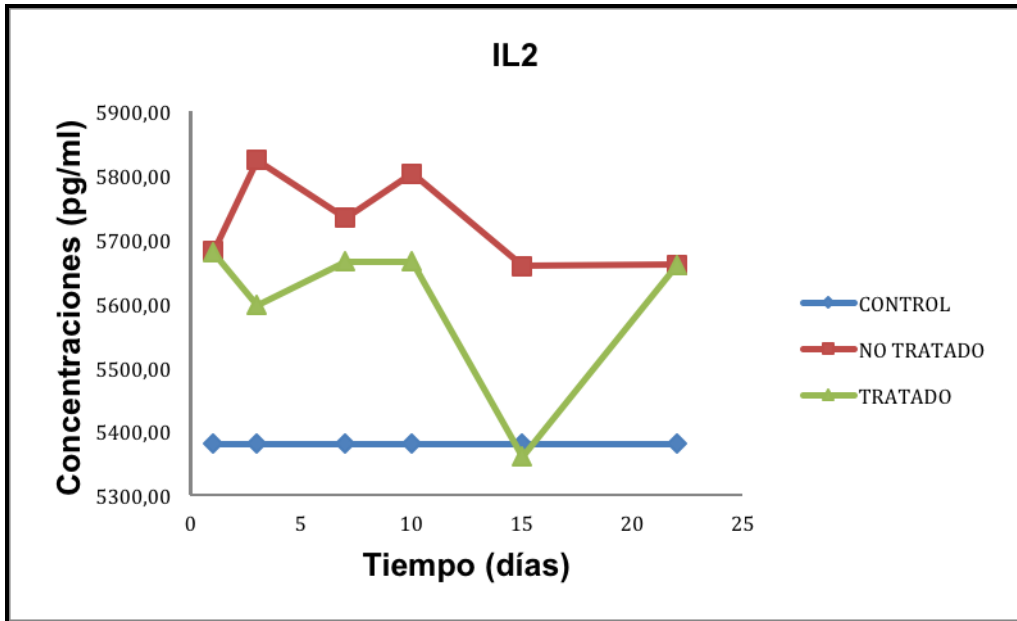


Figura 63. Media y desviación estándar de IL-2.

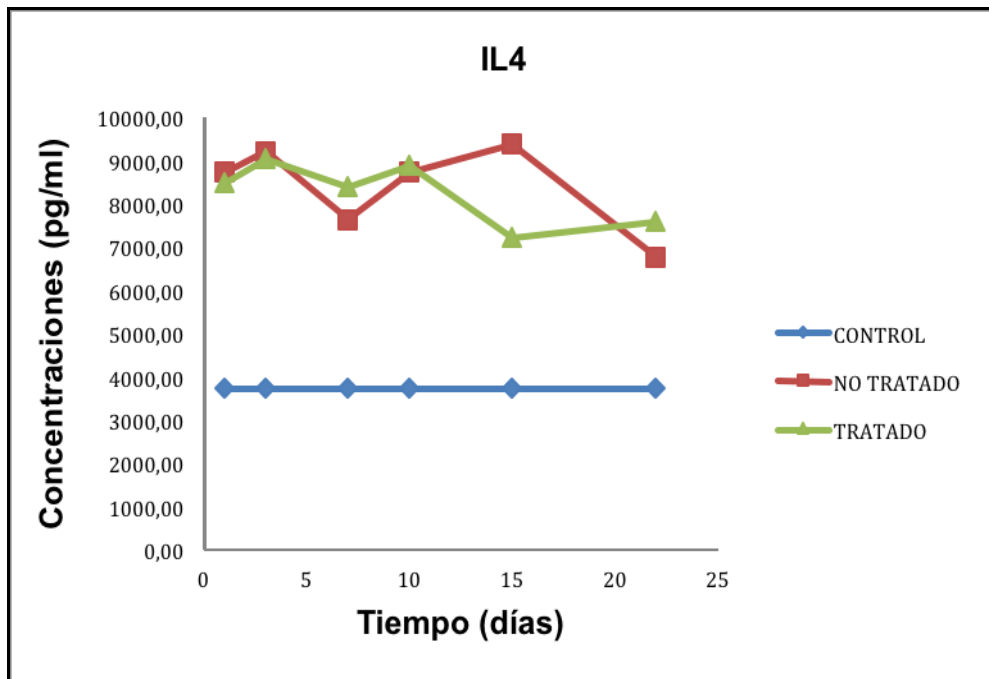


Figura 64. Media y desviación estándar de IL-4.

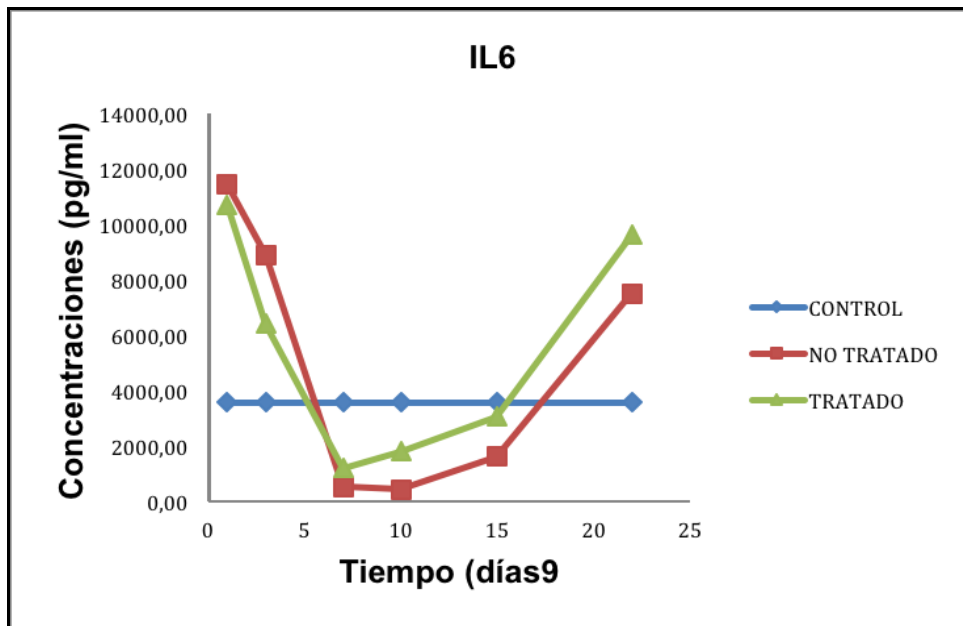


Figura 65. Media y desviación estándar de IL-6.

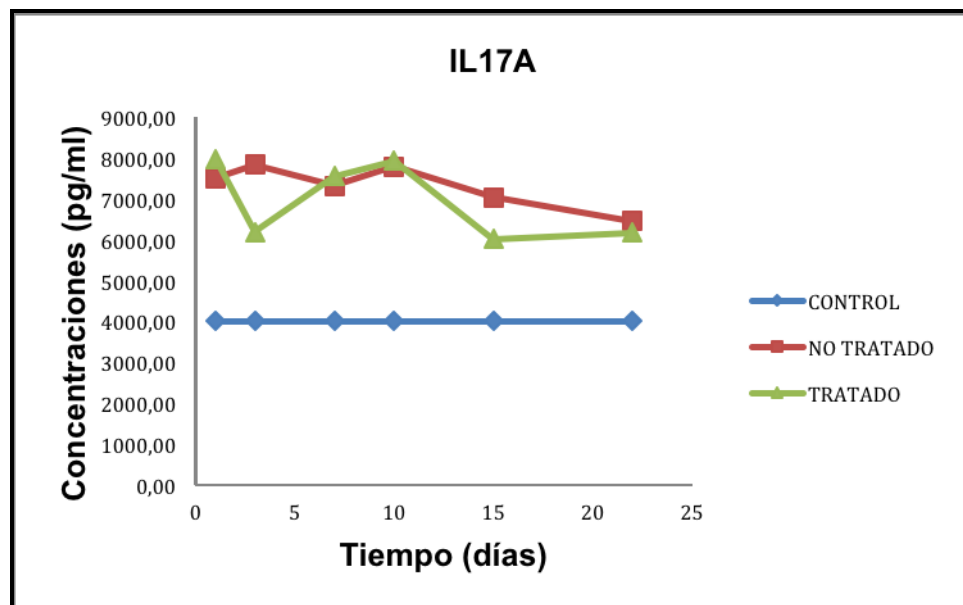


Figura 66. Media y desviación estándar de IL-17.

Estos resultados parecen indicar que en el modelo murino de *T. spiralis* el tratamiento con AHCC cambia ligeramente el comportamiento del sistema inmunitario, modificando algunos parámetros evaluados en relación con el grupo control. Posiblemente el comportamiento del parásito en la mucosa del intestino con el proceso de inflamación que genera, sea dependiente de una respuesta Th1,

una vez el parásito ha realizado la larviposición esta respuesta se modifica hacia una Th2 que favorece su expulsión. La administración de AHCC al grupo tratado parece promover una regulación más rápida de la respuesta Th1 observada por la evolución de los dos valores de TNF e IFN γ en comparación con el grupo no tratado.

Esta diferencia inmunológica entre los animales tratados y no tratados puede verse correlaciona con la reducción del número de parásitos observados en el día 7 (30% menor en el grupo AHCC que en el grupo no tratado). Al parecer, no existen diferencias relevantes en los valores de IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17 entre los animales tratados y no tratados.

4. Discusión final

4. DISCUSIÓN FINAL

El objetivo fundamental sobre el que se ha basado esta tesis doctoral ha sido desarrollar y caracterizar nuevas formulaciones hidrófilas de cápsulas, comprimidos y sobres conteniendo AHCC. Para ello, se ha realizado un desarrollo de formulaciones hidrófilas y caracterización farmacotécnica de las mismas, dando especial importancia a los estudios de estabilidad. Posteriormente, realizamos estudios de biodisponibilidad *in vivo* de las formulaciones y probamos su eficacia en un modelo experimental de ratón infectado con *T.spiralis*.

El AHCC es un producto con actividad inmunomoduladora, como lo demuestra la extensa bibliografía citada en esta tesis, que puede ser utilizado como una ayuda terapéutica para las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, incluidas las enfermedades del hígado, la diabetes; y en particular su uso como soporte en la inmunidad en pacientes con cáncer (Pescatore, 2010). A pesar de ser no estar comercializado como medicamento se fabrica de acuerdo a buenas prácticas de fabricación y siguiendo unas exigencias de control de calidad parecidas a un producto farmacéutico. Este producto tiene dos formas de presentación, una es el polvo liofilizado higroscópico (AHCC-FD) y la otra es el AHCC-FG (forma hidrófoba). En este trabajo hemos utilizado ambas presentaciones de AHCC, pero para elaborar las formulaciones hidrófilas utilizamos el polvo liofilizado (considerado materia prima), cuyo principal inconveniente es su alta higroscopicidad que produce problemas de estabilidad.

Previamente al desarrollo de las formulaciones hidrófilas, validamos un método analítico por espectrofotometría UV-Vis para la cuantificación del AHCC. Cuando ya teníamos el método validado, empezamos a desarrollar las diferentes formulaciones. Los excipientes utilizados en la elaboración de las formulaciones están aprobados para su uso en producto nutracéuticos en Europa, EE.UU. y Japón. Los estudios de estabilidad se desarrollaron siguiendo las directrices ICH Q2(R1) con dos condiciones de HR ($96\% \pm 5\%$; $75\% \pm 5\%$) y temperatura (ambiente y $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

De las formulaciones desarrolladas los sobres resultaron los más interesantes desde el punto de vista de comercialización por lo que la mayoría de los comentarios siguientes serán de sus características y estabilidad. La mayoría de los comentarios son sobre los datos mostrados en las tablas 47, 48 y 49. Las características *in vitro* evaluadas a las formulaciones fueron las siguientes:

- **Aspecto y disolución.** El proceso de apelmazamiento (aglomeración) depende claramente de las condiciones de humedad durante el almacenamiento. Si las condiciones de HR presentan valores iguales o por debajo de $75\% \pm 5\%$, todas las formulaciones con excepción de las cápsulas hidrófilas son aceptables durante varios años. Si la HR es $96\% \pm 5\%$ todas las formulaciones hidrófilas presentan aglomerados después de 24 meses, aunque está aglomeración no interfiere en la fácil dispersión del producto en agua, pero produce un color más oscuro en la disolución del producto. Esto es debido a la reacción de Maillard producida entre los azúcares y proteínas presentes en el AHCC. El color de las formulaciones fue dependiente de la proporción de AHCC en la muestra resultando en colores más oscuros en aquellas muestras con mayor dosis de AHCC. La reacción de Maillard se ha relacionado como posible causa de la coloración ocurrida durante el almacenamiento de las formulaciones. El color del producto tiende a ser más oscuro que el inicial cuánto mayor es el tiempo de almacenamiento de las muestras, este cambio de color debe tenerse en cuenta para establecer la fecha de caducidad del producto.

- **pH.** Según la bibliografía (Fujii y cols., 2011) la disolución de AHCC-FD tiene un pH entre 3,7- 4,5. En nuestros experimentos las formulaciones desarrolladas con diluyente hidrófilo tipo B (GalenIQ® 800) y envasadas en sobres de aluminio-aluminio tienen un pH entre 4,0 - 4,6. Si se envasan en bolsas transparentes de PVC con sistema de autocierre a presión, el pH aumenta a 4,5 - 4,6. Si el isomalt se sustituye por isomaltulosa el pH está entre 4,4 - 4,7. La disolución acuosa de la materia prima tiene un pH muy similar a la formulación elaborada para sobres.

- **Pérdida de peso (expresado en porcentaje).** Este parámetro está relacionado con el contenido de agua de los productos. Obviamente, la formulación hidrófoba

japonesa comercializada (AHCC-FG), claramente presentó menor pérdida de peso por desecación, solo un 1% mientras que las formulaciones hidrófilas desarrolladas para sobres (véase tablas 47-49) tuvieron una pérdida de peso entre 2,6 y 5,4%. Incluso en condiciones de HR alta ($96\% \pm 5\%$), el contenido de agua en los sobres está por debajo de 5,4%.

- **Contenido de G_1 .** Este parámetro es un indicador de estabilidad de la formulación ya que el contenido en agua produce degradación en la muestra. El pico de G_1 disminuye con el transcurso del tiempo en una disolución acuosa del producto. Es importante señalar que la actividad del AHCC no está relacionada únicamente al contenido de G_1 . Por lo tanto, este parámetro no solo se debe utilizar para una medición indirecta de la potencia del AHCC en la formulación. El contenido de G_1 es una manera fácil de comparar la estabilidad y características de las diferentes formulaciones. En el estudio de los datos de G_1 mostrados en las tablas 47, 48 y 49 parece que el contenido de G_1 depende más de la formulación en sí que de las condiciones de almacenamiento. El mejor resultado del contenido de G_1 se obtuvo con formulaciones hidrófobas de sobres. La dosis de AHCC está inversamente relacionada con el contenido de G_1 . Las formulaciones que contienen dosis de 0,6 g de AHCC tienen mayor proporción de G_1 que las que contienen 1,8 g.

- **Efecto del envase (sobres de Al-Al frente a bolsas transparentes de PVC).** Un tratamiento estadístico (t-Student) muestra que el pH fue significativamente mayor ($P=0,0001$) para muestras almacenadas en bolsas transparentes de PVC en comparación con las mismas muestras almacenadas en sobres de Al-Al a igualdad de condiciones de estabilidad. No se observaron efectos significativos ($P>0,05$) para la pérdida de peso o el contenido de G_1 .

- **Efecto de la dosis del AHCC en la formulación.** La comparación estadística de formulaciones (que solo varían en la dosis de AHCC) muestra que existe efecto estadísticamente significativo ($P<0,01$) de la dosis del AHCC en el contenido de G_1 . Cuanto menor es la dosis mayor es el porcentaje de G_1 presente en el producto.

No se detectaron ($P > 0,05$) efectos significativos para el pH y la pérdida de peso por desecación.

- Efecto de la cantidad de diluyente hidrófilo (isomalt) en la formulación.

Comparamos datos de formulaciones con diferentes cantidades de isomalt en su fórmula. Cuanto mayor sea la cantidad de isomalt mayor es la proporción de G_1 presente en la formulación. Al comparar formulaciones (tablas 47-49) que tienen más isomalt con otras que presentan menos isomalt, las formulaciones con mayor contenido de diluyente hidrófilo tienen casi el doble de contenido de G_1 que las otras (16,4% frente a 8,6%) siendo este resultado estadísticamente significativo ($P = 0,02$). Asimismo, a mayor cantidad de G_1 el pH de la formulación es significativamente inferior ($P < 0,0001$) y la pérdida de peso es significativamente ($P = 0,04$) más alta. Una posible explicación es que el isomalt tiene un pH más bajo y mejores características de absorción de humedad que el AHCC.

- Efecto del tipo de diluyente: Isomalt frente a isomaltulosa. Se compararon formulaciones en las cuáles solo se había sustituido un diluyente por el otro. La elección del tipo de diluyente no es estadísticamente significativa ($P = 0,8$) para el contenido de G_1 presente en la fórmula, aunque es estadísticamente significativa ($P < 0,01$) tanto para el pH como para la pérdida de peso, muestras con isomalt tienen valores de pH y pérdida de peso inferiores que las muestras con isomaltulosa.

- Efecto de la temperatura sobre las formulaciones. Para estudiar el posible efecto de la temperatura sobre las formulaciones hidrófilas para sobres, se compararon estadísticamente (t-Student) características de sobres almacenados a temperatura ambiente no controlada (aproximadamente 20°C) frente a sobres conservados a temperatura controlada de $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. La tabla 59 muestra los datos promedios y desviación estándar, en ambas condiciones. De lo observado en la tabla 59 se desprende que el aumento de la temperatura disminuye significativamente la pérdida de peso (humedad) y el pH aunque no se observó un efecto significativo en el contenido de G_1 .

Tabla 59. Efecto de la temperatura en la calidad de los sobres con AHCC.

| Condiciones de almacenamiento | G ₁ (%) | pH | Pérdida de peso (%) |
|-------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| Temperature ambiental | 10,7 _± 6,8 | 4,4 _± 0,2 | 4,5 _± 0,7 |
| 30°C y HR 75% | 15,2 _± 11,7 | 4,2 _± 0,1 | 3,9 _± 0,9 |
| t-Student | NS (P>0,05) | S (P<0,001) | S (P<0,001) |

- **Efecto de la humedad sobre las formulaciones (HR de 75% ± 5% frente a 96%± 5%).** Para estudiar el posible efecto de la humedad relativa sobre la calidad de las formulaciones hidrófilas se compararon estadísticamente (t-Student) características de sobres almacenados en diferentes condiciones de HR. A continuación en la tabla 60 se muestran los resultados de esta comparación estadística (t-Student). Se obtuvo una relación no significativos (P>0,1) entre las variables evaluadas. Sin embargo, es importante señalar que en todas las muestras de sobres almacenadas a 96% ± 5% se observó el efecto de apelmazamiento en su contenido posterior a 24 meses de almacenamiento. Aunque este cambio no es suficiente para comprometer los valores G₁, siendo su valor promedio mayor en condiciones de HR extrema, este efecto de apelmazamiento es evidente para el consumidor.

Tabla 60. Efecto de la HR en la calidad de los sobres con AHCC.

| Condiciones de almacenamiento | G ₁ (%) | pH | Pérdida de peso (%) |
|-------------------------------|--------------------|------------|---------------------|
| RH 75% ± 5% | 17,5 ± 11,5 | 4,2±0,1 | 4,1±0,7 |
| RH 96% ± 5% | 20,4±14,3 | 4,2±0,1 | 4,6±0,6 |
| t-Student | NS (P=0,08) | NS (P=0,6) | NS (P=0,07) |

De todas las formulaciones hidrófilas desarrolladas y evaluadas la que presenta las mejores características farmacotécnicas y de estabilidad durante 24 meses es la formulación para sobres con 0,6 g de AHCC, de peso final 3,13 g.

Uno de los problemas típicos de los productos naturales y presentes en el AHCC, y uno de los más importantes, en nuestra opinión el aspecto clave, es el desconocimiento de cuál es el componente activo del producto. En el caso del AHCC su actividad se relaciona con sus polisacáridos entre los que están β -glucanos y α -glucanos, éstos últimos parcialmente acetilados. Normalmente son los α -glucanos parcialmente acetilados y de bajo peso molecular los que se asocian con su actividad. Este tema se suele tratar en los congresos sobre Nutrición y Medicina (International Congress on Nutrition and Integrative Medicine) que auspicia la empresa Amino Up Chemical en Sapporo. Estudios presentados en dicho congreso (Sato y cols., 2012; Sato y cols., 2010), intentan aclarar que fracciones extraídas del AHCC son las activas y su relación con otras sustancias por ejemplo la adenosina. Desde el punto de vista de formulación el desconocimiento exacto del compuesto activo dificulta su cuantificación directa y el análisis de su estabilidad química y por lo tanto también de los estudios convencionales de biodisponibilidad química. Esto obliga a hacer estudios indirectos de caracterización química, por ejemplo en base a la cantidad de isomaltol presente en el AHCC. Otro importante problema del AHCC es cómo medir su actividad en un organismo para poder hacer un estudio de biodisponibilidad farmacodinámica lo que nos condujo a estudiar en un modelo animal su actividad.

Los estudios *in vivo* se pueden dividir en dos partes:

1.- Análisis químico de los niveles de glucosa, G_1 e isomaltol después de la administración oral del AHCC en seres humanos y ratones. La glucemia basal no se vió afectada por la administración oral del AHCC a una dosis de 5 g de AHCC-FD (t-Student, $P < 0,05$). Por lo tanto, la glucemia no es un buen indicador de la biodisponibilidad oral después de la ingesta de AHCC. Por otra parte, el análisis de G_1 e isomaltol en plasma humano y de ratón mediante HPLC no detectó la presencia de estos componentes en las muestras biológicas evaluadas.

El G_1 es un compuesto polar difícil de ser absorbido por vía oral. No es raro que este tipo de moléculas se hidrolice en el tracto gastrointestinal para producir isomaltol libre. En vista de los resultados, se concluyó que ni G_1 ni isomaltol son

útiles como indicadores de la biodisponibilidad oral después de la ingesta de formulaciones con AHCC.

Por otro lado, se intentó utilizar el análisis de adenosina por HPLC como indicador de biodisponibilidad como ha sugerido (Sato y cols., 2012). Desafortunadamente las concentraciones encontradas en las muestras biológicas presentan mucha variabilidad debido a que la adenosina es también un compuesto endógeno y con una semivida muy corta. Por todas estas razones también se descarto la adenosina como indicador de biodisponibilidad oral de AHCC.

Tras estos experimentos iniciales, se dedujo que no es sencillo determinar la biodisponibilidad oral del producto basado en el análisis de sus componentes químicos especialmente cuando se desconoce exactamente cuáles son los compuestos activos. Primero se tiene que aclarar cuáles son los componentes activos, quizás utilizando técnicas de cromatografía de masas. Por esta razón y con los recursos que teníamos decidimos usar un modelo *in vivo* biológico basado en el modelo experimental de ratón infectado con *T. spiralis* para probar la actividad del AHCC. La idea fue correlacionar la actividad observada con la biodisponibilidad del producto.

2.- Actividad antiparasitaria del AHCC en el modelo experimental de ratón infectado con *T. spiralis*. La administración única del AHCC fue útil en el tratamiento de la infección por *T. spiralis* observándose un efecto más potente tras la administración conjunta con albendazol (efecto sinérgico). El AHCC disminuyó significativamente ($P < 0,01$) el número de adultos. Curiosamente, la actividad fue evidente incluso a dosis muy bajas del AHCC (equivalente a la dosis humana de 0,04 g).

Se observó una relación significativa ($P < 0,01$) entre la dosis y el número de adultos aunque dicha relación no fue lineal.

Cuando se comparó la eficacia obtenida con la formulación desarrollada de sobre con la materia prima no se observaron diferencias significativas ($P > 0,1$) a las dosis de 3 y 6 g. Esto podría sugerir una bioequivalencia farmacodinámica. Sin embargo, la falta de linealidad entre la dosis y la eficacia hacen complejo conocer con exactitud la biodisponibilidad.

La actividad de AHCC se debe a su efecto en el sistema inmunológico tal y como se ha descrito en detalle en la revisión bibliográfica de esta tesis. Parte de esta actividad inmunológica se relaciona con los oligosacáridos del AHCC, entre otros α -glucanos y β -glucanos (Estrada y cols., 1997; Hoshi y cols., 2005; Bittencourt y cols., 2006; Nisini y cols., 2007; Gerosa y cols., 2008). El AHCC tiene efecto inmunomodulador (Terakawa y cols., 2008; Hoshi y cols., 2005; Ritz, 2008; Terakawa y cols., 2008).

El AHCC promueve las respuestas celulares de los linfocitos Th (Th 1 y Th 17) a través de la inducción de la producción de IL-1 β por monocitos en humanos (Lee y cols., 2012). Las células Th 1 frenan eficazmente microorganismos intracelulares como bacterias y virus mediante la activación de IFN- γ . Las células Th 17 desempeñan un papel importante en la eliminación extracelular de bacterias y hongos mediante la expansión y activación de neutrófilos con IL-17 y los parásitos son controlados por las células Th 2 que producen IL-4 e IL-13 que pueden activar eosinófilos. El desarrollo de los diferentes subconjuntos de células Th es dependiente de las citocinas del medio (Zhu y cols., 2010; Murphy y cols., 2010). El IFN- γ e IL-12 inducen la diferenciación de las células Th 1, mientras que IL-4 promueve el desarrollo de las células Th 2.

En cuanto a su efecto a nivel inmune, en el modelo experimental ensayado, se observaron cambios en los valores de TNF e IFN γ lo que sugiere que el sistema inmune responde generando linfocitos Th1. Intentando explicar lo que ocurre a nivel inmune en el modelo experimental podemos afirmar lo siguiente:

- ✓ Tras el sacrificio y recuento del primer día después de la infección, se observa un ligero incremento del número de adultos en el intestino de los

ratones previamente tratados con AHCC, este dato no es extraño ya que AHCC puede estimular un tipo de respuesta Th1, la misma que inicialmente genera *T. spiralis* de forma que se puede estar generando un entorno adecuado para el asentamiento de los parásitos.

- ✓ Mientras que en el día 1 y 3 no se observaron diferencias significativas en el asentamiento de adultos en el intestino en el día 7 después de la infección se observa un descenso del 36,7% en el número de adultos asentados en la mucosa en el grupo tratado con AHCC frente a los recuentos realizados en el grupo control. Esta reducción se volvió a comprobar en estudios posteriores con porcentajes de reducción entre 30,8 y 38,1.

- ✓ De alguna manera la estimulación producida por AHCC en la diferenciación de respuesta Th0 a Th2 parece ser la implicada en esta brusca reducción de la carga parasitaria, produciendo en este modelo una aceleración en el proceso de expulsión de los adultos intestinales.

El proceso inmunológico mediante el cual actúa el AHCC es una línea de investigación que continúa activa en varios centros de investigación.

5. Conclusiones

CONCLUSIONES

1.- Se han desarrollado y caracterizado nuevas formulaciones hidrófilas de AHCC en cápsulas, comprimidos y sobres.

2.- El principal inconveniente detectado durante los estudios de estabilidad es la tendencia al apelmazamiento observado en la formulación hidrófila para sobres. Dicho apelmazamiento tiene lugar en condiciones extremas de HR ($96\% \pm 5\%$) y después de 24 meses, siendo fácilmente reversible ya que las formulaciones se dispersan y solubilizan en un medio acuoso. Por lo tanto, sugerimos como fecha de caducidad 24 meses.

3.- Desde el punto de vista químico y basándonos en el compuesto G_1 estudiado como indicador de estabilidad, la cantidad de AHCC presente en la formulación influye en su propia estabilidad. Dosis altas presentan un mayor porcentaje de degradación que dosis bajas. De la misma manera cuanto mayor sea el porcentaje de excipiente en la formulación menor es la degradación observada.

4.- La mejor formulación desarrollada para sobres desde el punto de vista de estabilidad tiene una dosis relativamente baja de AHCC (0,6 g) con una gran cantidad de excipientes dando lugar a un peso final de granulado de 3,13 g. Como material de acondicionamiento se utilizan sobres de aluminio-aluminio y se recomienda evitar ambientes excesivamente húmedos.

5.- Las características *in vivo* de AHCC se evaluaron mediante el análisis de alguno de sus componentes: glucosa, G_1 e isomaltol después de la administración oral de formulaciones de AHCC. No se detectó efecto hiperglucemiante incluso después de la administración oral de dosis de hasta 5 g de AHCC-FD a voluntarios sanos en condiciones de ayuno. Tampoco se detectó G_1 e isomaltol en las muestras de plasma después de la administración oral de AHCC en seres humanos y ratones. Se concluye por lo tanto que estas moléculas no sirven como indicadores de su posible absorción en estudios de biodisponibilidad.

6.- En el estudio de actividad antiparasitaria se observó que el AHCC es útil por si solo para disminuir la carga parasitaria en un modelo murino de triquinelosis. La administración de AHCC reduce el número de parásitos en la fase intestinal y la inflamación valorada como disminución de la respuesta Th1 cuantificada por las interleucinas: TNF e IFN γ , en comparación con el grupo control no tratado.

7.- No se encontraron diferencias significativas en la actividad entre la administración de la misma dosis de materia prima (AHCC-FD) y la formulación desarrollada para sobres por lo que se concluye que hay bioequivalencia farmacodinámica.

6. Bibliografía

A'Hern R.P., Smith I.E. y Ebbs S.R. "Chemotherapy and survival in advanced breast cancer: the inclusion of doxorubicin in Cooper type regimens". *British Journal of Cancer*. 67 (1993): 801-805.

Aboul-Ayfa N. y Denhan D.A. "The effect of 5-benzimidazo-2-(4-thiazolyl) benzimidazole on *Trichineila spiralis*". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72(6) (1978): 611-672.

Adlerberth I., Carlsson B., de Man P., Jalil F., Khan S.R., Larsson P., Mellander L., Svanborg C., Wold A.E. y Hansson L.A. "Intestinal colonization of enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital delivered children". *Acta Paediatrica Scandinavian*. 80 (1991): 602-610.

Ali B.H. y Al Moundhri M.S. "Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: A review of some recent research". *Food and Chemical Toxicology Journal*. 44 (2006): 1173-1183.

Alvarez A., Aguirre F., Lastra J.D., Del Barrio R. y Delgado-Rodriguez M. "Incidencia del cáncer de mama en Cantabria años 1993-1994". *Aumento anual. Revista de Senología y Patología Mamaria*. 9(4) (1996):164-166.

Ambrosioni J., Cecchini D., Castellano P., Biscione F., Lloveras S. y Orduna T. "Triquinosis: Aspectos epidemiológicos clínicos y de laboratorio. Estudio retrospectivo a 10 años (1994-2003)". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 24(7) (2006): 440-444. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

Anthony B. Shephard, Steven C. Nichols, Alan Braithwaite. Moisture induced solid phase degradation of L-ascorbic acid part 2, separation and characterization of the major degradation product. *Talanta* 48 (1999): 595-606.

Arribas M. B. Tesis doctoral: "Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune". Universidad de Granada, Granada, 2009.

Auffray C., Sieweke M.H. y Geissmann F. “Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells”. *Annual Review Immunology*. 27 (2009): 669-692.

Aulton M.E. “La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas”. Segunda Edición, editado por Elsevier España, S.A.

Aviles H., Belay T., Fountain K., Vance M. y Sonnenfeld G. “Increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection under hindlimb unloading conditions”. *Journal of Applied Physiology*. 95 (2003): 73-80.

Aviles H., Belay T., Vance M., Sun B and Sonnenfeld G. “Active hexose correlated compound enhances the immune function of mice in the hindlimb-unloading model of spaceflight conditions”. *Journal of Applied Physiology* 97 (2004): 1437-1444.

Aviles H., O'Donnell P., Orshal J., Fujii H., Sun B. y Sonnenfeld G. “Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection”. *American Journal of Surgery*. 195 (2008): 537-545.

Aviles H., O'Donnell P., Sun B. y Sonnenfeld G. “Active Hexose Correlated Compound (AHCC) Enhances Resistance to Infection in a Mouse Model of Surgical Wound Infection”. *Surgical Infections*. 6(7) (2006): 527-535.

Backwinkel K. P. y Themann H. “Elektronenmikroskopische untersuchungenber die pathomorphologie der Trichinellose”. *Beitr Pathology Anatomy Journal*. 146 (1972): 259-271.

Banchereau J. y Steinman R.M. “Dendritic cells and the control of immunity”. *Nature*. 392 (1998): 245-252

Barnes M.N., Grizzle W.E., Grubbs C.J. y Partridge E.E. “Paradigms for primary prevention of ovarian carcinoma”. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 52 (2002): 216-225.

Barnhill D.R., Kurman R.J., Brady M.F., Omura G.A., Yordan E., Given F.T., Kucera P.R. y Roman L.D. “Preliminary analysis of the behavior of stage I ovarian serous tumors of low malignant potential: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal Clinical Oncology*. 13 (1995): 2752-2756.

Beasley D.W., Li L., Suderman M.T. y Barrett A.D. “Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype”. *Virology*. 296 (2002): 17-23.

Becerril M.A. “Trichinellosis parasitología médica”. Capítulo 34. En: De la Rosa A.J., Gómez P.A., 2da ed., Mc Graw-Hill Interamericana., p. 208-213. 2004 Bekisk O., Ya L., Burak I.I. y Kolosova M.O. “A search for active preparations in the carbamate benzimidazole group for the therapy of trichinelliasis”. *Medical Parasitology*. 48(4) (1979): 32-35.

Belanger J. “An in-office evaluation of four dietary supplements on natural killer cell activity”. *TOWNSEND LETTER*. (2005): February/March, 88–92.

Belay T., Aviles H., Vance M., Fountain K. y Sonnenfeld G. “Effects of the hindlimb-unloading model of space flight conditions on resistance of mice to infection with *Klebsiella pneumoniae*”. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 110 (2002): 262-268.

Bell R.G. “Genetics of adult *Trichinella spiralis* rejection during primary infection”. In trichinellosis. (ICT 6) C. Kim (Ed.) State University of New York Press, Albany, pp. 77-83. 1985.

Benedetti Panici P., Greggi S., Scambia G., Baiocchi G., Lomonaco M., Conti G. y Mancuso S. “Efficacy and toxicity of very high-dose cisplatin in advanced ovarian carcinoma: 4-year survival analysis and neurological follow-up”. *International Journal of Gynecological Cancer*. 3 (1993): 44-53.

Berrozpe D. y Martínez L. Biofarmacia y Farmacocinética, Vol. II. Biodisponibilidad, páginas (19-39), 1998.

Bittencourt V.C., Figueiredo R.T., da Silva R.B., Mourao-Sa D.S., Fernandez P.L., Sasaki G.L., Mulloy B., Bozza M.T. y Barreto-Bergter E. “An alphasialin of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation”. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (2006): 22614-22623.

Bruce R.G. “The formation and utilization of schistosome secretory globules in *Trichinella spiralis*”. In *Trichinellosis*. (ICT6) C. Kim (Ed.) Intext Educational Publishers, New York, pp. 43-48.1974.

Bunn P.A. “Combination paclitaxel and platinum in the treatment of lung cancer: US experience”. *Seminars in Oncology*. 23 (1996): 9-15.

Burikhanov R.B., Wakame K., Igarashi Y., Wang S. y Matsuzaki S. “Suppressive effect of active hexose correlated compound (AHCC) on thymic apoptosis induced by dexamethasone in the rat”. *Endocrine Regulations*. 34 (2000): 181–188.

Campbell W.C. “*Trichinella* and Trichinosis”. Plenum Press. New York, London, 1983.

Campbell W.C. “Distribution of *Trichinella spiralis* in the small intestine of young mice”. *Journal of Parasitology*. 53 (1967): 395-397

Capo V., Despommier D.D. y Silverstein S. “The site of ecdysis of the L1 larva of *Trichinella spiralis*”. *Journal of Parasitology*. 70 (1984): 992-994.

Centers for Disease Control and Prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. “Update: Influenza activity-United States. 2004-2005 season”. *MMWR*. 54 (2004): 328.

Centers for Disease Control and Prevention. “Influenza activity-United States, 2004-05 season”. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 54 (2004): 328.

Cowawintaweewat S., Manoromana S., Sriplung H., Khuhaprema T., Tongtawe P., Tapchaisri P. “Prognostic improvement of patients with advanced liver cancer after active hexose correlated compound (AHCC) treatment”. *Asian Pacific Journal of Allergy Immunology*. 24 (2006): 33-45.

Cunningham D. “Current status of colorectal cancer: CPT-11 (irinotecan), a therapeutic innovation”. *European Journal of Cancer*. 32^a (1996): S1-S8.

Chapes S.K., Mastro A.M., Sonnenfeld G. y Berry W.D. “Antiorthostatic suspension as a model for the effects of space flight on immune system”. *Journal of Leukocyte Biology*. 54 (1993): 227-235.

Chávez E., Muñoz J.J., Reveles H.G., Rivas J. y Moreno A. “Efecto de la temperatura en la viabilidad e infectividad de *Trichinella spiralis*”. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 26(2) (2007): 1-5.

Chen C.H., Chang J.W., Lee C.H. y Tsao T.C. “Dose-finding and phase 2 study of weekly paclitaxel (Taxol) and cisplatin combination in treating Chinese patients with advanced nonsmallcell lung cancer”. *American Journal of Clinical Oncology*. 28 (2005): 508-512.

Chen Y.Y. y Chang H.M. “Anti-proliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (*Poria cocos*) on human leukemic U937 and HL-60 cells”. *Food and Chemical Toxicology*. 42 (2004): 759-769.

Chester J.D., Hall G.D., Forster M. y Protheroe A.S. “Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer-current controversies and future directions”. *Cancer Treatment*. 30 (2004): 343-358.

Daddaoua A., Martínez-Plata E., López-Posadas R., Vieites J.M., González M., Requena P., Zarzuelo A., Suárez M^a.D. y Martínez-Augustin O. “Active Hexose Correlated Compound Acts as a Prebiotic and Is Antiinflammatory in Rats with Hapten-Induced Colitis”. *Journal of Nutrition*. 137 (2007): 1222–1228.

Daddaoua A., Puerta V., Requena P., Martinez-Ferez A., Guadix E., Sanchez de Medina F., Zarzuelo A., Suarez M.D. y Boza J. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *Journal of Nutrition*. 136 (2006): 672-676.

de Vere White R.W., Hackman R.M., Soares S.E., Beckett L.A. y Sun B. "Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer". *Urology*. 60 (2002): 640-644.

de Vere White R.W., Hackman R.M., Soares S.E., Beckett L.A., Li Y. y Sun B. "Effects of a genistein-rich extract on PSA levels in men with a history of prostate cancer". *Urology*. 63 (2004): 259-263.

Despommier D.D. "Adaptive changes in muscle fibers infected with *Trichinella spiralis*". *Journal of Parasitology*. 74 (1975): 477-496.

Despommier D.D. *Biology*. "In *Trichinella* and Trichinosis". W.C. Campbell (Ed.) Plenum Press, New York, pp. 75-142. 1983.

Despommier D.D. "A circular thermal migration device for the rapid collection of large numbers of intestinal helminths". *Journal of Parasitology*. 59(5) (1973): 933-935.

Diamond M.S., Shrestha B., Marri A., Mahan D. Y Engle M. "B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus". *Journal of Virology*. 77 (2003): 2578-2586.

Duggal P.S., Ryan N.K., Van der Hoek K.H., Ritter L.J., Armstrong D.T., Magoffin D.A. y Norman R.J. "Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leucocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles". *Reproduction*. 123 (2002): 891-898.

Durnova G.N., Kaplansky A.S. y Portuglov V.V. “Effects of a 22-day space flight on the lymphoid organs of rats”. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 47 (1976): 588-591.

Eo S.K., Kim Y.S., Oh K.W., Lee C.K., Lee Y.N. y Han S.S. “Mode of Antiviral Activity of Water Soluble Components Isolated from *Elfvigia applanat* on Vesicular Stomatitis Virus”. *Archives of Pharmacal Research*. 24 (2001): 74-78.

Erlichman C., Fine S., Wong A. y Elhakim T. “A randomized trial of fluorouracil and folinic acid in patients with metastatic colorectal carcinoma”. *Journal Clinical Oncology*. 6 (1988): 469-475.

Estrada A., Yun C.H., Van Kessel A., Li B., Hauta S., Laarveld B. “Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo”. *Microbiology Immunology*. 41 (1997): 991-998.

Faist E., Mewes A., Strasser T., Walz A., Alkan S., Baker C., Ertel W. y Heberer G. “Alteration of monocyte function following major injury”. *Archives of Surgery*. 123 (1988): 287-292.

Fanaro S., Chierici R., Guerrini P. y Vigi V. “Intestinal microflora in early infancy: composition and development”. *Acta Pediatric*. 91 (2003): 48-55.

Farmacopea de los Estados Unidos - Formulario Nacional (USP-NF 33), 2010.

Farmacopea Europea 6,0; 2008.

Farmacopea Europea 6,3; 2009.

FDA. Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Guidance 5541. 2005

Freitag K., Saker K.E., Thomas E. y Kalnitsky J. “Acute starvation and subsequent refeeding affect lymphocyte subsets and proliferation in cats”. *Journal of Nutrition*. 130 (2000): 2444-2449.

Fujii H., Nishioka H., Wakame K. y Sun B. “Nutritional food active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance against bird flu”. *Journal of Japanese Complementary and Alternative Medicine*. 4 (2007): 37-40.

Fujii H., Nishiokaa N., Simonb R.R., Kaurb R., Lynchb B. y Robertsb A. “Genotoxicity and subchronic toxicity evaluation of Active Hexose Correlated Compound (AHCC)”. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 59(2) (2011): 237-250.

Fujimori S., Gudis K., Mitsui K., Seo T., Yonezawa M., Tanaka S., Tatsuguchi A. y Sakamoto C. “A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis”. *Nutrition*. 25 (2009): 520-525.

Furrie E., Macfarlane S., Kennedy A., Cummings J.H., Walsh S.V., O’Neil D.A. y Macfarlane G.T. “Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial”. *Gut*. 54 (2005): 242-249.

Furukawa H. “Science of Mushrooms”. 1st Edition, p. 71. Kyoritsu publications, Tokyo, 1992.

Furuse K., Naka N., Takada M., Kinuwaki E., Kudo S., Takada Y., Yamakido M., Yamamoto H. y Fukuoka M. “Phase II study of 3-hour infusion of paclitaxel in patients with previously untreated stage III and IV non-small cell lung cancer”. *Oncology*. 54 (1997): 298-303.

Galland R. y Polk H. “Non-specific stimulation of host defenses against a bacterial challenge in malnourished hosts”. *British Journal Surgery*. 69 (1982): 665-668.

García J.J. “Estudio Biofarmacéutico y Parasitológico de una Formulación de Albendazol en Hidroxipropil- β -Ciclodextrina”. Tesis Doctoral, Madrid, 2008.

Gardiner C.H. “Habitat and reproductive behaviour of *Trichinella spiralis*”. *Journal of Parasitology*. 62(6) (1976): 865-870.

Gao Y., Zhang D., Sun B., Fujii H., Kosuna K. y Yin Z. “Active Hexose Correlated Compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses”. *Cancer Immunology Immunother.* 55 (2006): 1258-1266.

Gao Y., Yang W., Pan M., Scully E., Girardi M., Augenlicht L.H., Craft J. y Yin Z. “Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity”. *Journal of Experimental Medicine*. 198 (2003): 433-442.

Gassull M.A., Cabré E. “Clinical guidelines for the diagnosis of IBD”. En: *Management of inflammatory bowel disease*. Barcelona: Prous Science. (1994): 7-12.

Gasche C. “Complications of inflammatory bowel disease”. *Hepatogastroenterology* 47(31) (2000): 49-56.

Geissmann F., Auffray C., Palframan R., Wirrig C., Ciocca A., Campisi L., Narni- Mancinelli E. y Lauvau G. “Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells and their possible roles in the regulation of T-cell responses”. *Immunology Cell Biology*. 86 (2008): 398-408.

Gerosa F., Baldani-Guerra B., Lyakh L.A., Batoni G., Esin S., Winkler-Pickett R.T., Consolaro M.R., De Marchi M., Giachino D., Robbiano A, Astegiano M., Sambataro A., Kastelein R.A., Carra G. y Trinchieri G. “Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells”. *Journal of Experimental Medicine*. 205 (2008): 1447-1461.

Gharizanova T., Torlakov I., Zhelyaskov N., Todorova N. y Sheikov N. "Antinematodic activity of 2-substituted benzimidazoles". Advance in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy. (Ed. M. Hejzlar; M. Semonsky; S. Masak). Univ. Park. Press, Baltimore., pp: 449-451. 1972.

Ghoneum M., Ninomiya Y., Torabi M., Gill G. y Wojdani A. "Active hemicellulose compound (AHCC) enhances NK cell activity of aged mice in vivo". FASEB Journal. 6 (1992): A1213 (Abstract).

Ghoneum M.W.M., Salem F. "Immunomodulatory and Anticancer effects of Active Hemicellulose Compound (AHCC)". International Journal Immunotherapy. XI (1995): 23-28.

Ghoneum M., Wimbley M., Salem F., Mcklain A., Attallah N. y Gill G. "Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC)". International Journal of Immunotherapy 11 (1995): 23-28.

Goldberg I. Functional foods: designer foods. Pharmafoods. Nutraceuticals. Springer; series:diet therapy; ISBN 0-8342-1688-4, 1994).

Goldberg M.J. "Cholangiocarcinoma". Disease-a-month. 50 (2004): 540-544.

Gould S. E. "In Trichinellosis in man and animals". Gould (ed) Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, p.147-189. 1970.

Gould C.L. y Sonnenfeld G. "Enhancement of viral pathogenesis in mice maintained in an antiorthostatic suspension model: coordination with effects on interferon production". Journal of biological regulators and homeostatic agents. 1 (1987): 33-36.

Gronlund M.M., Lehtonen O.P., Eerola E. y Kero P. "Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery". Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 28 (1999): 19-25.

Guérin-Danan C., Andrieux C., Popot F., Charpilienne A., Vaissade P., Gaudichon C., Pedone C., Bouley C. y Szylit O. “Pattern of metabolism and composition of the fecal microflora in infant 10 to 18 months old from day care centers”. *American Journal Pediatric Gastroenterology*. 25 (1997): 281-289.

Guillén V. “Cancer: usar pre y probióticos ayudaría en infecciones intestinales”. *Revista Correo Farmacéutico*, semana 16-22 de febrero, 2015.

Harley J.P. y Gallichico V. “*Trichinella spiralis*: Migration of larvae in the rat”. *Experientia*. 30 (1971): 11-12.

Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G. y Welling G.W. “Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods”. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 30 (2000): 61-67.

Heldricks D.L., Polk H.C. Jr., Fry D.E. “Surgical aspects of infection”. In: Goldsmith H, ed. *The Practice of Surgery*. Hagerstown. Harper and Row, (1987):1–33.

Hershman M., Polk H.C., Pietsch J., Kuflinec D. y Sonnenfeld G. “Modulation of *Klebsiella pneumoniae* infection of mice by interferon- γ ”. *Clinical Experimental Immunology*. 72 (1988): 406-409.

Hershman M., Sonnenfeld G., Mays B., Fleming F., Trachtenberg L.S., Polk H.C. “Effects of interferon- γ treatment on surgically simulated wound infection in mice”. *Microbial Pathogenesis*. 4 (1988):165-168.

Higa G.M., Wise T.C., Crowell E.B. “Severe disabling neurologic toxicity following cisplatin retreatment”. *Annals of Pharmacotherapy*. 29 (1995): 134-137.

Hijikawa T., Kaibori M., Uchida Y., Yamada M., Matsui K., Ozaki T., Kamiyama Y., Nishizawa M. y Okumura T. “Insulin-like growth factor-I prevents liver injury through the inhibition of TNF- α and iNOS induction in D-galactosamine and lipopolysaccharide-treated rats”. *Shock*. 29 (2008): 740-747.

Hirose A., Sato E., Fujii H., Sun B., Nishioka H. y Aruoma O.I. “The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice”. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222 (2007): 152-158.

Hoentjen F, Welling GW, Harmsen HJ, Zhang X, Snart J, Tannock GW, Lien K, Churchill TA, Lupicki M. “Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation”. *Inflammatory Bowel Disease*. 11 (2005): 977-985.

Hoshi H., Yagi Y., Iijima H., Matsunaga K., Ishihara Y. y Yasuhara T. “Isolation and characterization of a novel immunomodulatory α -glucan-protein complex from the mycelium of *Tricholoma matsutake* in Basidiomycetes”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (2005): 8948-8956.

Hosokawa M., Yamasaki M. y Kamiyama Y. “Basic and Clinical Situation of Active Hexose Correlated Compound”. 1st Edition, pp. 7-15. Lifescience Co., Ltd., Tokyo, 2003.

Hrckova G., Velebny S. y Horak J. “A morphological study of effects of liposomized albendazole on the muscle phase of *T.spiralis* in mice”. *Journal of Helminthology*. 67 (1993): 24-30.

Hunter R.J., Fujii H., Wakame K., Gaikwad A., Wolf J.K. y Smith J.A. “Evaluation of active hexose correlated compound (AHCC) in combination with pegylated liposomal doxorubicin for treatment of ovarian cancer”. *International Journal of Applied Research in Natural Product*. 4(3) (2011): 6-14.

Hurk S.D.L., Loehr B.I. y Babiuk L.A. “Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects”. *Vaccine*. 19 (2001): 2474-2479.

Hyodo I., Amano N. y Eguchi K. “Nationwide survey on complementary and alternative medicine in cancer patients in Japan”. *Journal of Clinical Investigation*. 23(12) (2005): 1-10.

Ikeda H., Old L.J. y Schreiber R.D. “The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting”. *Journal of Cytokine Growth Factor Reviews*. 13 (2002): 95-109.

Innocenti F. y Ratain M.J. “Update on pharmacogenetics in cancer chemotherapy”. *European Journal of Cancer*. 38 (2002): 639-44.

Ishibashi H., Ikeda T., Tansho S., Fujisaki R., Yamazaki M., Wakame K., Kosuna K., Yamaguchi H., Ono Y. y Abe S. “Prophylactic efficacy of basidiomycetes preparation AHCC against lethal opportunistic infections in mice”. *Journal of Pharmacology (Japan)*. 120 (2000): 715-719.

Ishizaki M., Kaibori M., Uchida Y., Hijikawa T., Tanaka H., Ozaki T., Tokuhara K., Matsui K., Kwon A.H., Kamiyama Y., Nishizawa M. y Okumura T. “Protective effect of FR183998, a Na⁺ / H⁺ exchanger inhibitor, and its inhibition of iNOS induction in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats”. *Shock*. 30 (2008): 311-317.

Itamoto T., Nakahara H., Tashiro H., Haruta N., Asahara T., Naito A. y Ito K. “Hepatic arterial infusion of 5-fluorouracil and cisplatin for unresectable or recurrent hepatocellular carcinoma with tumor thrombus of portal vein”. *Journal of Surgical Oncology*. 80 (2002): 143-148.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J. Y Thun M.J. “Cancer Statistics, 2009”. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 59 (2009): 225-249.

Jiang T., Luo S., Chen Q., Shen L. y Ying T. “Effect of integrated application of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on physicochemical and microbiological properties of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Food Chemical*. 122 (2010): 761-767.

Jones C., Geiser V., Henderson G., Jiang Y., Meyer F., Perez S. y Zhang Y. “Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency”. *Veterinary Microbiology*. 113 (2006): 199-210.

Jordan P. y Carmo-Fonseca M. “Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity”. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57 (2000): 1229-1235.

Kabanov A., Sementsova A.O., Skarnovich M.O., Teplyakova T.V., Shishkina L.N. y Sergeev N.A. “Development of new effective antiinfluenza drugs based on extracts of basidiomycetes”. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(1) (2010): e88.

Kaern J., Trop C., Sundfoer K. y Kristensen G.B. “Cisplatin/5-fluorouracil treatment of recurrent cervical carcinoma: a phase II study with long-term follow-up”. *Gynecologic Oncology*. 60 (1996): 387-392.

Kamiyama Y. “Improving effect of active hexose correlated compound (AHCC) on the prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients”. *European Surgical Research* 31 (1999): 216.

Kaneko Y. y Chihara G. “Potentiation of host resistance against microbial infections by Lentinan and its related polysaccharides. In *Microbial Infections*”. Edited by Friedman H. et al., pp. 201-206. Plenum, New York, 1992.

Kawaguchi Y. “Improved Survival of Patients with Gastric Cancer or Colon Cancer when treated with Active Hexose Correlated Compound (AHCC): Effect of AHCC on digestive system cancer”. *Journal of Natural Medicine*. 1(1) (2009).

Kenner D. "AHCC: La Seta Medicinal Japonesa Potenciadora de la Inmunidad ". Impreso en España, 2001.

Kidd P.M. "The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review* 5 (2000): 4–27.

Kollmannsberger C., Mayer F., Kuczyk M., Kanz L. y Bokemeyer C. "Treatment of patients with metastatic germ cell tumors relapsing after highdose chemotherapy". *World Journal of Urology*. 19 (2001): 120-125.

Kolosova M.O., Ozeretskovskaja N.N. y Pereverzeva E.V. "A new class of active trichinellicides". In *Mat. Dokl. Iloi vsesoy. Konf. Po. Probl. Trikhinelleza. Cheloveka i zhivotnykh.* (17-18 Maya).

Konstantinova I.V., Rykova M.P., Lesnyak A.T. y Antropova E.A. "Immune changes during long-duration missions". *Journal of Leukocyte Biology*. 54 (1993): 189-201.

Kopydlowski K.M., McVey D.S., Woods K.M., Iandolo J.J. y Chapes S.K. "Effects of antiorthostatic suspension and corticosterone on macrophage and spleen cell function". *Journal of Leukocyte Biology*. 52 (1992): 202-208.

Lamb R.A. y Krug R.M. "Orthomyxoviridae: the viruses and their replication". In: *Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. 5th eds.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Lebwohl D. y Canetta R. "Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update". *European Journal Cancer*. 34 (1998): 1522-1534.

Lee W.W., Lee N., Fujii H. y Kang I. "Active Hexose Correlated Compound promotes T helper (Th) 17 and 1 cell responses via inducing IL-1 β production from monocytes in humans". *Cellular Immunology*. 275 (2012): 19-23.

Levine D.S. "Clinical features and complications of Crohn's disease". En: Targan SR, Shanahan F, eds. Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins. (1994): 296-319.

Liang T.J., Rehermann B., Seeff L.B. "Pathogenesis, natural history, treatment and prevention of hepatitis C". Journal of Annals Internal Medicine. 132(4) (2000): 296-305.

Lina B.A.R. y Kuijpers M.H.M. "Toxicity and carcinogenicity of acidogenic or alkalogenic diets in rats; effects of feeding NH₄ C₁, KHCO₃ or KC₁". Food and Chemical Toxicology. 42 (2004): 135-153.

Llovet J.M., Burroughs A. y Bruix J. "Hepatocellular carcinoma". Lancet. 362 (2003): 1907-1917.

López García M.L. Tesis Doctoral, "Potenciación de la Actividad Antihelmíntica del Albendazol mediante modificaciones en su Biodisponibilidad y Metabolismo". UCM, Madrid, 1996.

Mach C.M., Fugii H., Wakame K. y Smith J. "Evaluation of active hexose correlated compound hepatic metabolism and potential for drug interactions with chemotherapy agents". Journal of the Society for Integrative Oncology. 6 (2008): 105-109.

Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G.R., Hengartner H. y Zinkernagel R.M. "A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria". Science. 288 (2000): 2222-2226.

Maeda Y., Nosa S., Tanaka K., Sawamura S., Aiba Y., Ishikawa H., Hasegawa H., Kawabe N., Miyasaka M. y Koga Y. "The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions". Immunobiology. 204 (2001): 442-457.

Mahida Y.R. y Rolfe V.E. “Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease”. *Clinical Science*.107 (2004): 331-41.

Mamdooh G., Phyllis P., Yasuo N., Mabrouk G. y Gus G. “Enhancement of NK cell activity in cancer patients by active hemicellulose compound (AHCC)”. *Adjuvant Nutrition in Cancer Treatment Symposium*. Nov. 6–7, Tulsa, Oklahoma, 1992.

Mandel A..D y Balish E. “Effect of space flight on cell mediated immunity”. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 48 (1976): 1051–1057.

Martin V.R. “Ovarian Cancer”. *Seminars Nursing Oncology*. 18 (2002): 174-183.

Martínez A.R., Bolás F. y Garate T. “The influence of adoptive inmunity on the action of mebendazole against encysted larvae of *Trichinella spiralis*”. *Revista Iberoamericana de Parasitología*. (1982): 389-396.

Mascaraque C., Suárez M.D., Zarzuelo A., Sánchez de Medina F. y Martínez-Augustin O. “Active hexose correlated compound exerts therapeutic effects in lymphocyte driven colitis”. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58(12) (2014): 2379-2382.

Matsui Y. y Kawaguchi Y. “Retrospective Study in Breast Cancer Patients Supplemented with AHCC”. *International Journal of Integrative Oncology*. 3(2) (2009): 12-16.

Matsui Y, Kawaguchi Y, Kamiyama Y. ”Effects of AHCC as a complementary therapy on prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients”. In: *AHCC Research Association 7th Symposium Abstracts*. Purchase, New York: Quality of Life Labs (1999).

Matsui Y., Uhara J., Satoi S., Kaibori M., Yamada H., Kitade H., Imamura A., Takai S., Kawaguchi Y. y Kwon A.H. “Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study”. *Journal of Hepatology*. 37 (2002): 78–86.

Matsui K, Ozaki T, Oishi M, Tanaka Y, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T, Kwon A. “Active Hexose Correlated Compound Inhibits the Expression of Proinflammatory Biomarker iNOS in Hepatocytes”. *European Surgical Research* 47 (2011): 274–283.

Matsushita K., Kuramitsu Y., Ohiro Y., Obara M., Kobayashi M., Li Y, y Hosokawa M. “Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma”. *Anticancer Drugs*. 9 (1998): 343-350.

Medzhitov R. “Toll-like receptors and innate immunity”. *Nature Reviews Immunology*. 1 (2001): 135-145.

McCracken R.O. “Efficacy of mebendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice”. *Journal of Parasitology*. 64(2) (1978): 214-219.

Merck Index, décimo tercera edición, 2002.

Miller S., Miller C. y Trunkey D. “The immune consequences of trauma”. *Surgical Clinics of North America*. 62 (1982): 167-181.

Miller E.S. y Sonnenfeld G. “Influence of suspension on the expression of protective immunological memory to murine *Listeria monocytogenes* infection”. *Journal of Leukocyte Biology*. 54 (1993): 378-383.

Miller E.S. y Sonnenfeld G. “Influence of antiorthostatic suspension on resistance to murine *Listeria monocytogenes* infection”. *Journal of Leukocyte Biology*. 55 (1994): 371-378.

Miura T., Kitadate K., Nishioka H. y Wakame K. “Basic and Clinical Studies on Active Hexose Correlated Compound”. *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*, edited by Debasis Bagchi, Francis C. Lau, Dilip K. Ghosh, pp. 51-58. Taylor & Francis, USA, 2010.

Mizuno M., Shiomi Y., Minato K., Kawakami S., Ashida H. y Tsuchida H. “Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages”. *Immunopharmacology*. 46 (2000): 113-121.

Molina A.J., Merino G., Prieto J.G., Real R., Mendoza G. y Álvarez A.I. “Absorption and metabolism of albendazole alter intestinal ischemia/reperfusion”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 31(1) (2007): 16-24.

Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R. y Wallace J.L. “Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon”. *Gastroenterology*. 96(3) (1989): 795-803.

Muggia F.M., Hainsworth J.D., Jeffers S., Miller P., Groshen S., Tan M., Roman L., Uziely B., Muderspach L., Garcia A., Burnett A., Greco F.A., Morrow C.P., Paradiso L.J. y Liang L.J. “Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation”. *Journal Clinical Oncology*. 15 (1997): 987-993.

Muñoz E.J., Saldivar E.S., Reveles H.G., Muñoz M.Y. y Moreno M.A. “Características de la célula nodriza en diferentes modelos experimentales infectados con *Trichinella spiralis*”. *REDVET*, Vol. VIII (1) (2007): 1-10.

Murphy K.M. y B. Stockinger B. “Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances”. *Nature Immunology* 11 (2010): 674-680.

Murch S.H. “Toll of allergy reduced by probiotics”. *Lancet*. 357 (2001): 1057-1059.

Nair P.K., Melnick S.J., Ramachandran R., Escalon E. y Ramachandran C. “Mechanism of macrophage activation by (1,4)-alpha-D-glucan isolated from *Tinospora cordifolia*”. *Journal of International Immunopharmacology*. 6 (2006): 1815-1824.

Nakanishi H., Kaibori M., Teshima S., Yoshida H., Kwon A.H., Kamiyama Y., Nishizawa M., Ito S. y Okumura T. “Pirfenidone inhibits the induction of iNOS stimulated by interleukin-1 β at a step of NF-kappaB DNA binding in hepatocytes”. *Journal Hepatology*. 41 (2004): 730-736.

Nakanuma Y., Sripa B. y Vatanasapt V. “Intrahepatic cholangiocarcinoma”. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. (1999)., pp: 173-80.

Navo M.A., Phan J.N., Vaughan C., Palmer J.L., Michaud L., Jones K.L., Bodurka D.C., Basen-Engquist K., Hortobagyi G.N., Kavanagh J.J. y Smith J.A. “An assessment of the utilization of complementary and alternative medication in women with gynecologic or breast malignancies”. *Journal Clinical Oncology*. 22(4) (2004): 671-677.

Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y. y Grabbe S. “Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells”. *Nature Medicine*. 4 (1998): 328-332.

Nisini R., Torosantucci A., Romagnoli G., Chiani P., Donati S., Gagliardi M.C., Teloni R., Sargentini V., Mariotti S., Lorio E. y Cassone A. “Beta-Glucan of *Candida albicans* cell wall causes the subversion of human monocyte differentiation into dendritic cells”. *Journal of Leukocyte Biology*. 82 (2007): 1136-1142.

Obermeier F, Strauch UG, Dunger N, Grunwald N, Rath HC, Herfarth HH, Scholmerich J, Falk W. In vivo CpG DNA/ TLR9 interaction induces regulatory properties in CD41CD62L1-T-cells which prevent intestinal inflammation in the SCID-transfer model of colitis. *Gut*. 2005;54: 1428–36.

Ocón B., Anzola A., Ortega-González M., Zarzuelo A., Suárez M.D., • Fermín Sánchez de Medina F. y Martínez-Augustin O. “Active hexose-correlated compound and *Bifidobacterium longum* BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis”. *European Journal of Nutrition*. 52(2) (2013): 457-466.

Ohtsu A., Yoshida S., Saito D., Shimada Y., Miyamoto K., Fujii T., Yoshino M. y Yoshimori M. “An early phase II study of 5-fluorouracil combined with cisplatin as a second line chemotherapy against metastatic gastric cancer”. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 21 (1991): 120-124.

Okuda K., Nakanuma Y. y Miyazaki M. “Cholangiocarcinoma: recent progress. Part I: epidemiology and etiology”. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17 (2002): 1049-1055.

Okuda K. “Hepatocellular carcinoma”. *Journal of Hepatology*. 32(1) (2000): 225-237.

Ozeretskovskaja N.N., Chernyaeva A.I. y Kolosova M.D. “Search for the specific therapy for trichinellosis in white mice. V. Cholo phenil derivatives of benzimidazoles in experimental trichinellosis in white mice”. *Medical Parasitology*. 40 (1971): 411-414.

Pallinger E. y Csaba G. “Influence of acute stress on the triiodothyronine (T3) and serotonin content of rat’s immune cells”. *Acta Physiologica Hungarica*. 92 (2005): 47-52.

Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. y Pisani P. “Global cancer statistics, 2002”. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 55 (2005): 74-108.

Parkin D.M. "Global cancer statistics in the year 2000". *Lancet Oncology*. 2 (2001): 533-43.

Partridge E.E. y Barnes M.N. "Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment". *CA Cancer Journal for Clinicians*. 49 (1999): 297-320.

Pectasides D., Pectasides E. y Economopoulos T. "Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer". *Cancer Treatment*. 33 (2007): 177-190.

Pectasides D., Pectasides M. y Maria Nikolaou M. "Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in muscle invasive bladder cancer". *European Urology*. 48 (2005): 60-67.

Pescatore F. "AHCC: The Medical Breakthrough in Natural Immunotherapy", edited by Diana Grew. Basic Health Publications, United States of America, 2010.

Pires Rincão V., Aimi Yamamoto K., Silva Ricardo N.M.P., Aguiar Soares S., Paccola Meirelles L.D., Nozawa C.M. y Carvalho Linhares R.E. "Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity". *Virology Journal*. 9(37) (2012): 1-6.

Podolsky D.K. "Inflammatory bowel disease". *New England Journal of Medicine*. 347(6) (2002): 417-429.

Polk H., George C.D., Wellhausen S.R., Cost K., Davidson P.R., Regan M.P. y Borzotta A.P. "A systematic study of host defense processes in badly injured patients". *Annals of Surgery*. 204 (1980): 282-299.

Purkenson M. y Despommier D.D. "Fine structure of the muscle phase of *Trichinella spiralis* in the mouse". *Trichinellosis*. (Ed. C. W. Kim), Intext, New York, p. 7-23, 1974.

Racaniello V.R. "One hundred years of poliovirus pathogenesis". *Virology*. 344 (2006): 9-16.

Ramírez Valenzuela Manuel. Epidemiología de la Trichinellosis, Ciencia Veterinaria, Vol 3, p. 1-58, 1981.

Real Farmacopea Española, 3^o edición., p. 266-270, 2005.

Reiner S.L. “Development in motion: helper T cells at work”. Cell. 129 (2007): 33-36.

Reisinger A.J., Tannehill-Gregg S.H., Waites C.R., Dominick M.A., Schilling B.E., Jackson T.A. “Dietary ammonium chloride for the acidification of mouse urine”. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 48 (2009): 144-146.

Ritz B.W. “Active Hexose Correlated Compound (AHCC) and Immune Outcomes in Humans: A Review”. Natural Medicine Journal. 3(1) (2011): 3-7.

Ritz B.W. “Supplementation with active hexose correlated compound increases survival following infectious challenge in mice”. Nutrition Reviews. 66(9) (2008): 526-531.

Ritz B.W., Nogusa S., Ackerman E.A. y Gardner E.M. “Supplementation with Active Hexose Correlated Compound Increases the Innate Immune Response of Young Mice to Primary Influenza Infection”. Journal of Nutrition. 136 (2006): 2868-2873.

Rodrick M.L., Wood J., O’Mahony J., Davis C.F., Grbic J.T., Demling R.H., Moss N.M., Saporoschetz I., Andrea Jordan A., Philip D’Eon P. y Mannick J.A. “Mechanisms of immunosuppression associated with severe nonthermal traumatic injuries in man: production of interleukin 1 and 2”. Journal Clinical Immunology. 6 (1986): 310-318.

Rougier P., Ducreux M., Mahjoubi M., Pignon J.P., Bellefqih S., Oliveira J., Bognel C., Lasser P., Ychou M. y Elias D. “Efficacy of combined 5-fluorouracil and cisplatin in advanced gastric carcinomas. A phase II trial with prognostic factor analysis”. *European Journal of Cancer*. 30^a (1994): 1263-1269.

Ruitenbergh E., Elgersma A., Kruizinga W. y Leenstra F. “Trichinella spiralis infection in congenitally athymic (nude) mice”. *Immunology*. 33 (1977): 581-587.

Rumsfeld Jr. H.W. “Role of dietary protein in normal rat proteinuria”. *Journal of the American Physiological Society*. 184 (1956): 473-478.

Rybak L.P. y Whitworth C.A. “Ototoxicity: therapeutic opportunities”. *Drug Discovery Today*. 10 (2005): 1313-1321.

Sandercock J., Parmar M.K. y Torri V. “First-line chemotherapy for advanced ovarian cancer: paclitaxel, cisplatin and the evidence”. *British Journal of Cancer*. 78 (1998): 1471-1478.

Sands B.E. “Therapy of inflammatory bowel disease”. *Gastroenterology*. 118 (2000): S68-82.

Sangro B. “Refined tools for the treatment of hepatocellular carcinoma”. *Journal of Hepatology*. 42 (2005): 629-631.

Sanmartin M.L., Martínez A.R., Toro M. y Rodríguez F. “Acción del mebendazol sobre larvas enquistadas de *Trichinella spiralis*. I evolución histopatológica”. *Revista Iberoamericana de Parasitología*. 40(1) (1980): 27-47.

Sansonetti P. J. “War and peace at mucosal surface”. *Nature Reviews Immunology*. 4 (2004): 953-964.

Sasaki S.H., Linhares R.E.C., Nozawa C.M., Montalván R., Paccola Meirelles L.D. “Strains of *Lentinula edode* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus”. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32 (2001): 52-55.

Sato K., Ohashi S., Tanaka Y., Miki H., Oishi M., Tokuhara K., Kaibori M., Okumura T., Nishizawa M. y Kwon A. H. “Occurrence of Hydrophilic Hepato-protective Compounds in AHCC in Addition to Adenosine”. *Congreso Internacional de Medicina Integrativa y Nutrición*. Julio, 2012.

Sato K., Ohtsuki A., Park E. Y., Nakamura Y., Nishizawa M. y Okumura T. “Suppression of iNOS Production in Primary Cultured Hepatocytes by Mono-Saccharide Fraction of AHCC”. *Congreso Internacional de Medicina Integrativa y Nutrición*. Julio, 2010.

Schuler-Thurner B., Schultz E.S., Berger T.G., Weinlich G. y Ebner S. “Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptideloading monocyte-derived dendritic cells”. *Journal of Experimental Medicine*. 195 (2002): 1279-1288.

Sekine I., Nishiwaki Y., Watanabe K., Yoneda S. y Saijo N. “Phase II study of 3-hour infusion of paclitaxel in previously untreated non-small cell lung cancer”. *Clinical Cancer Research*. 2 (1996): 941-945.

Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J. y Schreiber R.D. “IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity”. *Nature*. 410 (2001): 1107-1111.

Shirao K., Shimada Y., Kondo H., Saito D., Yamao T., Ono H., Yokoyama T., Fukuda H., Oka M., Watanabe Y., Ohtsu A., Boku N., Fujii T., Oda Y., Muro K. y Yoshida S. “Phase I-II study of irinotecan hydrochloride combined with cisplatin in patients with advanced gastric cancer”. *Journal Clinical Oncology*. 15 (1997): 921-927.

Sharma R., Schumacher U., Ronaasen V. y Coates M. “Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets”. *Gut*. 36 (1995): 209-214.

Shigama K., Nakaya A., Wakame K., Nishioka H. y Fujii H. “Alleviating effect of active hexose correlated compound (AHCC) for anticancer drug-induced side effects in non-tumor-bearing mice”. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*. 8 (2009): 43-51.

Shinil K. Shah, Peter A. Walker, Stacey D. Moore-Olufemi, Alamelu Sundaresan, Anil D. Kulkarni and Richard J. Andrassy. “An Evidence-Based Review of a Lentinula edodes Mushroom Extract as Complementary Therapy in the Surgical Oncology Patient”. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 35, 4 (2011): 449-458.

Skalova L., Krizova V., Cvilink V., Szotakova B., Storkanova L., Velik J. Y Lamka J. “Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver”. *Veterinary Parasitology Journal*. 146(3-4) (2007): 254-262.

Sonnenfeld G. “The immune system in space and microgravity”. *Journal of Medicine and science in sports and exercise*. 34 (2002): 2021-2027.

Sonnenfeld G. y Shearer W.T. “Immune function during space flight”. *Nutrition*. 18 (2002): 899-903.

Spaldova R. y Corba J. “Relationship between the antitrichinellous effect of seven derivates of benzimidazole carbamates and their chemical structure”. *Folia Parasitology*. 26(2) (1979): 145-149.

Spiering E., Fujii H., Sun B. y Walshe T. “A Phase I Study of the Safety of the Nutritional Supplement, Active Hexose Correlated Compound, AHCC, in Healthy Volunteers”. *Nutritional Science Vitaminolgy*. 53 (2007): 536-539.

Srivatanakul P., Sriplung H. y Deerasamee S. “Epidemiology of liver cancer: an overview”. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 5 (2004): 116-223.

Steffen J.M., Robb R., Dambrowski M.J., Musacchia X.J., Mandel A.D. y Sonnenfeld G. “A suspension for hypokinetin/hypodynamic and antiorthostatic responses in the mouse”. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*. 55 (1984): 612-616.

Strohl W.R. “The role of natural products in a modern drug discovery program”. *Drug Discovery Today*. 5 (2000): 39-41.

Stuelp-Campelo P.Ma., Oliveira M.B.M., Carneiro-Leao A.M.A., Carbonero E.R., Gorin P.A.J. y Iacomini M. “Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity”. *International Journal of Immunopharmacology*. 2 (2002): 691-698.

Suárez L., Perdomo M. y Escobar H. “Microflora bacteriana y ecosistema intestinal”. *Fisiopatología del intestino delgado contaminado. Diarrea aguda. Medio ambiente en España*. GEN. 48(2) (1994): 61-64.

Sumiyoshi Y., Hashine K., Kakehi Y., Yoshimura K., Satou T., Kuruma H., Namiki S y Shinohara N. “Dietary Administration of Mushroom Mycelium Extracts in Patients with Early Stage Prostate Cancers Managed Expectantly: A Phase II Study”. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 40(10) (2010): 967-972.

Sun B., Wakame K., Mukoda T., Toyoshima A., Kana-zawa T. y Kosuna K. “Protective effects of AHCC on carbon tetrachloride induced liver injury in mice”. *Journal of Nature Medicine*. 51 (1997): 310-315.

Sun B., Wakame K., Sato E., Nishioka H., Aruoma O.I. y Fujii H. “The effect of active hexose correlated compound in modulating cytosine arabinoside-induced hair loss, and 6-mercaptopurine- and methotrexate-induced liver injury in rodents”. *Journal of Cancer Epidemiology*. 33 (2009): 293–299.

Symonds R.P. y Foweraker K. “Principles of chemotherapy and radiotherapy”. *Current Obstetrics and Gynaecology*. 16 (2006): 100-106.

Taguchi T., Nazneen A., Abid M.R. y Razzaque M.S. “Cisplatin associated nephrotoxicity and pathological events”. *Contributions to Nephrology*. 148 (2005):

Tanaka T., Uchida Y., Kaibori M., Hijikawa T., Ishizaki M., Yamada M., Matsui K., Ozaki T., Tokuhara K., Kamiyama Y., Nishizawa M., Ito S. y Okumura T. “Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor, FR183998, has protective effect in lethal acute liver failure and prevents iNOS induction in rats”. *Journal Hepatology*. 48 (2008): 289-299.

Taylor G.R., Konstantinova I.V., Sonnenfeld G. y Jennings R. “Changes in the immune system during and after space flight”. *Journal of Advances in Space Biology and Medicine*. 6 (1997): 1-32.

Terakawa N., Matsui Y., Satoi S., Yanagimoto H., Takahashi K., Yamamoto T., Yamao J., Takai S., Kwon A. y Kamiyama Y. “Immunological Effect of Active Hexose Correlated Compound (AHCC) in Healthy Volunteers: A Double-Blind, Placebo Controlled Trial”. *Nutrition and Cancer*. 60(5) (2008): 643-651.

Thaiudom S., Piyaniran W. y Chutaputthi A. “A study of the efficacy of Active Hexose Correlated Compound (AHCC) in the treatment of chronic Hepatitis C patients at Phramongkutklao Hospital”. *Thailand Medical News*. 325 (2010): 13-16.

Thigpen J.T., Aghajanian C.A., Alberts D.S., Campos S.M., Gordon A.N., Markman M., McMeekin D.S., Monk B.J. y Rose P.G. “Role of pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer”. *Gynecology Oncology*. 96 (2005): 10-18.

Thompson-Chagoyan O.C., Maldonado J. y Gil A. A etiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition Journal*. 24 (2005): 339-52.

Thompson W.W., Shay D.K. y Weintraub E., Lynnette Brammer., Carolyn B., Bridges M.D., Nancy J. Cox., Keiji Fukuda. “Influenza associated hospitalizations in the United States”. The Journal of the American Medical Association. 292 (2003): 1333-1340.

Thompson W.W., Shay D.K. y Weintraub E., Lynnette Brammer., Carolyn B., Bridges M.D., Nancy J. Cox., Keiji Fukuda. “Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States”. The Journal of the American Medical Association. 289 (2003): 179-186.

Tsuchiya H., Kaibori M., Yanagida H., Yokoigawa N., Kwon A.H., Okumura T. y Kamiyama Y. “Pirfenidone prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats”. Journal Hepatology. 40 (2004): 94-101.

Tsuji K., Kwon A.H., Yoshida H., Qiu Z., Kaibori M., Okumura T. y Kamiyama Y. “Free radical scavenger (edaravone) prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats”. Journal Hepatology. 42 (2005): 94-101.

Van den Berg J.H., Beijnen J.H., Balm A.J.M. y Schellens J.H.M.. “Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity”. Cancer Treatment. 32 (2006): 390-397.

Various authors. “Active Hexose Correlated Compound”. Purchase, New York: Quality of Life Labs (1999).

Velebny S., Tomasovicová R. y Stpczynska S. “Pharmacokinetics of ³H-cambendazole in mice in the course of experimental trichinellosis”. Helminthologia. 29 (1992^a): 207-210.

Velebny S., Tomasovicová R. y Stpczynska S. “Comparative pharmacokinetics of fenbendazole and cambendazole in the course of the intestinal phase of trichinellosis in mice”. Helminthologia. 29 (1992^b): 79-81.

Viale P.H. "Chemotherapy and cutaneous toxicities: implications for oncology nurses". *Seminars in Oncology Nursing*. 22 (2006): 144-51.

Wakame K. "Protective effects of active hexose correlated compound (AHCC) on the onset of diabetes induced by streptozotocin in rats". *BioMed Research International*. 20 (1999): 145–152.

Wakelin D. y Denham D.A. "The immune response. In *Trichinella and Trichinosis*". W. C. Campbell (ed). Plenum Press, New York, pp. 265-308. 1983.

Wang S., Welte T., Fang H., Chang G.J., Born W.K., O'Brien R.L., Sun B., Fujii H., Kosuna K. y Wang T. "Oral Administration of Active Hexose Correlated Compound Enhances Host Resistance to West Nile Encephalitis in Mice". *Journal of Nutritional Immunology*. 139 (2009): 598-602.

Wang T., Scully E., Yin Z., Kim J.H., Wang S., Yan J., Mamula M., Anderson J.F. y Craft J. "IFN-gamma-producing gammadelta T cells help control murine West Nile virus infection". *Journal of Immunology*. 171 (2003): 2524-2531

Wasley A. y Alter M.J. "Epidemiology of hepatitis C: Geographic differences and temporal trends". *Seminars Liver Disease*. 20 (2000): 1-16.

Welte T., Lamb J., Anderson J.F., Born W.K., O'Brien R.L. y Wang T. "Role of two distinct gammadelta T cell subsets during West Nile virus infection". *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 53 (2008): 275-283.

Wolpin B.M. y Mayer R.J. "Systemic treatment of colorectal cancer. (NIH-PA Author Manuscript)". *Gastroenterology*. 134(5) (2008): 1296-1310.

Won J.S. "The Hematoimmunologic Effect of AHCC for Korean Patients with Various Cancers". *Biotherapy*. 16(6) (2002): 560-564.

Wright K.A. "Trichinella spiralis: An intracellular parasite in the intestinal phase". *Journal of Parasitology*. 65 (1979): 441-445.

Yagita A., Maruyama S., Fujituka M. y Ohshima K. “Novel immunotherapy using a human natural (Hn) IL-12 inducer (Abstract)”. Japanese journal of cancer research. 89 (1998): 2422.

Yagita A., Maruyama S., Wakasugi S. y Sukegawa Y. “H-2 haplotypedependent serum IL-12 production in tumor-bearing mice treated with various mycelial extracts”. *In Vivo*.16 (2002): 49–54.

Yang Z. Y., Wang Z.Y. y XU G.S. “Appearance, dissaperance and morphological variations of adults *Trichinella spiralis*”. Journal of Veterinary Sciense & Technology. (1984): 20-22.

Ye S.F., Ichimura K., Wakame K. y Ohe M. “Suppressive effects of active hexose correlated compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress. Journal Life Science. 74 (2003): 593-602.

Ye S.F., Wakame K., Ichimura K. y Matsuzaki S. “Amelioration by active hexose correlated compound of endocrine disturbances induced by oxidative stress in the rat”. Endocrine Regulations. 38 (2004): 7-13.

Yoshida H., Kwon A.H., Kaibori M., Tsuji K., Habara K., Yamada M., Kamiyama Y., Nishizawa M., Ito S. y Okumura T. “Edaravone prevents iNOS expression by inhibiting its promoter transactivation and mRNA stability in cytokine cytokine-stimulated hepatocytes”. Nitric Oxide. 18 (2008): 105-112.

Zheng R., Jie S., Hanchuan D. y Moucheng W. “Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus endodes*”. International Immunopharmacology. 5 (2005): 811- 820.

Zhu J., Yamane H. y Paul W.E. “Differentiation of effector CD4 T cell populations”. Annual Review Immunology. 28 (2010): 445-489.

PÁGINAS DE INTERNET

ICH Q2(R1). Validation of Analytical Procedures Methodology. Disponible en:
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
[Fecha de acceso: 14/01/2015].

Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Guidance for Industry, ICH,
November, 1996.

www.trichinella.org/bio_lifecycle.htm.

7. Resumen **en español**

Nuevas formulaciones orales de un Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa (AHCC) y su actividad en un modelo experimental parasitario

Introducción

El AHCC, siglas en inglés de Active Hexose Correlative Compound traducido como Compuesto Correlacionado de Hexosa Activa, producto registrado y comercializado a nivel mundial por la empresa japonesa Amino Up Chemical. El AHCC se extrae del hongo Shiitake (*Lentinus edodes*), la producción se lleva a cabo bajo estrictas normas de fabricación y siguiendo procesos estandarizados en las instalaciones de Amino Up Chemical con base en Sapporo (Japón). El AHCC es un alimento funcional; estudios publicados indican que tiene propiedades inmunoestimulantes pudiendo ser beneficioso en terapias coadyuvante en pacientes con cáncer. El AHCC se comercializó inicialmente como formulaciones lipídicas bajo la forma farmacéutica de sobres y cápsulas; sin embargo, en el año 2009, se estableció una colaboración científica entre la empresa farmacéutica y el departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid con el fin de desarrollar formulaciones orales más hidrofílicas como alternativa a las formulaciones lipídicas comercializadas. Estas formulaciones hidrófobas contienen una gran cantidad de excipiente lipídico que protegen al polvo liofilizado de la humedad del ambiente, que conduce a la degradación química hidrolítica del producto y compromete su actividad. En Japón, la forma habitual de consumo del AHCC es en sobres, directamente sin agua. Sin embargo, en los países occidentales la forma farmacéutica oral en sobres está relacionada con suspensiones / soluciones orales extemporáneas, por ello una formulación hidrófila podría ser más conveniente que una formulación hidrófoba para mejorar la dispersabilidad del producto en agua y la aceptación del paciente a la hora de consumirlo.

Objetivos

1.- Desarrollar y caracterizar nuevas formulaciones hidrófilas de cápsulas, comprimidos y sobres conteniendo AHCC.

2.- Estudiar la estabilidad de las formulaciones desarrolladas según las directrices ICH.

3.- Estudiar la biodisponibilidad *in vivo* de las formulaciones orales de AHCC desarrolladas.

Metodología

Los excipientes utilizados en este trabajo de investigación están aprobados para su uso en formulaciones nutraceuticas en la mayoría de países del mundo. Los estudios de estabilidad se han realizado según las directrices ICH Q1A(R2). La actividad *in vitro* e *in vivo* de las formulaciones ha sido evaluada.

Resultados y discusión

Los resultados de los estudios de estabilidad son descritos en esta tesis y han sido analizados en función de las diferentes características y condiciones:

1.- Aspecto y disolución: el proceso de apelmazamiento depende claramente de las condiciones de humedad relativa (HR) durante el almacenamiento de las muestras. Cuando la HR es $75\% \pm 5\%$ o por debajo de estos valores, todas las formulaciones hidrófilas desarrolladas, con excepción de las cápsulas, fueron estables durante varios años. El color de las formulaciones fue dependiente de la proporción de AHCC en la muestra resultando en colores más oscuros en aquellas muestras con mayor dosis de AHCC. La reacción de Maillard se ha relacionado como posible causa de la coloración ocurrida durante el almacenamiento de las formulaciones. El color del producto tiende a ser más oscuro que el inicial cuánto mayor es el tiempo de almacenamiento de las muestras.

2.- pH: las formulaciones hidrófilas preparadas con diluyente hidrófilo tipo B (GalenIQ® 800) dio lugar a un pH de entre 4,0 y 4,6.

3.- Pérdida de peso (expresado en porcentaje): este parámetro está relacionado con el contenido de agua de los productos. Obviamente, la formulación

hidrófoba japonesa comercializada (AHCC-FG), claramente presentó menor pérdida de peso por desecación en comparación con las formulaciones hidrófilas desarrolladas para sobres que tuvieron una pérdida de peso de hasta 5,4%.

4.- Contenido de G_1 : este parámetro es un indicador de estabilidad de la formulación ya que el contenido en agua produce degradación en la muestra. El mejor resultado del contenido de G_1 se obtuvo con formulaciones hidrófilas para sobres. Siendo en estas formulaciones el contenido de G_1 característico y bastante estable. La dosis de AHCC está inversamente relacionada con el contenido de G_1 . Las formulaciones que contienen dosis de 0,6 g de AHCC tienen mayor proporción de G_1 que las que contienen 1,8 g.

5.- Efecto de la cantidad y el tipo de diluyente en la formulación: cuanto mayor sea la cantidad de diluyente, mayor es la proporción de G_1 en la formulación. La elección del tipo de diluyente no fue estadísticamente significativo ($P=0,8$) en relación al contenido de G_1 ; sin embargo fue estadísticamente significativo ($P<0,01$) tanto para el pH como para la pérdida de peso por desecación.

Los experimentos *in vivo* se pueden dividir en dos partes:

1.- Análisis químico de los niveles de glucosa, G_1 e isomaltol después de la administración oral del AHCC en seres humanos y ratones: la glucemia no se vio afectada por la administración oral del AHCC. El G_1 y el isomaltol no fueron absorbidos después de su administración. Tras estos experimentos iniciales, se dedujo que no es sencillo determinar la biodisponibilidad oral del producto basado en sus componentes químicos cuando se desconoce cuáles son los compuestos activos. Por esta razón, se decidió utilizar un modelo *in vivo* biológico basado en el modelo experimental de ratón infectado con *T. spiralis* para probar la actividad del AHCC y correlacionar dichos valores con la biodisponibilidad oral del producto.

2.- Actividad antiparasitaria del AHCC en el modelo experimental de ratón infectado con *T. spiralis*: la administración única del AHCC fue útil en el tratamiento de la infección por *T. spiralis* observándose un efecto más potente tras

la administración conjunta con albendazol (efecto sinérgico). El AHCC disminuyó significativamente ($P < 0,01$) el número de larvas. Curiosamente, la actividad fue evidente incluso a dosis muy bajas del AHCC (equivalente a la dosis humana de 0,24 g). Se observó una relación significativa ($P < 0,01$) entre la dosis y el número de larvas aunque dicha relación no fue lineal. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,1$) entre la materia prima del producto y la formulación hidrófila desarrollada para sobres (equivalente a la dosis humana de 0,32 g). Esto podría sugerir una bioequivalencia *in vivo* entre la formulación en sobres desarrollada y la materia prima. Sin embargo, la falta de linealidad entre la dosis y la eficacia hacen complejo conocer con exactitud la biodisponibilidad. En el modelo experimental, se observó cambios en los valores de FNT, IFN γ e IL-2 lo que sugiere que el sistema inmune responde generando linfocitos Th1.

CONCLUSIONES

- 1.- Se han desarrollado y caracterizado nuevas formulaciones hidrófilas de AHCC en cápsulas, comprimidos y sobres.
- 2.- El principal inconveniente detectado durante los estudios de estabilidad es la tendencia al apelmazamiento observado en la formulación hidrófila para sobres. Dicho apelmazamiento tiene lugar en condiciones extremas de HR ($96\% \pm 5\%$) y después de 24 meses, siendo fácilmente reversible ya que las formulaciones se dispersan y solubilizan en un medio acuoso. Por lo tanto, sugerimos como fecha de caducidad 24 meses.
- 3.- Desde el punto de vista químico y basándonos en el compuesto G₁ estudiado como indicador de estabilidad, la cantidad de AHCC presente en la formulación influye en su propia estabilidad. Dosis altas presentan un mayor porcentaje de degradación que dosis bajas. De la misma manera cuanto mayor sea el porcentaje de excipiente en la formulación menor es la degradación observada.
- 4.- La mejor formulación desarrollada para sobres desde el punto de vista de estabilidad tiene una dosis relativamente baja de AHCC (0,6 g) con una gran cantidad de excipientes dando lugar a un peso final de granulado de 3,13 g. Como

material de acondicionamiento se utilizan sobres de aluminio-aluminio y se recomienda evitar ambientes excesivamente húmedos.

5.- Las características *in vivo* de AHCC se evaluaron mediante el análisis de alguno de sus componentes: glucosa, G_1 e isomaltol después de la administración oral de formulaciones de AHCC. No se detectó efecto hiperglucemiante incluso después de la administración oral de dosis de hasta 5 g de AHCC-FD a voluntarios sanos en condiciones de ayuno. Tampoco se detectó G_1 e isomaltol en las muestras de plasma después de la administración oral de AHCC en seres humanos y ratones. Se concluye por lo tanto que estas moléculas no sirven como indicadores de su posible absorción en estudios de biodisponibilidad.

6.- En el estudio de actividad antiparasitaria se observó que el AHCC es útil por si solo para disminuir la carga parasitaria en un modelo murino de triquinelosis. La administración de AHCC reduce el número de parásitos en la fase intestinal y la inflamación valorada como disminución de la respuesta Th1 cuantificada por las interleucinas: TNF e $IFN\gamma$, en comparación con el grupo control no tratado.

7.- No se encontraron diferencias significativas en la actividad entre la administración de la misma dosis de materia prima (AHCC-FD) y la formulación desarrollada para sobres por lo que se concluye que hay bioequivalencia farmacodinámica.

8. Resumen en inglés

Novel oral formulations of Active Hexose Correlated Compound (AHCC) and its activity in an experimental parasitic model.

Introduction

Active Hexose Correlative Compound (AHCC) is a product registered and marketed worldwide by the Japanese company Amino Up Chemical. AHCC is extracted from Shiitake mushroom (*Lentinus edades*). The production takes place under strict manufacturing standards and following standard operating procedures in the Amino Up Chemical facilities located in Sapporo (Japan). AHCC is a functional food; published studies indicate that it has immunostimulatory properties being beneficial in adjuvant therapy in patients with cancer. AHCC was initially marketed as lipid formulations in the dosage form of sachets and capsules. In 2009, a scientific collaboration between the pharmaceutical company and the department of Pharmaceutical Technology at the Complutense University of Madrid was established in order to develop more hydrophilic oral formulations as an alternative to the lipidic formulations already marketed. These hydrophobic formulations contain large amounts of lipidic excipient with the aim of protecting the lyophilized powder from the humidity which leads to chemical degradation and compromises the product activity. In Japan, commonly, the form of consumption of AHCC is directly from the sachets without water. However, in Western countries the sachets are usually dispersed in water and taken as oral suspensions or extemporaneous oral solutions. Therefore, a hydrophilic formulation would be more convenient than a hydrophobic formulation to improve the dispersability of the product in water and the patient compliance.

Aims

1. To develop and characterize novel hydrophilic formulations of capsules, tablets and sachets containing AHCC .
2. To study the stability of the developed formulations in accordance with ICH guidelines .

3. To study the *in vivo* bioavailability of novel oral formulations of AHCC.

Methodology

The excipients used in this research are approved for use in nutraceutical formulations in most countries. Stability studies were performed according to the ICH Q1A (R2). The *in vitro* and *in vivo* activity of the formulations was evaluated.

Results and discussion

The results of the stability studies are reported in this thesis and have been discussed in terms of the different characteristics and conditions:

1. Appearance and Dissolution: caking process clearly depends on the moisture conditions (RH) during storage of the samples. When the RH is $75\% \pm 5\%$ or below these values, all the hydrophilic formulations except capsules were stable for several years. The color of the formulations was dependent on the ratio of AHCC in the sample leading to darker colour when the content of AHCC was higher. A Maillard reaction was observed and related as possible cause to the dark colour developed during storage. The color tends to be darker than the original color in the product when the storage time is larger.

2. pH. The pH of the hydrophilic formulations prepared with hydrophilic diluent type B (GalenIQ® 800) exhibited a pH between 4.0 and 4.6 .

3. Weight loss (expressed as a percentage): this parameter is related to the water content of the products. Obviously, Japanese hydrophobic marketed formulation (AHCC-FG) exhibited the lowest weight loss after drying while hydrophilic develop formulations for sachets exhibited a weight loss of up to 5.4%.

4. Content of G₁: This parameter is a stability indicator due to water produces degradation in the sample indicative of degradation that water produces in the

sample. The best result in G₁ content was obtained with hydrophilic formulations for sachets being a stable and characteristic value. The dose of AHCC is inversely related to the content of G₁. Formulations containing 0.6 g of AHCC have higher proportion of G₁ than the ones containing 1.8 g.

5. Effect of quantity and type of diluent in the formulation: the higher the amount of diluent, the greater the proportion of G₁ in the formulation. The choice of diluent was not statistically significant (P=0.8) in relation to the content of G₁; but it was statistically significant (P<0.01) for both the pH and weight loss on drying .

The *in vivo* experiments were divided in two parts:

1. Chemical analysis of glucose levels, G1 and isomalt after oral administration of AHCC in humans and mice. Blood glucose was not affected by the oral administration of AHCC. Isomaltol and G1 were not absorbed after their oral administration. After these initial experiments , it was concluded that it is not simple to determine the oral bioavailability based on their chemical components when it is not well-known which of them is the active compound. For this reason, it was decided to use a biological *in vivo* model based on experimental mouse model infected with *T. spiralis* to test the activity of AHCC and correlate these values with the oral bioavailability of the product.

2. AHCC antiparasitic activity in experimental mouse model infected with *T. spiralis*: single administration of AHCC was useful in the treatment of infection by *T. spiralis* being observed a stronger effect after co-administration with albendazole (synergistic effect). AHCC significantly decreased (P<0.01) the number of larvae. Interestingly, the activity was evident even at very low dose of AHCC (equivalent to the human dose of 0.24 g). A significant relationship (P <0.01) between the dose and the number of larvae was observed although this relationship was not linear. No significant differences (P>0.1) between the raw material of the product and the hydrophilic formulation in sachets (equivalent to the human dose of 0.32 g) were observed. This could suggest an *in vivo* bioequivalence between the developed formulation and the raw material. However, the lack of linearity between dose and

efficacy make complex to know exactly the bioavailability. In the experimental model, changes in the values of TNF, IFN γ and IL-2 suggested that the immune system responded by generating Th1 lymphocytes.

CONCLUSIONS

1. We have developed and characterized novel AHCC hydrophilic formulations in capsules, tablets and sachets.

2. The main drawback found during stability studies was the caking tendency in the hydrophilic formulation for sachets. This effect occurs under extreme conditions of humidity ($96\% \pm 5\%$) and after 24 months being easily reversible because the formulations are dispersed and solubilized in an aqueous medium. Therefore, we suggest 24 months as expiration date.

3. From the chemical point of view and based on the G₁ test compound as an indicator of stability, the amount of AHCC present in the formulation influences its own stability. Formulations containing higher doses have a higher percentage of degradation than lower doses. In the same way, the larger the percentage of excipient in the formulation, the less degradation observed.

4. The improved formulation in sachets from a stability point of view has to contain a relatively low dose of AHCC (0.6 g) with lots of excipients resulting in a final weight of 3.13 g granulate. As packaging materials, aluminium- aluminium sachets are used and is recommended to avoid storage conditions with excessive moisture.

5. The characteristics *in vivo* of AHCC were evaluated by analyzing some of its components: glucose, G₁ and isomaltol after oral administration. No hyperglycemic effect was detected even after oral administration of doses up to 5 g of AHCC-FD to healthy volunteers under fasting conditions. G₁ and isomalt are not detected in plasma samples after oral administration of AHCC in humans and mice. We conclude therefore that these molecules are not useful to indicate the oral bioavailability of the formulation.

6. It was observed that AHCC is useful by itself to reduce the number of parasites in an experimental mouse model of *T. spiralis*. AHCC administration reduces the number of parasites in the intestinal phase and inflammation (Th1 response decreases which was quantified by interleukins: TNF and IFN γ) compared to the untreated control group.

7. No significant differences in activity was observed after the administration of the same dose of raw material (AHCC-FD) and the developed formulation in sachets concluding that they are pharmacodynamic bioequivalent.

