



**CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES UNIVERSIDAD DE
ORIENTE**



**Tesis Presentada en Opción al:
Título Académico de Máster en Biotecnología Mención Industrial**

**Caracterización de un suplemento nutricional de *Pleurotus* sp. y evaluación de su
actividad inmunomoduladora en biomodelos experimentales *in vivo*.**

**Autora:
Lic. Yamila Lebeque Pérez**

**Tutores:
DrC. Humberto Joaquín Morris Quevedo
DraC. Rosa Catalina Bermúdez Savón**

**Santiago de Cuba, 2013
“Año 55 de la Revolución”**

Pensamiento

*El hombre encuentra a Dios detrás de
cada puerta que la ciencia logra abrir*

Albert Einstein

Dedicatoria

A la memoria de mi Abuelita querida

Agradecimientos

Las Gracias, en primerísimo lugar a Dios, por el simple y a la vez gran hecho de estar aquí y ser quien soy. Por toda la energía que necesité y me concedió, durante las continuas y difíciles jornadas desde el pasado 17 de Enero hasta hoy.

A mis abuelos paternos, por ser ejemplos de dignidad, de sacrificio y entrega, en mi formación como persona de bien y porque aún desde la ausencia me acompañarán, con todo ese amor, en el camino por recorrer.

A mis padres, los mejores que podría tener, por sus desvelos, su apoyo y su amor incondicional.

A mis tutores:

Humberto: Por su disposición para ser mi guía en este recorrido científico, por su exigencia, por alentarme y por su tiempo.

Rosa Catalina: Por su inestimable aporte de experiencias en la conclusión de esta obra.

A mis compañeros del CEBI, especialmente los que formaron parte del excelente claustro de la Maestría en Biotecnología, por poner a mi disposición todo su caudal de conocimientos para llegar a esta meta.

Gabriel: Por su amistad, sus consejos y su dedicación a la realización de este trabajo.

A mis compañeros del grupo de la 7ma ed. de la Maestría, por compartir desde los momentos más tensos hasta los más divertidos, durante la colegiatura y fuera de ella. Especialmente a Enrique y Ariel, por comprender mejor de que se trata la unión y por enseñarme alguna que otra lección en silencio. Sé que pudo ser mejor, pero creo que lo hicimos bien.

A mis amigas Katia, Yurisan y Enma por estar ahí cuando lo necesité y por ser mi familia también.

A mi madrina y amiga Jane, por darme el apoyo espiritual que requerí de ella y por su habitual desenfado para decirme lo que necesitaba escuchar.

A Tamarita por brindarme su amistad y por su especial contribución material en este proceso.

A Migue y sus esposa Jeny, por acogerme y contribuir al logro de mis empeños personales en medio de los quehaceres de la superación profesional.

A Yaixa, Angel, Teresa, Abelardo, Yamirka, Sonia, Adriana y Viviana, así como al resto de los compañeros o amigos, que dieron su aporte en tiempo, materiales ó ayuda personal para la realización de la Tesis.

A Roberto, por llenar tantos momentos y ocupar un espacio tan importante en mi vida, por compartir desde su visión mis sueños y por todo el apoyo para que saliera adelante, en este paso importante de mi carrera.

A todos aquellos que no he nombrado aquí, pero que me desean lo mejor y me quieren.

RESUMEN

Las setas comestibles han sido consumidas durante milenios como alimento valioso, y también por sus efectos sobre la salud humana. Sin embargo, las potencialidades nutricionales y medicinales de muchas especies, aún son investigadas. En el presente trabajo se desarrolló un suplemento nutricional, formulado como tabletas, de *Pleurotus* sp. a partir de la biomasa seca y pulverizada de cuerpos fructíferos, obtenidos por fermentación en estado sólido (FES) sobre pulpa de café. En su composición bioquímica se destaca la presencia de proteínas (20 %) y carbohidratos (55 %), la existencia de β -1,3-1,6-D- glucanos (1.54 g/100 g) y minerales (Fe, Cu, Zn, Mn, Mg y Co). El tamizaje fitoquímico permitió identificar metabolitos de bajo peso molecular biológicamente activos. El contenido de polifenoles en extractos acuoso y etanólico fue de 138.4 mg/100 g y 86.37 mg/100 g respectivamente. Se evaluaron las propiedades inmunomoduladoras del suplemento en dos biomodelos experimentales. La administración durante 14 días (vía oral, 1000 mg/kg) a ratones inmunocompetentes, mostró un comportamiento diferencial según el sexo. Se observó un incremento en los conteos leucocitarios dentro de los valores normales para la especie, con diferencias significativas de linfocitos y polimorfonucleares en machos y hembras, respectivamente. No se apreciaron variaciones de la celularidad esplénica, y se observó un aumento de macrófagos peritoneales en las hembras tratadas y en menor grado, en los machos. No hubo diferencias significativas en los niveles de hemoglobina y proteínas séricas totales, aunque se evidenció un comportamiento diferencial hacia la síntesis de la fracción globulínica en las hembras tratadas. Se estimuló la inmunidad celular, por inducción de hipersensibilidad retardada, particularmente en los machos. El efecto inmunoprotector de la preparación, también se evaluó en ratones Balb/c machos inmunodeprimidos con ciclofosfamida (100 mg/kg, vía i.p.). Los ratones tratados profilácticamente mostraron menor inmunosupresión y una recuperación hematopoyética más rápida; ello se reflejó en un aumento de la celularidad de la médula ósea y de los conteos leucocitarios. Se incrementó la fracción globulínica del suero, con una relación albúmina/globulina menor y el preparado estimuló además la respuesta inmune celular, según el ensayo de hipersensibilidad retardada. En general, el suplemento potenció los mecanismos de defensa *in vivo* y fue bien tolerado por los animales tratados durante su administración. Estos resultados sugieren una relación entre los compuestos bioactivos presentes en el suplemento y el efecto inmunomodulador, además de sus propiedades nutricionales.

ABSTRACT

Edible mushrooms have been consumed for millennia as valuable food, and also for their effects on human health. However, the nutritional and medicinal potential of many species are still under investigation. In this paper, we developed a nutritional supplement, formulated as tablets, from *Pleurotus* sp. fruiting bodies dried and powdered biomass, obtained by solid state fermentation (SSF) on coffee pulp. The mayor components in its biochemical composition were proteins (20 %) and carbohydrates (55 %), in addition to the presence of β -1,3-1,6-D-glucans (1.54 g/100 g) and minerals (Fe, Cu, Zn, Mn, Mg and Co). The phytochemical screening identified biologically active metabolites of low molecular weight. The polyphenol content in aqueous and ethanol extracts was 138.4 mg/100g and 86.37 mg/100g respectively. Immunomodulatory properties were evaluated in the two experimental biomodels supplement. The 14-day administration (1 000 mg/kg, oral route) to immunocompetent mice showed a different behavior according to sex. An increase in leukocyte counts within the normal range for the specie, with significant differences in lymphocyte and polymorphonuclear between males and females, respectively. There were no changes in spleen cellularity, and an increase in peritoneal macrophages was found in treated females and to a lesser extent, in males. No significant differences were observed in the levels of hemoglobin and total serum protein, although a differential behavior towards the synthesis of the globulin fraction was showed in the treated females. Cellular immunity was stimulated as judged by the induction of delayed hypersensitivity, particularly in males. The immunoprotective effect of the preparation was also evaluated in Balb/c mice immunosuppressed with cyclophosphamide (100 mg/kg, i.p.). Prophylactic treated mice showed less immunosuppression and a faster hematopoietic recovery, reflected in increased bone marrow cellularity and leukocyte counts. Increased serum, globulin fraction with a lower an albumin/globulin ratio was also found. The preparation stimulated cellular immune response by the test of delayed hypersensitivity. In general, the supplement enhanced defense mechanisms *in vivo* and was well tolerated by the animals treated during its administration. These results suggest a link between the bioactive compounds contained in the supplement and the immunomodulatory effects, in addition to the nutritional properties.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

SNP-	=	Suplemento Nutricional Pleurotus
FOSHU	=	<i>Foods for Specified Health Use</i> (Alimentos para Uso Específico en la Salud)
CEBI	=	Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
CCEBI	=	Colección de Cultivos del CEBI
CENPALAB	=	Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
TOXIMED	=	Centro de Toxicología y Biomedicina
BIOCEN	=	Centro Nacional de Biopreparados
ICIDCA	=	Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
LABEX-CIM	=	Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales–Centro de Inmunología Molecular
INIFAT	=	Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
INHA	=	Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos
A	=	Absorbancia
FES	=	Fermentación en Estado Sólido
SSF	=	Solución Salina Fisiológica
BSA	=	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
PBS	=	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Solución Buffer Fosfato)
ACF	=	Adyuvante Completo de Freund
CY	=	Ciclofosfamida
i.p.	=	Intraperitoneal
i.v.	=	Intravenoso/a
i.d.	=	Intradérmico/a
IP	=	Índice de Peso
A/G	=	Relación Albúmina/Globulina
HPLC	=	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
LC/MS	=	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía Líquida/ Espectrometría de Masas)
PAI	=	Espectrometría de Plasma de Acoplamiento Inductivo
HeLa	=	Células neoplásicas de cuello cervico uterino aisladas de Henrietta Lacks
VIH	=	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	=	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
HR	=	Hipersensibilidad Retardada
CSFs	=	<i>Colony Stimulating Factors</i> (Factores Estimuladores de Colonias)
IFN	=	Interferón
IL	=	Interleucina
TNF- α	=	<i>Alfa Tumor Necrosis Factor</i> (Factor de Necrosis Tumoral alfa)
Th	=	Célula T helper

Abreviaturas

- LPS = Lipopolisacárido
MHC = *Major Histocompatibility Complex* (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)
NK = *Natural Killer* (Células Citocidas Naturales)
HDPs = *Human Defense Potentiators* (Potenciadores de la Defensa del Huésped)
BRMs = *Biological Response Modifiers* (Modificadores de la Respuesta Biológica)
PAMPs = *Pathogen Associated Molecular Patterns* (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos)
POPS = *Pleurotus ostreatus polysaccharides* (Polisacáridos de *Pleurotus ostreatus*)
TLRs = *Toll-like receptors*
ROS = *Reactive Oxygen Species* (Especies Reactivas del Oxígeno)
LD-50 = Dosis Letal Media

ÍNDICE

<u>Contenido</u>	<u>páginas</u>
INTRODUCCIÓN.....	1-2
OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3-16
1.1 - La ciencia de los alimentos saludables.....	3
1.1.1 - Alimentos Saludables y Otros Términos Relacionados.....	3-5
1.1.2 - Suplementos Dietéticos. Tendencias.....	5
1.2 - La Biotecnología y los Hongos Comestibles-Medicinales.....	5-6
1.2.1 - Biología y Cultivo de Hongos Comestibles.....	6
1.2.1.1 - Características Generales.....	6
1.2.1.2 - Cualidades Nutricionales.....	6-7
1.2.1.3 - Propiedades Medicinales de las Setas Comestibles.....	7
1.2.1.4 - Cultivo y Comercialización de Setas.....	7-8
1.2.2 - El Género <i>Pleurotus</i> . Particularidades.....	8
1.2.2.1 - Propiedades Nutricionales de <i>Pleurotus</i> spp.....	8-9
1.2.2.2 - Aplicaciones Medicinales del Género.....	9-10
1.2.3 - Productos Biotecnológicos Derivados de Hongos Comestibles-Medicinales	10-11
1.3 - Las Setas Comestibles y la Respuesta Inmune Humana.....	11
1.3.1 - Inmunodeficiencias.....	11
1.3.2 - Estado inmunodeficitario como Consecuencia del Tratamiento Quimioterapéutico.....	11-12
1.3.3 - Inmunoterapia.....	12
1.3.4 - Compuestos Inmunomoduladores en los Hongos Comestibles-Medicinales	13
1.3.4.1 - Polisacáridos β -D-glucanos en las setas. Estructura y Actividad Biológica.....	13-14
1.3.4.2 - Mecanismo de acción de los β -D-glucanos de setas.....	14-15
1.3.5 - Productos Inmunocéuticos. Aplicaciones Terapéuticas.....	15-16
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17-23
2.1 - Microorganismo Utilizado	17
2.2 - Obtención de la Materia Prima del Suplemento Nutricional (Biomasa Seca y Pulverizada de <i>Pleurotus</i> sp.....	17
2.3 - Obtención de Extractos a partir del Suplemento Nutricional.....	17
2.4 - Caracterización Bioquímica del Suplemento Nutricional.....	17
2.4.1 - Determinación de los Componentes Macromoleculares Mayoritarios Presentes en el Suplemento	17
2.4.2 - Cuantificación de β -1,3-1,6-glucanos.....	18
2.4.3 - Determinación de Minerales.....	18
2.4.4 - Tamizaje Fitoquímico.....	18
2.4.5 - Cuantificación de Fenoles.....	18
2.5 - Formulación.....	18
2.6 - Evaluación de los Efectos Inmunomoduladores del Suplemento Nutricional en Ratones Balb/c Inmunocompetentes.....	18

	<i>Índice</i>
2.6.1 - Animales y Esquemas Experimentales.....	18-19
2.6.2 - Consumo de agua y alimentos.....	19
2.6.3 - Peso Corporal	19
2.6.4 - Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.....	20
2.6.5 - Análisis Bioquímicos en Suero.....	20
2.6.6 - Celularidad en el Exudado Peritoneal	20
2.6.7 - Anatomopatología Macroscópica y Peso Relativo de los Organos.....	20
2.6.8 - Celularidad Esplénica.....	21
2.6.9 - Ensayos de Estimulación de la Inmunidad Celular. Inducción de Respuesta de Hipersensibilidad Retardada (HR).....	21
2.7 - Evaluación de las Propiedades Inmunomoduladoras del Suplemento Nutricional en Ratones Balb/c Inmunodeprimidos con Ciclofosfamida.....	21
2.7.1 - Animales y Tratamientos Experimentales.....	21-22
2.7.2 - Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.....	22
2.7.3 - Análisis Bioquímico en Suero.....	22
2.7.4 - Celularidad de la Médula Osea	22
2.7.5 - Anatomopatología Macroscópica.....	22
2.7.6 - Contenido de Proteínas Hepáticas Totales	22
2.7.7 - Celularidad Esplénica.....	22
2.7.8 - Ensayos de Estimulación de la Inmunidad Celular.....	22
2.7.8.1 - Inducción de Respuesta de Hipersensibilidad Retardada (HR).....	22-23
2.7.8.2 - Índice de Peso del Linfonodo Poplíteo	23
2.8 - Análisis Estadísticos.....	23
 CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 24-42
3.1 - Caracterización Bioquímica del Suplemento Nutricional de <i>Pleurotus</i> sp. Relación con sus Propiedades Medicinales Potenciales.....	24
3.1.1 - Determinación de Componentes Macromoleculares Mayoritarios.....	24-25
3.1.2 - Cuantificación de polisacáridos del tipo β -1,3-1,6-glucanos.....	25-26
3.1.3 - Determinación de Minerales.....	26-27
3.1.4 - Tamizaje fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico derivados del suplemento	27-29
3.1.5 - Contenido fenólico en extractos del suplemento de <i>Pleurotus</i>	29-30
3.2- Formulación del Suplemento.....	30
3.3- Evaluación de los Efectos Inmunomoduladores del Suplemento Nutricional de <i>Pleurotus</i> sp. en Ratones Balb/c Inmunocompetentes.....	30-31
3.3.1 - Efectos del Suplemento de <i>Pleurotus</i> en los Niveles de Proteínas Séricas...	31
3.3.2 - Efectos Sobre Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.....	31-32
3.3.3 - Influencia Sobre la Celularidad Esplénica	32-33
3.3.4 - Estimulación de Macrófagos Peritoneales.....	33-34
3.3.5 - Estimulación de la Respuesta Inmune Celular <i>in vivo</i>	34
3.3.6 - Anatomopatología Macroscópica y Masa Relativa de Organos.....	34
3.3.7 - Consideraciones Preliminares de la Toxicidad a Dosis Repetidas del Suplemento de <i>Pleurotus</i> Administrado por Vía Oral	35-36
3.4- Evaluación de las Propiedades Inmunomoduladoras del Suplemento Nutricional de <i>Pleurotus</i> en Ratones Balb/c Inmunodeprimidos.....	36
3.4.1 - Influencia de la Suplementación sobre Proteínas Séricas.....	37
3.4.2 - Resultados de la Administración del Suplemento Sobre Parámetros	38-39

Hematológicos en Sangre Periférica.....	
3.4.3 - Celularidad de la Médula Osea	39
3.4.4 - Comportamiento de la Celularidad Esplénica.....	39
3.4.5 - Contenido de Proteínas Hepáticas Totales.....	40
3.4.6 - Estimulación de la Respuesta Inmune Celular <i>in vivo</i>	40
3.4.7 - Anatomopatología Macroscópica y Observaciones Clínicas.....	41
3.5 - Discusión General.....	41-42
CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45-59

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, una gran cantidad de productos naturales con diferentes efectos biológicos son comercializados como suplementos nutricionales. Bajo ciertos requisitos y regulaciones, menos exigentes que los necesarios para el desarrollo de productos farmacéuticos, éstos se producen y distribuyen, representando en muchos casos, una contribución a la terapéutica de diversas enfermedades (Marcos, 2009).

Aunque en el listado de suplementos dietéticos producidos en el mundo entero imperan las plantas medicinales (Camelini y col., 2005), hoy día se conocen numerosas fuentes naturales con elevado valor nutritivo. Ellos pueden ejercer también efectos fisiológicos modulando los sistemas inmune, nervioso y endocrino, como es el caso de las setas comestibles (Reshtnikov y col., 2001).

Si bien las setas comestibles tienen una larga historia de uso a través de diversas culturas, su utilización actual está respaldada, por evidencias científicas, y la última década ha sido testigo del enorme interés de las investigaciones, relacionadas con el potencial farmacéutico que estas presentan (Patel y Goyal, 2012).

Los estudios sobre sus propiedades medicinales, se han orientado hacia el descubrimiento de compuestos que puedan modular la respuesta biológica del sistema inmunitario, con gran interés en la identificación de sustancias para el tratamiento del cáncer y las inmunodeficiencias (Tzianabos, 2000). En este sentido, la industria biotecnológica y en particular la rama industrial, se ha convertido en una importante herramienta, capaz de explotar las oportunidades que ofrecen estos microorganismos, para sustentar el desarrollo de nuevos productos con aplicaciones terapéuticas.

Dentro del grupo de las setas comestibles pertenecientes a la clase Basidiomycetes, el género *Pleurotus* incluye especies que han sido empleadas por diferentes civilizaciones, como alimento de gran valor nutritivo debido a su alto contenido de proteínas, fibras y minerales, y adicionalmente, por sus características medicinales.

Entre las numerosas especies de *Pleurotus*, las más conocidas son: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. florida*, *P. levis*, *P. eryngii*, *P. tuber-regium* y *P. djamor* (Morales y col., 2010). Ellas representan una fuente valiosa de nutrientes (Curvetto, 2004; Costa y col., 2006) y contienen también, diversos compuestos biológicamente activos con efectos terapéuticos (Gunde-Cimerman, 1999).

Trabajos recientes realizados en diferentes especies de este género, también han evidenciado su considerable potencial inmunobiológico. Entre las diversas sustancias con efecto en la respuesta inmune que han sido aisladas de *Pleurotus* spp., se encuentran fundamentalmente polisacáridos del tipo β -glucanos. Los β -glucanos son considerados modificadores de la respuesta biológica (BRMs, del inglés Biological Response Modifiers) con un potente efecto inmunomodulador. Estos compuestos presentes en bioproductos derivados de setas comestibles, estimulan diferentes poblaciones celulares del sistema inmune (Gregori y col., 2007).

Si bien la mayoría de los estudios relacionados con las propiedades inmunomoduladoras de *Pleurotus* spp. se han enfocado al aislamiento de los compuestos bioactivos, en particular polisacáridos, se debe tomar en consideración el posible efecto sinérgico de las biomoléculas presentes en los extractos y otras preparaciones (Morris y col., 2012).

En Santiago de Cuba, el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), adscrito a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente posee una amplia experiencia en el cultivo y utilización del basidiomiceto *Pleurotus* sp. como alimento (Bermúdez y col., 1994,

2001, 2002, 2003; Bermúdez y García, 2010). En adición a esto, un equipo de especialistas de esta institución ha llevado a cabo investigaciones sobre las propiedades nutricéuticas de la seta y ha realizado varios estudios para demostrar sus características inmunomoduladoras (Morris y col., 2002, 2003, 2007, 2011, 2013, 2013a; Beltrán y col., 2005; Llauro y col., 2005, 2012).

En nuestro país, estas investigaciones tienen un carácter novedoso; de ahí el interés de profundizar en el conocimiento de los efectos inmunomoduladores de los bioproductos de *Pleurotus* spp., enfoque poco abordado y que resulta esencial para valorar su modo de acción en el mantenimiento y/o restauración de la integridad funcional del organismo.

Por otro lado, mientras en muchos países como China, Japón, Francia, España, Canadá, México, EE.UU. y Brasil, se formulan suplementos dietéticos de setas; en Cuba, hasta la fecha, no se conoce ningún producto natural elaborado a partir de esta fuente.

El CEBI dispone de la infraestructura y la experiencia requeridas para tales fines y a esto se suma también la existencia de varios programas nacionales, que promueven estas investigaciones. Por tales motivos, desarrollar un producto de esta naturaleza en nuestro país resulta posible, en función de la necesidad de disponer de preparaciones inmunocéuticas con aplicaciones terapéuticas potenciales y las posibilidades que en tal sentido ofrecen los hongos comestibles.

Los elementos anteriormente considerados, nos permitieron suponer que el desarrollo de un suplemento dietético con efectos inmunomoduladores, derivado de *Pleurotus* sp., constituye un proyecto de interés a partir de la identificación del problema siguiente:

Existe en nuestro país un mercado no cubierto de suplementos nutricionales a partir de productos naturales, en el que no se han explotado como fuente las setas comestibles-medicinales; de ahí que también las evidencias experimentales acerca de las propiedades inmunoestimulantes de *Pleurotus* sp. sean limitadas.

Tomando en consideración el problema planteado, se formuló la siguiente hipótesis:

El suplemento nutricional formulado a partir de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., es capaz de modular la respuesta inmunitaria de ratones Blab/c tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos por citostáticos, en correspondencia con la disponibilidad de macromoléculas y fitoquímicos presentes en su composición.

A partir de la hipótesis planteada en nuestro trabajo, se definieron los siguientes objetivos:

Objetivo General

Caracterizar un suplemento nutricional obtenido a partir de la seta comestible *Pleurotus* sp. y evaluar sus efectos inmunomoduladores en biomodelos experimentales *in vivo* de inmunocompetencia e inmunodepresión.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la biomasa seca y pulverizada de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. e identificar componentes biológicamente activos en ella presentes.
- Evaluar los efectos inmunomoduladores de la formulación de *Pleurotus* sp., con la administración por vía oral a ratones Balb/c inmunocompetentes, de ambos sexos.
- Evaluar las propiedades inmunomoduladoras de la formulación, administrada en régimen profiláctico y terapéutico, a ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS SALUDABLES.

La Ciencia de los Alimentos Saludables, es una nueva rama de la bromatología, encargada de investigar e identificar los compuestos alimenticios capaces de aportar beneficios al organismo que los consume; esclarecer los mecanismos implicados en dichos efectos; así como diseñar nuevos productos cuyo consumo promueva el bienestar y la salud, y poner a punto tecnologías que brinden una forma comercial a las nuevas formulaciones establecidas. Resume así un extenso campo cuyo fin es aprovechar los beneficios saludables que aportan los alimentos (Bello, 2006).

La creciente atención por las implicaciones de la alimentación en la salud, ha motivado cambios en los hábitos alimentarios. Los nutrientes son identificados como algo más que meros donadores de energía, pasando a ser considerados precursores de macromoléculas indispensables para el crecimiento y la proliferación celular, la señalización entre tejidos, la **defensa inmunológica** y el mantenimiento de la integridad de los órganos.

Los cambios que se están produciendo en el campo de la Nutrición Farmacológica constituyen una revolución científica que conducirá al aprovechamiento máximo de las posibilidades terapéuticas existentes en los alimentos (Lull y col., 2005). Se trata de una frontera de la ciencia de la nutrición, que desarrollará **nuevos alimentos** en función de la modulación que puedan ejercer los componentes de la dieta en los procesos del organismo (Serrano y col., 2005).

1.1.1 Alimentos Saludables y Otros Términos Relacionados.

En los últimos años se ha prestado mucha atención a las funciones fisiológicas de los alimentos, debido a las preocupaciones cada vez mayores sobre la salud humana (Arihara, 2006). Según Cortés y col. (2007), el interés creciente de la población por los efectos saludables de los alimentos y sus preferencias por productos naturales, es un fenómeno atribuido a causas como:

- El envejecimiento de la población a nivel mundial y su inclinación por una vida saludable.
- La aceptación progresiva de tratamientos alternativos, favorecida por la insatisfacción con las terapias convencionales.
- El incremento de la educación nutricional y su relación con la salud.
- Una mayor integración de profesionales de la salud en general y otras ramas de la ciencia.
- La gran cantidad de investigaciones científicas y evidencias clínicas sobre la seguridad y efectividad de estos productos.
- El énfasis de instituciones y gobiernos en la necesidad de disminuir los costos de salud.
- La existencia de mayor cobertura de los medios y de promoción para dichos productos.

Tales causas han incidido en la producción de alimentos del siglo XXI. De modo, que los conceptos a favor de una alimentación ajustada a los niveles dietéticos recomendados para evitar enfermedades carenciales han sido desplazados. En los conceptos actuales se sugiere una ingesta alimentaria con niveles óptimos de macro- y micronutrientes para impedir el desarrollo de enfermedades crónicas. Ello está respaldado por el descubrimiento, en determinados alimentos, de sustancias específicas con funcionalidad para la salud (Takachi y col., 2007).

Numerosas investigaciones demuestran la presencia en los alimentos de componentes capaces de modular funciones en el organismo, favoreciendo con ello el mantenimiento del estado de salud y reduciendo el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con el estilo de vida (Kuriyama y col., 2006; Nöthlings y col., 2007). El aumento de fuentes naturales en la demanda de los consumidores, ha resultado en una emergencia de la comercialización de productos promotores de la salud (Aida y col., 2009), cuyo desarrollo implica un cambio en los enfoques científicos y de mercado tradicionales, dado que han sido diseñados no solo para cumplir con los estándares

nutrimentales básicos, sino para proporcionar una amplia gama de efectos provechosos adicionales (Trigos y Suárez-Medellin, 2010).

En esta categoría de productos se encuentran los llamados **suplementos dietéticos**, alimentos de diseño, **nutracéuticos**, **alimentos funcionales**, y otros. Todos estos términos, son referidos a los alimentos que tienen especiales efectos sobre la salud humana (Aida y col., 2009).

Las tendencias mundiales de la alimentación indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios al organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los **alimentos funcionales**.

Existen cientos de definiciones que describen el concepto de alimentos funcionales. Pero desafortunadamente, la diversidad entre las definiciones constituyen una dificultad para brindar a los empresarios, información sólida sobre las tendencias del mercado potencial, o para proteger adecuadamente a los consumidores a través de legislaciones (Aida y col., 2009).

En los años 80 del pasado siglo, fue introducido en Japón el concepto de "Alimentos Para Uso Específico de Salud" (FOSHU, del inglés Foods For Specified Health Use) para referirse a aquellos alimentos procesados que contienen ingredientes que desempeñan un papel específico en las funciones del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental.

Junto a un grupo de expertos de América del Norte, Estados Unidos y Europa, Doyon y Labrecque (2008) redefinieron el concepto de alimentos funcionales como un alimento convencional o similar a este, que forma parte de la dieta estándar, se consume regularmente en cantidades normales y ha demostrado poder reducir el riesgo de enfermedades crónicas o beneficiar funciones específicas más allá de sus funciones nutricionales básicas.

Los nutracéuticos se definen como sustancias químicas o biológicas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos, que administradas en dosis superiores a las existentes en esos alimentos, presumen un efecto favorable sobre la salud mayor al que posee el alimento normal, y resultan especialmente beneficiosas, tanto en la prevención de enfermedades como en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo. Los alimentos funcionales o productos nutracéuticos son los elementos nutricionales que pueden tener beneficios para la salud, más allá de lo que puede proporcionar la dieta básica (Pérez, 2006).

Por su parte, los suplementos dietéticos, son productos que contienen ingredientes beneficiosos para la salud como vitaminas, minerales, especies vegetales, aminoácidos, extractos y concentrados, metabolitos y otros, que se emplean para suplementar la dieta incrementando la ingesta diaria de esas sustancias. Muchos complementos alimenticios pueden ser considerados nutracéuticos, siempre que las sustancias que aporten sean de origen natural y cumplan los requisitos (Pérez, 2006).

En adición a lo anterior, el concepto de nutracéutico se resume como "aquel suplemento dietético" que proporciona de forma concentrada un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal (Zeisel, 2000).

El reconocimiento de BRMs en las **setas comestibles**, conllevó a que fuese acuñado el término de **setas nutracéuticas** (Wasser y col., 2005). Dicho término incluye extractos refinados o parcialmente refinados del micelio o cuerpos fructíferos de hongos comestibles, que se consumen como un suplemento dietético en forma de cápsulas y comprimidos, y no como un alimento en si y que además poseen un potencial terapéutico elevado (Garza y col., 2006). Los compuestos

nutracéuticos de hongos (Wasser y col., 2005), se denominan **inmunocéuticos**, cuando son capaces de estimular el sistema inmune (Petrova y col., 2005).

En algunos países, sólo existe la definición de suplementos dietéticos. El término alimentos funcionales no está legalizado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), pero es ampliamente utilizado por los nutricionistas. Los términos nutraceuticos, nutracéuticos (Wasser y Weis, 1999) y más recientemente inmunocéuticos, son reconocidos por la comunidad científica, pero no se encuentran en ninguna regulación legal (Wasser y col., 2004; Petrova y col., 2005).

1.1.2 Suplementos Dietéticos. Tendencias.

Los suplementos dietéticos cubanos, como en otros países, integran el grupo de los Productos Naturales (Marcos, 2008). En el país se han desarrollado, al menos, 298 productos naturales destinados a la salud, registrados ya sea como medicamentos o como suplementos dietéticos. Las mayores fuentes de materia prima las constituyen la caña de azúcar y otras plantas, de las cuales se han obtenido productos como el PPG, aceites esenciales y otros (Peláez, 2006).

Entre los productos comercializados figuran, los comprimidos de *Spirulina* y Jalea Real, así como el Trofin y el Vimang. Se encuentran también productos del tabaco (alcaloides), anticuerpos monoclonales, varios productos marinos (quitina, prostaglandinas, cartílago de tiburón) y derivados de algas. Se estima que la cifra puede crecer, ya que el país, considerando solo la flora etnomédica, cuenta con al menos 314 plantas endémicas medicinales, agrupadas en 188 géneros de 35 familias, lo que resulta un potencial para el desarrollo de tales productos (Peláez, 2006).

En el mundo, además de los productos herbarios se pueden encontrar otros, derivados de distintos organismos capaces de sintetizar compuestos beneficiosos para la salud, que también son formulados como suplementos dietéticos. Es el caso de las **setas comestibles**, cuyo consumo se remonta a tiempos inmemoriales, ya que han sido consideradas por la humanidad como una maravilla culinaria y como medicina popular en la práctica oriental (Patel y Goyal, 2012).

El interés en los productos naturales para el tratamiento de varios desórdenes fisiológicos ha potenciado su estudio (Chang y Buswell, 2003; Wasser y col., 2004), ya que las setas han sido apreciadas, desde la antigüedad, por la alta cocina en el mundo como un **alimento** de sabor único y sutil y más recientemente han sido valoradas como **medicamentos** por la industria farmacéutica por ser una fuente reconocida de compuestos bioactivos (Patel y Goyal, 2012).

1.2 LA BIOTECNOLOGÍA Y LOS HONGOS COMESTIBLES-MEDICINALES.

Los hongos son un grupo de organismos pertenecientes al Dominio Eucarya, Reino Fungi. La clasificación de los organismos que lo integran ha sido difícil debido a la complejidad y heterogeneidad de sus grupos. El reino se integra por los phyla Ascomycota, Zygomycota Chitridiomycota y Basidiomycota, los cuales forman un grupo denominado “hongos verdaderos”. El phylum Basidiomycota es el segundo en importancia y está formado por unas 23 000 especies, entre las que se encuentran las setas comestibles (Blackwel y Spatafora, 2004).

En la actualidad el número estimado de hongos superiores a nivel mundial, oscila alrededor de unos 14 000. Existen por lo menos 12 000 especies que pueden considerarse como setas, con al menos 2 000 que son comestibles. Se piensa además, que alrededor de 700 poseen propiedades farmacológicas importantes (Wasser, 2002, 2010).

El cultivo de hongos tiene una larga tradición en países de Asia, especialmente en China, donde se inició alrededor del año 600 a.c. (Kues y Liu, 2000). Según Sánchez (2004) unas 200 especies de setas comestibles se han recolectado en el medio silvestre y se utilizan con propósitos médicos tradicionales.

Las setas en general presentan numerosas e interesantes potencialidades de biosíntesis; así como capacidad para producir una gran variedad de componentes útiles al hombre, lo que les ha permitido jugar un importante papel en el desarrollo de la **biotecnología**, con aplicaciones en otras áreas de la actividad industrial como la alimentaria, la farmacológica y la medicinal.

1.2.1 Biología y Cultivo de Hongos Comestibles-Medicinales.

1.2.1.1 Características Generales

Son organismos formados por células eucariotas con una pared celular rígida, generalmente compuesta de quitina (Rodríguez y Jaramillo, 2005). Se caracterizan por ser inmóviles y se hallan ampliamente distribuidos en la naturaleza degradando y reciclando la materia orgánica a merced de sus numerosas potencialidades metabólicas de tipo quimioheterótrofo (Guzmán y col., 1993).

Presentan nutrición heterótrofa por absorción y utilizan carbono como fuente de energía y para la elaboración de las estructuras de la célula. Entre los compuestos que más comúnmente emplean están los carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, algunos alcoholes y la lignina. Asimilan el nitrógeno para la elaboración de sus proteínas y las principales fuentes de este la obtienen a partir de la degradación de peptonas y aminoácidos. Entre los minerales más importantes para su crecimiento están el Fe, Cu, Mg, Na, K, Ca y P, los que pueden adquirir por medio de sales como cloruros, fosfatos y carbonatos (Guzmán y col., 1993).

Se reproducen en ausencia de la luz solar por vía sexual y asexual, no realizan fotosíntesis y su eficiencia en la conversión de proteína por unidad de área y unidad de tiempo es muy superior, comparada con las fuentes de proteína animal (Rajaratnam y Bano, 1991).

Los hongos comestibles también desempeñan un importante papel en la ecología del ciclo del carbono. Por su carácter saprofítico pueden reducir la acumulación de residuos orgánicos en la naturaleza convirtiéndolos en **alimentos humanos** de buen sabor (Rodríguez, 2006).

1.2.1.2 Cualidades Nutricionales.

Desde sus inicios la humanidad ha valorado a las setas comestibles como una clase especial de alimento (Chang y Buswell, 2003). La importancia de los hongos en la alimentación reside en su valor dietético, bajo contenido en grasas, significativo contenido de proteínas y vitaminas, que los coloca por encima de la mayoría de los vegetales, frutas y verduras. También resultan complementos deliciosos en las comidas por sus propiedades organolépticas (Tormo, 1996).

Desde el punto de vista estrictamente nutricional, constituyen una magnífica fuente de alimentos, con todos los aminoácidos esenciales para la dieta humana, la presencia de quitina como fuente de fibra dietética y carecen por completo de colesterol (Trigos y Suárez-Medellín, 2010).

Las diversas especies de setas comestibles están compuestas principalmente por agua (90 %) y la materia seca por proteínas (10-40 %), grasas (2-8 %), carbohidratos (3-28 %), fibra (3-32 %) y cenizas (8-10 %), donde se incluyen los minerales (Partos, 2005; Figueroa y Lama, 2007; Firenzuoli y col., 2008). Son particularmente ricas en polisacáridos del tipo, **β-glucanos**, β-proteoglucanos, heteroglucanos, quitina, peptidoglucanos; así como, en **minerales** (potasio, calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, sodio), vitaminas (tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), biotina (B8), ácido ascórbico (C) y D); contienen también ergosterol, tripsina, maltasa y enzimas hidrolíticas que favorecen la digestión (Costa y col., 2006).

Sin embargo, y más allá de sus cualidades alimenticias, la importancia de los hongos en la salud humana no se limita al simple aporte de nutrientes esenciales (Trigos y Suárez-Medellín, 2010). Los problemas a escala mundial en el área de la alimentación, señalan el interés de los consumidores hacia este tipo de alimentos, que además de su valor nutritivo, aportan beneficios a

la fisiología del organismo humano, al ayudar a **prevenir enfermedades**, o al aumentar la resistencia contra ellas (Lesourd, 2004).

1.2.1.3 Propiedades Medicinales de las Setas Comestibles.

La utilización de las setas comestibles como medicamentos se remonta al año 3 000 a. c., cuando fueron aprovechadas para remediar diversas enfermedades. Después del descubrimiento de la penicilina (1929), los hongos fueron consideradas como fuentes naturales de antibióticos y otros compuestos fisiológicamente activos (Moradali y col., 2007). Las setas tienen una larga historia de uso en la medicina oriental, pero sus efectos legendarios en la promoción de salud y vitalidad, están siendo apoyados sólo por los estudios contemporáneos (Patel y Goyal, 2012).

El conocimiento empírico acerca de sus propiedades medicinales ha propiciado la realización de numerosas investigaciones científicas, descubriendo así una variedad extraordinaria de compuestos, tanto **componentes celulares** como **metabolitos secundarios** con propiedades farmacológicas y efectos fisiológicos significativos (Lull y col., 2005), que han confirmando las propiedades medicinales de los hongos en todo el mundo (Aida y col., 2009).

Se estima que un total de 126 efectos farmacológicos son producidos por las setas, entre las que se encuentran la actividad antiviral, hepatoprotectora, antibacteriana, antiparasitaria, antioxidante, y antifúngica (Wasser, 2010). Las investigaciones han favorecido el desarrollo de diversos productos naturales, a partir de las propiedades farmacológicas demostradas (Mizuno, 2002) y esto ha ocasionado, aparejado al consumo creciente de hongos frescos o en conserva, un incremento de su **comercialización** en forma de **suplementos dietéticos** (Wasser y col., 2004).

Entre los géneros comestibles que muestran características funcionales y medicinales se encuentran *Lentinula*, *Auricularia*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* y *Tremella*. Hace mucho tiempo se ha sugerido que estos hongos, particularmente, poseen efectos inmunomoduladores (Wasser, 2010) (anexo 1). Por su parte, *Ganoderma* y *Trametes* son géneros, reconocidos solo como medicinales, debido a que su consistencia es fibrosa y su sabor amargo (Ganeshpurkar y col., 2010). Entre las especies comestibles-medicinales mayormente estudiadas están *L. edodes*, *Grifola frondosa* y *P. ostreatus* (Lakhanpal y Rana, 2005).

1.2.1.4 Cultivo y Comercialización de Setas.

También en nuestros días, se cultivan comercialmente más de 15 especies de hongos comestibles, a través de **procesos biotecnológicos** altamente eficientes (Armendáriz y col., 2010).

Las primeras especies cultivadas fueron *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes* y *L. edodes* en los siglos VII, X y XI en China y Japón. *A. bisporus*, se obtuvo en Francia a partir del siglo XVIII. Estas y otras especies fueron objeto de atención también durante siglos en Corea y el Este de Rusia (Wasser, 2002). Luego, la tecnología fue asimilada discretamente en América entre finales del siglo XIX y la primera mitad del XX; aunque, fue en la segunda mitad del siglo XX cuando su presencia se hizo significativa en el continente, en países como, México, Brasil, EUA, Canadá y Colombia (Lull y col., 2005).

En la región de América Central y Latinoamérica, precisamente son México, Brasil y Colombia los principales productores. Se estima que los volúmenes de producción ascienden aproximadamente a 47 468 mil toneladas anuales de hongos frescos, liderados por México como mayor productor, que genera alrededor del 58.9 % del total en la región, y se ubica como el décimosexto productor a escala mundial (Martínez-Carrera y col., 2005).

Entre los principales géneros que se comercializan en la actualidad se encuentran *Agaricus*, *Grifola*, *Lentinula*, *Ganoderma* y *Pleurotus* (Martínez-Carrera y col., 2005). La especie más

cultivada en todo el mundo es *Agaricus bisporus* (champiñón), seguida de *L. edodes* (Shiitake), *Pleurotus* spp. (setas ostra), *A. auricula* (seta oído de madera), *F. velutipes* (hongo invierno) y *Volvariella volvacea* (seta de paja) (Aida y col., 2009) (anexo 2). Aunque la manufactura del champiñón comprende más de la mitad de la producción mundial, las setas como, *L. edodes* y *Pleurotus* spp., han incrementando su consumo y popularidad (Díaz, 2004).

1.2.2 El Género *Pleurotus*. Particularidades.

Clasificación taxonómica:

REINO: Fungi (Hongo)

DIVISIÓN: Basidiomycota

SUBDIVISIÓN: Basidiomycotina

CLASE: Basidiomycetes

ORDEN: Agaricales

FAMILIA: Pleurotaceae

GÉNERO: *Pleurotus*

Pleurotus spp. es el nombre genérico de toda una gama de hongos comestibles en los que se ha logrado reproducir sus hábitos ecológicos naturales (troncos de árboles secos, ramas muertas, hojarasca, etc.) para cultivarlos en sustratos lignocelulósicos diversos. Constituyen alrededor de 50 especies, muy conocidas en el mundo, variadas por sus colores, (amarillo, blanco, gris, marrón oscuro e incluso rosado), por sus formas, sabor y exigencias técnicas (Sobal y col., 2007).

Los hongos del género *Pleurotus*, crecen como saprófitos sobre plantas vivas o muertas. Se consideran de “pudrición blanca” por su posibilidad de degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa. Los caracteriza el rápido crecimiento, la gran velocidad del micelio para colonizar el sustrato, así como una alta adaptabilidad y productividad. Su capacidad para crecer en una amplia variedad de sustratos y en un amplio intervalo de temperaturas, ha permitido que su cultivo sea el más sencillo de todos los hongos comercializados y que su producción sea económicamente viable (Sánchez y Royse, 2002; Sales-Campos y col., 2009).

El cultivo de este género se inició apenas en el siglo XX, sin embargo, sus características le han permitido experimentar un desarrollo acelerado (Lechner y col., 2003) y ha llegado a cultivarse en casi todas las latitudes (Velasco, 2004). Por lo que el llamado hongo ostra, ha incrementado su producción en las últimas décadas, y su aceptación ha ido en aumento (Gregori y col., 2007).

Su producción en América se inició en México en 1933, seguido por Argentina (1941), Colombia (1950), Brasil (1951), Chile (1959), Guatemala (1960), Perú (1960) Ecuador (1967), Venezuela (1968), Costa Rica (1969) y Bolivia (1989) (García y col., 2006). En Cuba se inicia en el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA, La Habana) en 1988, empleando subproductos de la caña y se transfirió con éxito, a Santiago de Cuba en 1994. Allí el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, ha desarrollado de forma continua la investigación-producción de *Pleurotus* sp., sobre subproductos del café (Bermúdez y col., 2001).

1.2.2.1 Propiedades Nutricionales de *Pleurotus* spp.

Las especies de *Pleurotus* han sido utilizadas por las culturas humanas en todo el mundo por su alto valor nutricional, propiedades medicinales y otros efectos beneficiosos. Tales efectos son debido a la presencia de compuestos biológicamente activos con propiedades terapéuticas (Vamanu, 2012). La mayoría de ellas son comestibles con un elevado valor comercial (Cohen y col., 2002) y constituyen una buena fuente de fibra dietética y otros nutrientes valiosos.

El género comprende algunas de las setas comestibles más populares debido a sus características organolépticas y propiedades medicinales favorables, el crecimiento vigoroso y las relativamente poco exigentes condiciones de cultivo (Gregori y col., 2007). Entre sus especies más conocidas se encuentran *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. cornucopiae*, *P. levis*, *P. eryngii*, *P. tuber-regium* y *P. djamor* (Morales y col., 2010).

En general las especies del género *Pleurotus* se visualizan como una **alternativa biotecnológica** para la solución de problemas como la insuficiencia alimenticia y la contaminación por desechos orgánicos de origen agroindustrial; teniendo en cuenta sus potencialidades metabólicas y la versatilidad de sus cultivos (Llauradó, 2008).

1.2.2.2 Aplicaciones Medicinales.

Estudios recientes sobre las propiedades medicinales de diversas especies de *Pleurotus* se han centrado en una serie de compuestos bioactivos, con efectos terapéuticos **inmunomoduladores, antitumorales, antioxidantes**; así como hipocolesterolémicos, antihipertensivos, hipoglucémicos, antimicrobianos y antivirales. Estas acciones terapéuticas están presentes tanto en extractos como en compuestos (polisacáridos, proteoglicanos, proteínas y ADN), obtenidos del cuerpo fructífero, del micelio o del medio de cultivo de *Pleurotus* (Gregori y col., 2007).

Entre las propiedades medicinales de *Pleurotus* spp. se destaca la relacionada con sus efectos antitumorales. Los extractos crudos de varias especies de este género han presentado actividad antitumoral, por ejemplo, extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos de *P. florida* y *P. pulmonarius* redujeron significativamente el volumen de tumores sólidos en ratones (Jose y col., 2002). También un β -glucano altamente ramificado aislado de *P. tuber-regium*, y sus correspondientes derivados sulfatados solubles, mostraron una potente actividad antitumoral, *in vivo* e *in vitro*, en contraste con los β -glucanos insolubles en agua (Synytsya y col., 2009).

Los polisacáridos y nucleótidos son los compuestos mayoritariamente estudiados de *Ganoderma lucidum*. Algunos trabajos han evaluado sus efectos antitumorales en una gran variedad de tumores (Gao y Zhou, 2002), demostrando que inhiben la metástasis tumoral e incrementan el tiempo de supervivencia en biomodelos animales (Gao y Zhou, 2004).

Los efectos antitumorales descritos son mayormente atribuidos a la estimulación de la respuesta inmunológica. Investigaciones recientes han aislado compuestos con actividad estimuladora sobre la inmunidad celular y humoral de varias especies de *Pleurotus* (Gregori y col., 2007).

Polisacáridos hidrosolubles aislados del medio de fermentación de *P. citrinopileatus*, se administraron a ratones observándose en éstos un incremento en el número de macrófagos y linfocitos T (Wang y col., 2005). En otro trabajo, realizado por Olufemi y col. (2012), se comprobó que metabolitos extraídos de *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* incrementaron la leucopoyesis y la actividad fagocítica de macrófagos en ratas Wistar con leucemia.

La setas que contienen antioxidantes o niveles elevados de enzimas antioxidantes pueden ser utilizadas para reducir el estrés oxidativo (Gregori y col., 2007). Investigaciones realizadas recientemente han demostrado que algunas especies del género *Pleurotus*, contienen cantidades importantes de compuestos antioxidantes (Borchers y col., 2008), de este modo previenen el daño oxidativo relacionado con la edad y con ciertas enfermedades como aterosclerosis, diabetes, y cáncer (Kofuji y col., 2012). Estas actividades han sido atribuidas a mecanismos, tales como el “secuestro” de radicales libres y la capacidad reductora de estos compuestos (Liu y col., 2010).

El aislamiento de un complejo polisacaropéptido, a partir de cuerpos fructíferos de *P. abalonus*, prolongó la vida de ratones con senescencia acelerada. La expresión génica de las enzimas antioxidantes fue sobreexpresada y su actividad se vio incrementada (Gregori y col., 2007).

En estas setas se pueden apreciar igualmente, otras propiedades terapéuticas como la actividad antimicrobiana. Se han realizado investigaciones, en las que se aislaron glicopéptidos que contienen aminoácidos y monosacáridos (arabinosa, galactosa, manosa y xilosa), con una elevada capacidad fungicida y antibiótica. Estos componentes se han aislado del micelio y los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* (Wang y col., 2008; Ganeshpurkar y col., 2010).

Adicionalmente, contienen sustancias que ejercen, efectos antivirales como resultado de su actividad inmunoestimuladora (Borchers y col., 2008). Wang y col. (2007) demostraron la actividad inhibidora de la enzima retrotranscriptasa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), de extractos hidrosolubles de *P. sajor-caju* y *P. pulmonarius*. Del mismo modo, un β -glucano sulfatado obtenido de *P. tuber-regium*, exhibió una fuerte actividad antiviral contra el virus del herpes simple de los tipos 1 y 2 (Synytsya y col., 2009).

1.2.3 Productos Biotecnológicos Derivados de Hongos Comestibles-Medicinales.

Los hongos se han consumido como un suplemento dietético en países de Asia y Europa desde hace mucho tiempo (Lorenzana, 2009). Actualmente, en los mercados internacionales de la industria alimentaria y farmacéutica, se observa una creciente demanda de los productos derivados de hongos comestibles y medicinales con propósitos terapéuticos y de prevención de enfermedades, a través de suplementos alimenticios, con compuestos bioactivos o extractos fúngicos purificados (Armendáriz y col., 2010).

La confirmación científica de las propiedades funcionales en un gran número de hongos comestibles y medicinales, tanto en la fase vegetativa (micelio), como reproductora (cuerpo fructífero), así como el descubrimiento de sus mecanismos de acción en el organismo humano, están promoviendo un gran impulso al desarrollo de estas industrias (Armendáriz y col., 2010).

Muchos son los productos formulados a partir de hongos comestibles-medicinales que se encuentran disponibles en el mercado. Los ingredientes extraíbles de setas se han incorporado en los **productos biotecnológicos** comerciales para mejorar la función biológica del organismo humano (Aida y col., 2009).

Los mismos se han obtenido por distintas vías biotecnológicas (Wasser y col., 2004), empleando con mayor frecuencia la Fermentación en Estado Sólido (FES) (Díaz, 2004) y se consumen en diversas formas farmacéuticas (Wasser y col., 2004):

- Polvos de cuerpos fructíferos y sus extractos (por decocción o alcohólicos), solos o mezclados.
- Granos del sustrato, micelio y primordios combinados.
- Preparaciones farmacéuticas derivadas de la biomasa, extractos de micelio o medio de cultivo, obtenidos por cultivo sumergido en biorreactores.
- **Tabletas y cápsulas de cuerpos fructíferos secos y pulverizados.**

Ejemplos de productos comercializados, derivados de setas, son el Lentinano® (aislado de *L. edodes*), el Esquizofilano® (de *Schizophyllum commune*), el PSK ó Krestin® y el PSP (de *Coriolus versicolor*) que figuran entre los compuestos purificados mejor validados como antitumorales. También se encuentran el Grifolano® (de *G. frondosa*) (Wang y col., 2008), Triton® (una combinación de *Cordyceps sinensis*, *G. lucidum* y *L. edodes*) y los suplementos de *A. blazei* muy prescritos en Japón, para el tratamiento complementario del cáncer (Hirofumi y col., 2006) (Anexo 3).

Sin embargo, aún no se puede hablar de un mercado de productos de setas comestibles, que satisfaga las necesidades de la terapéutica clínica. Es necesario seguir estudiando los principios bioactivos con mayores posibilidades al respecto, sus posibles interacciones con receptores celulares y establecer estrategias tecnológicas para su elaboración (Llauradó, 2008).

1.3 LAS SETAS COMESTIBLES Y LA RESPUESTA INMUNE.

La inmunidad constituye un sistema homeostático muy complejo que consta de una red de interacciones entre células, tejidos y órganos. Esta permite mantener una vigilancia dentro del organismo y reconocer los componentes considerados como “no propios” (Morris y col., 2013).

La integridad del sistema inmunitario es esencial para la defensa contra los microorganismos y sus productos tóxicos, para la supervivencia de todos los individuos. Los defectos en los componentes de este sistema pueden dar lugar a trastornos graves, que en su conjunto reciben el nombre de **inmunodeficiencias** (Abbas y col., 2008), en las que el organismo carece de recursos inmunitarios suficientes para contrarrestar la penetración de agentes externos o la generación de células tumorales dentro del propio organismo. En estos casos se precisan agentes que incrementen la respuesta inmune, como los **fármacos inmunoestimulantes** (Flórez y col., 1998).

1.3.1 Inmunodeficiencias.

Las **inmunodeficiencias** se originan por defectos congénitos o adquiridos en los linfocitos, los fagocitos y otros mediadores inmunitarios específicos e innatos. Estas enfermedades se asocian con un aumento en la susceptibilidad a las infecciones, además, los pacientes con inmunodeficiencias suelen presentar un aumento en la incidencia de cánceres y enfermedades autoinmunitarias (Abbas y col., 2008).

La naturaleza de las infecciones en un paciente depende en gran medida del componente del sistema inmunitario afectado. Los defectos de la inmunidad humoral se asocian con una mayor susceptibilidad a las infecciones causadas por bacterias, mientras que los de la inmunidad celular predisponen a las infecciones por virus y otros microorganismos intracelulares. Las inmunodeficiencias combinadas de la inmunidad humoral y celular hacen a los pacientes propensos a las infecciones causadas por todo tipo de microorganismos, además de susceptibles a determinados tipos de cánceres (Abbas y col., 2008).

Las inmunodeficiencias se clasifican de manera general en inmunodeficiencias primarias y secundarias. Las inmunodeficiencias congénitas o primarias son defectos genéticos que se traducen en una mayor susceptibilidad a las infecciones y se manifiestan a menudo desde la lactancia y la infancia, aunque se pueden detectar clínicamente en etapas más avanzadas. Por otra parte, las **inmunodeficiencias secundarias** o adquiridas son un deterioro del sistema inmunitario debido a una enfermedad en personas previamente normales, que puede ser reversible.

Estas últimas, se desarrollan como consecuencia de la malnutrición, el cáncer, e infecciones de las células del sistema inmunitario, como en el caso del VIH. También pueden originarse como resultado del tratamiento con **fármacos inmunosupresores** (Abbas y col., 2008).

1.3.2 Estado Inmunodeficitario como Consecuencia del Tratamiento Quimioterapéutico.

La quimioterapia ha sido uno de los métodos mayormente utilizados en el tratamiento del cáncer; sin embargo, en muchos casos ella sola no logra resultados satisfactorios. Por otro lado, induce severos efectos adversos a dosis terapéuticas efectivas (Sullivan y col., 2006). Los pacientes con cáncer reciben diversos quimioterápicos que suelen ser citotóxicos para los linfocitos y para los

precursores de granulocitos y monocitos. Por tanto, la **quimioterapia** crea un periodo de **inmunodepresión** con riesgo de infección (Abbas y col., 2008).

La especificidad por las células tumorales es escasa y ello ocasiona la frecuente afectación de otros órganos y tejidos, dando origen a una toxicidad que a veces limita la administración de las dosis óptimas. Como es lógico, las células normales más afectadas son las que presentan mayor velocidad de división y crecimiento: las células blásticas de la médula ósea, las células gonadales y las de los diversos epitelios (mucosa, piel y órganos dérmicos (Finke y Bukowski, 2004).

La modificación estructural del genoma, provocada por los fármacos, puede originar formas de toxicidad más preocupantes como la mutagenicidad y la carcinogenicidad. Finalmente, muchos fármacos antineoplásicos alteran los mecanismos de división y procesamiento de las células implicadas en la inmunidad celular, de ahí que con frecuencia surja un estado de depresión inmunitaria en el que aparecen infecciones por virus, hongos y bacterias (Flórez y col., 1998).

La ciclofosfamida es un agente alquilante del ADN comúnmente utilizada en la terapia contra el cáncer. Actúa sobre una gran variedad de neoplasias, pero tiene efectos secundarios severos (Lieberman y col., 2008). Tanto su mecanismo de acción como sus efectos terapéuticos han sido originalmente descritos en relación a su acción antitumoral (Chen y col., 2007). Luego, por su potente acción inmunosupresora, comenzó a ser ensayada en el control de enfermedades autoinmunes y en el rechazo de transplantes (Lieberman y col., 2008).

1.3.3 Inmunoterapia.

La inmunoterapia se puede definir como la modulación controlada del sistema inmune para el tratamiento directo de algunas enfermedades o como coadyuvante, según el padecimiento. La terapia inmunológica, como ciencia aplicada se desarrolla cada vez más en todo el mundo.

Hasta hace poco la terapia anticancerígena se limitó a la quimioterapia que no podía discriminar las células tumorales de las células normales (Pandolfi y col., 2011). Tanto la quimioterapia como la radioterapia, están generalmente asociadas a efectos colaterales severos y a una reducción de la resistencia del hospedero al cáncer y a las enfermedades infecciosas (Yoona y col., 2008).

Más recientemente, la mejor comprensión de los mecanismos de la inmunorregulación ha sugerido nuevas estrategias para diseñar **inmunoterapias** nuevas y más eficaces (Pandolfi y col., 2011). Ello ha favorecido diferentes enfoques para potenciar la actividad antitumoral de las células inmunitarias y superar así la capacidad de las células cancerosas para evadir la vigilancia del sistema inmune (Sullivan y col., 2006).

En la inmunoterapia, la respuesta inmune juega un papel fundamental en la eliminación de células tumorales proliferativas, localizadas o circulantes. Las defensas no específicas del sistema como macrófagos y células asesinas naturales (NK, del inglés Natural Killer) son efectivas contra las células cancerígenas (Yoona y col., 2008). Esta otra forma de terapia, busca también corregir el deterioro inmunológico provocado por los tratamientos antineoplásicos convencionales. En la práctica la eficacia de la inmunoterapia se comprueba por la reducción de los síntomas de la enfermedad y/o por la disminución de la necesidad de medicamentos (Bousquet, 1998).

Actualmente las **setas comestibles** suponen una importante contribución a este tipo de terapia. Muchas especies de hongos constituyen mini fábricas farmacéuticas productoras de cientos de componentes novedosos con extraordinarias propiedades biológicas (Patel y Goyal, 2012). De modo que el uso de las setas como agentes **inmunoterapéuticos** podría resolver, en gran medida, problemas relacionados con las inmunodeficiencias secundarias (Morris y col., 2013).

El hallazgo de compuestos farmacológicamente activos con potencial antitumoral, ha ayudado también, a estimular el desarrollo de investigaciones sobre la terapéutica del cáncer basadas en las **setas**. De modo que, muchos proyectos de investigación en curso están dirigidos a promover los hongos como una nueva generación de **bioterapéuticos** (Patel y Goyal, 2012).

1.3.4 Compuestos Inmunomoduladores en los Hongos Comestibles-Medicinales.

El uso histórico y tradicional de los hongos medicinales es casi ilimitado, en China se han usado durante generaciones como tónico para el sistema inmune (Lorenzana, 2009). Hoy día resulta significativa la particular capacidad de los **compuestos derivados de las setas**, para modular la respuesta inmune humana (Wasser y Weis, 1999). La presencia en ellas de sustancias capaces de modificar la respuesta biológica, estimula al sistema inmunitario y posibilita al organismo adaptarse al estrés biológico y ambiental (Costa y col., 2006).

Los compuestos bioactivos de las setas pueden encontrarse en los cuerpos fructíferos, micelio y esporas (Olufemi y col., 2012) y han sido clasificados como potenciadores de la defensa del huésped (HDPs, del inglés Human Defense Potentiators), debido a que ejercen efectos estimuladores sobre el sistema inmune (Petrova y col., 2005).

Estas sustancias bioactivas son principalmente, **polisacáridos**, lipopolisacáridos, proteínas, glicoproteínas, terpenoides, ácidos grasos, etc., considerados agentes inmunomoduladores, debido a que afectan la proliferación y diferenciación de las células del sistema inmune y la producción de citoquinas, que estimulan la inducción de diferentes tipos de células efectoras antitumorales. En adición, estos compuestos poseen actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica y antiprotzoaria (Olufemi y col., 2012).

Aunque estos componentes son los más estudiados, los esteroides, esteroides, enzimas, y derivados de lípidos, exhiben propiedades medicinales, entre las que se encuentran los efectos inmunomoduladores (Garza y col., 2006). Otros compuestos de interés son los **metabolitos secundarios** de bajo peso molecular (lactonas, **alcaloides**, antibióticos y **agentes quelantes**), sumamente importantes para la función inmune y como anticancerígenos (Petrova y col., 2005).

Los polisacáridos son las sustancias derivadas de las setas más conocidas y más potentes con relación a las propiedades antitumorales e inmunomoduladoras (Patel y Goyal, 2012). La mayoría ejerce su acción antitumoral mediante la activación de la respuesta del propio sistema. Básicamente, no ocasionan daño en el organismo; le ayudan a adaptarse a situaciones de estrés causadas por factores ambientales o por agentes biológicos y ejercen una acción inespecífica sobre el sistema inmune, desempeñando también funciones regulatorias (Candela y col., 2003).

Los mecanismos a través de los cuales los polisacáridos de setas ejercen efectos antitumorales, incluyen (Zhang y col., 2007):

1. Prevención de la oncogénesis por administración oral de polisacáridos (actividad preventiva).
2. Estimulación de la inmunidad contra la presencia de tumores (actividad inmunoestimulante).
3. Inducción de la apoptosis de las células tumorales (actividad de inhibición tumoral directa).

Las evidencias científicas demuestran que los **β -D-glucanos** son responsables de los efectos **inmunomoduladores** en las **setas** (Costa y col., 2006), muchos de ellos han resultado exitosos en la práctica clínica (Reshetnikov y col., 2001). Estos polisacáridos muestran estructuras moleculares, cuya variabilidad les da mayor capacidad para transmitir la información biológica, (Kawaguchi, 2005). Este potencial, asegura la flexibilidad necesaria para los mecanismos reguladores de las interacciones celulares en los organismos superiores (Wasser y col., 2005).

1.3.4.1 Polisacáridos β -D-glucanos de Setas. Estructura y Actividad Biológica.

De los productos derivados de las setas comestibles que se conocen, los más importantes desde el punto de vista médico han sido los polisacáridos (Ganeshpurkar y col., 2010). Los polisacáridos, β -D-glucanos son los metabolitos más versátiles debido a su amplio espectro de actividad (Patel y Goyal, 2012). Estos se presentan de forma general como glucanos lineales o ramificados con diferentes enlaces β -(1,3), (1-6) y α -(1,3), pero algunos en realidad son heteroglicanos. Los glicanos en general son polisacáridos que contienen otras unidades además de la glucosa en su estructura y se clasifican según el azúcar presente en su composición (Wasser y col., 2005).

Los β -D-glucanos son compuestos de alto peso molecular formados por una cadena principal de polímeros de glucosa, que difieren unos de otros en la longitud de sus cadenas y en el grado de ramificación de las mismas (Chen y Seviour, 2007). En los heteroglucanos las cadenas laterales contienen otras unidades (ácido glucurónico, xilosa, galactosa, manosa, arabinosa y ribosa), como componente principal o en diferentes combinaciones (Wasser y col., 2005).

Estos polisacáridos forman parte de la pared celular de los basidiomicetos y existen en los extractos en forma soluble o particulados. Su conformación puede ser de triple hélice, simple hélice o de enrollamiento al azar, y su actividad biológica depende de su estructura, grado de ramificación, conformación, solubilidad, peso molecular, entre otros factores (Yadomae, 2000).

Las funciones de los β -glucanos en el sistema inmunológico pueden ser dependientes de su complejidad conformacional. Un mayor grado de complejidad se asocia, generalmente, con una mayor potencia inmunomoduladora y efectos anticancerígenos (Chi-Fung y col., 2009). Por ejemplo, la mayoría de los β -glucanos con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras, presentan un esqueleto de unidades de glucosa con enlaces β -(1,3) y ramificaciones β -(1,6)-glucopiranosidas (Ribeiro, 2008).

1.2.4.2 Mecanismos de Acción de los β -D-glucanos de Setas.

En el organismo existen receptores capaces de reconocer carbohidratos, lípidos, proteínas y otras biomoléculas que forman parte únicamente de elementos celulares de algunos microorganismos. Las señales mediadas por éstos, tienen importancia en la inmunidad innata (Wales y col., 2007). Estas estructuras macromoleculares son conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns) y los glucanos son considerados como tales por el sistema inmune innato (Akramiene y col., 2007) (anexo 4).

Muchos informes han documentado la capacidad de los β -glucanos para estimular componentes celulares y humorales del sistema inmune, mediante un mecanismo de activación que está condicionada a la unión con receptores específicos (Rowan y col., 2003; Akira y Takeda, 2004). Se conoce que los glucanos desencadenan sus efectos biológicos, uniéndose a varios tipos de receptores en las membranas de macrófagos, neutrófilos, células NK, células T, células dendríticas, fibroblastos, y células del endotelio vascular (Seo y col., 2003; Ren y col., 2008).

El Dectin-1 ha sido identificado como el principal de todos estos receptores (Taylor y col., 2002). El homólogo en el hombre es un receptor transmembranal tipo II, con un dominio extracelular de reconocimiento a carbohidratos; el mismo es similar estructural y funcionalmente al encontrado en ratones. El receptor de β -glucanos en humanos puede reconocer una gran variedad de 1,3 y/o 1,6- β -glucanos. Logra asociarse a linfocitos T (Wilment y col., 2001) y es altamente expresado en monocitos/macrófagos, en neutrófilos y en menor grado, en células dendríticas y en una subpoblación de células T (Taylor y col., 2002) (anexo 5).

Estudios *in vivo* realizados por Trnovec y Hrmová (1993), usando glucanos marcados, mostraron que dichas partículas son captadas predominantemente por los macrófagos del sistema monocito/macrófago y que su degradación es muy lenta. La afinidad con el receptor también parece estar relacionada con la estructura molecular, referida al grado de ramificación, a la longitud del polímero y a la estructura terciaria del β -D-glucano (Costa y col., 2006).

A pesar de no estar del todo dilucidados los mecanismos de acción, se conoce que el efecto inmunoestimulante de los β -D-glucanos se logra con la activación de ambos tipos de inmunidad. Kikkert y col. (2007) plantean que la coestimulación de receptores específicos (TLRs) y del Dectin-1, ocasiona un poderoso efecto inmunoestimulante. En consecuencia, se liberan citoquinas como IL, interferones (IFN), factores estimuladores de colonias (CSF, del inglés Colony Stimulating Factors) y quimiocinas, que actúan sobre varios tipos celulares, procurando un nexo entre la inmunidad innata y la específica (Bettelli y col., 2007; Kaiko y col., 2008) (anexos 6 y 7).

Mucho resta por estudiar acerca de las propiedades inmunomoduladoras de estos polisacáridos y su mecanismo de acción. Sin embargo, en un futuro cercano su inclusión en la terapia podría desplazar a los medicamentos convencionales, entrando en una nueva etapa de la medicina farmacoterapéutica del sistema inmune.

1.3.5 Productos Inmunocéuticos. Aplicaciones Terapéuticas.

El término inmunocéutico introducido para caracterizar mejor a aquellos **nutricéuticos** que pueden potenciar el sistema inmunitario, incluye entre otros los glucanos derivados de hongos superiores, la mayoría de setas comestibles (anexo 8) (Schaible y Kaufmann, 2007). Hasta la fecha, son más de 50 las especies de hongos superiores que han mostrado su potencial como inmunocéuticos (Bush y Watkin, 2007).

Los mejores inmunocéuticos favorecen la recuperación y movilización de los componentes inmunológicos, una vez que han sido dañados por la aplicación de determinadas terapias (Akramiene y col., 2007). Todas las poblaciones celulares y las moléculas involucradas en los diferentes mecanismos del sistema inmune, son blancos para la acción de los inmunocéuticos del tipo β -D-glucanos, derivados de setas comestibles (Miura, 2004). De esa forma, es en la inmunoterapia donde estos compuestos encuentran su mayor aplicación (Costa y col., 2006).

Dentro del grupo de polisacáridos HDPs, que han sido bien estudiados y ensayados (Ikekawa, 2001), todos han mostrado actividad antineoplásica e inmunomoduladora, y han sido asociados con quimioterapia o radioterapia en el tratamiento de algunos cánceres (Ishurd y col., 2004; Wasser, 2005 b). La utilización de terapias combinadas con carboximetilglucano (un 1,3- β -D-glucano) y ciclofosfamida en el tratamiento del cáncer, logró una inhibición del crecimiento de tumores intramusculares y la reducción de metástasis del pulmón (Falameeva y col., 2001).

El lentinano (de *L. edodes*) es uno de los polisacáridos β -glucano mejor estudiados (Zhang y col., 2004). Entre sus acciones está restablecer la actividad suprimida de las células T helper (Th) en tumores (Ooi y Liu, 1999). Incrementa la citotoxicidad de los macrófagos peritoneales contra las metástasis, activando las vías clásica o alternativa del sistema complemento (Wasser, 2005a). Su administración por vía endovenosa (i.v.) a pacientes con cáncer digestivo mostró una supresión de la condición dominante de Th2, sugiriendo que la relación (Th1/Th2) se recuperó después del tratamiento (Zaidman y col., 2005).

El esquizofilano (de *S. commune*), es un homopolisacárido no iónico soluble en agua, que consiste en una cadena lineal de grupos β -1,3 y β -1,6-glucopiranosil (Hobbs, 2005). Se ha empleado como inmunomodulador (Kumari y col., 2008) y en la terapia antitumoral, junto con el 5-Fluorouracilo, incrementando el tiempo de supervivencia de los pacientes (Wasser y col., 2005).

Los compuestos PSK y PSP (complejo polisacárido-proteína) purificados de *C.versicolor*, han mostrando ser efectivos asociados a la quimioterapia (Wasser, 2002; Smith y col., 2003). PSK incrementa el número de leucocitos, los niveles de INF- γ , IL-2, y la inducción de hipersensibilidad retardada; estimula la apoptosis de las células cancerígenas y disminuye los efectos adversos de la terapéutica convencional (Kanazawa y col., 2003). PSP actúa sobre las células T y las células presentadoras de antígenos (Bettelli y col., 2007), incrementa la producción de IL-1 e IL-6, y disminuye la producción de IL-8 en las células de leucemia promielocítica humana (Hsieh y col., 2002).

Los suplementos dietéticos derivados del cuerpo fructífero de *Grifola frondosa* tienen una gran demanda por sus propiedades antitumorales e inmunomoduladoras. La fracción-D es un complejo formado por un β -(1-3)-(1-6)-glucano y una proteína de alto peso molecular. Ha sido utilizada exitosamente en tumores de mama, hígado, pulmón, próstata, colon y útero; así como, en leucemias y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Wang y col., 2008).

La fracción MD extraída a partir de micelios y cuerpos fructíferos de *G. frondosa* y *G. umbellata*, o *G. gigantea*, también es un complejo glucano/proteína, pero ofrece mejores resultados en estudios antineoplásicos, inhibiendo el crecimiento tumoral, y estimulando la respuesta inmune dependiente de macrófagos y linfocitos T (Kodama y col., 2005).

En un estudio realizado por Tong y col. (2009) se aisló, a partir del cuerpo fructífero de *P. ostreatus*, un nuevo polisacárido soluble en agua denominado POPS-1. Su caracterización indicó que está compuesto por un esqueleto de residuos de glucosa con enlaces β -1,3 y ramificaciones β -1,3-glucosa, β -1,4-glactosa y β -1,4-manosa. El β -glucano obtenido, mostró una potente actividad antitumoral *in vitro* contra las células del tumor de HeLa.

Preparaciones tradicionales de hongos medicinales, apoyan la idea de que extractos acuosos obtenidos a altas temperaturas, preservan su actividad biológica (Hobbs, 2004). En estudios realizados por Morris y col. (2002; 2003), se evaluaron los efectos inmunomoduladores de un extracto acuoso del micelio de *Pleurotus* sp. en animales tratados con ciclofosfamida e irradiados. Los resultados evidenciaron un incremento en la actividad del sistema monocito macrófago, reflejado en el aumento del número de células del exudado peritoneal, la fagocitosis *in vivo* de macrófagos peritoneales y la actividad fagocítica de células de Kupffer y macrófagos esplénicos.

Otro estudio fue diseñado para evaluar los efectos de la administración oral de un extracto acuoso de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. en la recuperación de la respuesta inmune de ratones desnutridos. El tratamiento proporcionó beneficios en términos de la hematopoyesis (recuperación de la celularidad de la médula ósea y recuentos de leucocitos en sangre periférica), la activación de macrófagos y su capacidad fagocítica, la estimulación respuesta de anticuerpos y la recuperación de la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (Llauradó y col., 2005).

Los datos referidos al empleo de las setas comestibles muestran su contribución a la alimentación y a la salud en el mundo. Las numerosas posibilidades del metabolismo de los basidiomicetos demuestran lo favorable de profundizar en su cultivo y manejo, para identificar metabolitos valiosos al hombre. Muchos de sus componentes constituyen la base para la formulación de una variedad de productos naturales, útiles por sus aplicaciones medico-farmacéuticas y biotecnológicas. El desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación y el nivel de las investigaciones actuales han permitido un substancial incremento de su uso en la inmunoterapia. Sin embargo, es importante su evaluación en la prevención de enfermedades, para promover el consumo de suplementos que puedan ejercer un efecto profiláctico en el organismo.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

El trabajo experimental fue desarrollado en la Planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles, y los Laboratorios de Inmunología y Microbiología del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente; así como en el Bioterio del Centro de Toxicología y Biomedicina de Santiago de Cuba (TOXIMED) (Anexo 9).

2.1 Microorganismo Utilizado.

Se utilizó la cepa de *Pleurotus* sp. (**CCEBI-3024**), depositada en la Colección de Cultivos del CEBI. Para su propagación se realizó la siembra de una porción de micelio en placas Petri, conteniendo medio Agar Extracto Malta (BIOCEN, Cuba). Las placas fueron incubadas a 37°C en incubadora AISET®, YLD-6000 (China) hasta lograr el crecimiento micelial en toda la superficie del medio de cultivo (Anexo 10).

2.2 Obtención de la Materia Prima del Suplemento Nutricional (Biomasa Seca y Pulverizada de *Pleurotus* sp).

Los cuerpos fructíferos fueron obtenidos por FES, utilizando como sustrato pulpa de café, previamente seleccionada y pasteurizada. El ciclo productivo se desarrolló bajo condiciones de cultivo adecuadas (sanitarias), referidas por Bermúdez y col. (2001) (anexo 11).

Una vez realizada la cosecha, los cuerpos fructíferos fueron fragmentados en pequeños trozos (1 cm²) y secados en estufa VENTICELL, MMM (Alemania), durante 24 h a 45°C hasta su total deshidratación. A continuación se realizó el molinado de los mismos en un molino KRUPS, KM 75 (German Trademark, Alemania). El polvo resultante fue conservado en bolsas de nylon selladas, protegido de la luz y la humedad (Anexo 12).

2.3 Obtención de Extractos a partir del Suplemento Nutricional.

El extracto acuoso, obtenido a partir de la biomasa seca y pulverizada de *Pleurotus* sp., para ser empleado en el tamizaje fitoquímico y en la cuantificación de fenoles totales, fue elaborado según el procedimiento descrito por Morris y col., 2011.

Por su parte, el extracto etanólico, para estos mismos fines, fue obtenido según el procedimiento descrito en la “Guía Metodológica para la Investigación de las Plantas Medicinales” del MINSAP (1997).

2.4 Caracterización Bioquímica del Suplemento.

2.4.1 Determinación de los Componentes Macromoleculares Mayoritarios Presentes en el Suplemento.

La concentración de proteínas fue estimada por el método de Lowry y col. (1951). Se utilizó como sustancia patrón, seroalbúmina bovina (BSA) Biochemical (BDH, Inglaterra); se midió la A (650 nm) en un espectrofotómetro Espectroquant®, Pharo 300 (MERCK, Alemania) y el contenido de proteína fue referido a una curva de calibración realizada con una solución de seroalbúmina bovina (BSA), (BDH, Inglaterra) de concentración igual a 0.29 mg/mL.

Los carbohidratos totales se determinaron por el método del fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). Se midió la absorbancia (A 490 nm) en un espectrofotómetro Espectroquant® Pharo 300 (MERCK, Alemania) y la concentración fue referida a una curva de calibración preparada con una solución de glucosa (UNI-Chem®, Inglaterra), de concentración igual a 100 µg/mL.

2.4.2 Cuantificación de β -1,3-1,6-glucanos.

Se realizó la cuantificación de polisacáridos del tipo β -1,3-1,6-glucanos por el método de Nitschke y col. (2011), basado en la reacción colorimétrica con el rojo-congo, según una modificación del método de Sietsma y Wessels (1977). La concentración fue referida a una curva de calibración preparada con una solución patrón del Esquizofilano (β -1,3-1,6-glucano), Selco Wirkstoffe Vertriebs GmbH (Wald-Michelbach, Alemania) con una concentración de 150 μ g/mL. Se midió la A (523 nm) en un espectrofotómetro Espectroquant® Pharo 300 (MERCK, Alemania).

2.4.3 Determinación de Minerales.

La determinación de elementos minerales fue realizada por los especialistas del Laboratorio Químico de la Empresa Productora de Níquel y Cobalto “Comandante Ernesto Che Guevara” de Moa en la provincia Holguín.

El análisis de los elementos minerales al suplemento, fue practicado por Espectrometría de Plasma de Acoplamiento Inductivo (PAI), según "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales" (1992).

2.4.4 Tamizaje Fitoquímico.

Para el tamizaje fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico del suplemento, se utilizaron los ensayos descritos en la “Guía Metodológica para la Investigación de las Plantas Medicinales” del MINSAP (1997). Se emplearon tres réplicas para cada ensayo.

2.4.5 Cuantificación de Fenoles.

La determinación del contenido de polifenoles, en los extractos anteriormente mencionados, se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Slinkar y Singleton (1977). La concentración fue referida a una curva de calibración preparada con ácido tánico (1mg/mL).

2.5 Formulación.

La formulación del suplemento nutricional (tabletas) fue desarrollada por los especialistas del grupo de Innovación del Laboratorio Farmacéutico Oriente (Quimefa, Santiago de Cuba) en base a 500 mg de biomasa seca y pulverizada de *Pleurotus* sp. (Anexo 13).

Se comprobó la dureza de la formulación con un Durómetro Manual (Monsento, USA) según Liebertman y Lachman (1981) y se evaluó el tiempo de desintegración en base a un período inferior a los 30 mn, según lo establecido por la United States Pharmacopeia (2007), para los productos naturales.

2.6 Evaluación de los Efectos Inmunomoduladores del Suplemento Nutricional en Ratones Balb/c Inmunocompetentes.

2.6.1 Animales y Esquemas Experimentales.

En los diferentes experimentos se utilizaron ratones Balb/c de ambos sexos, de 8 semanas de edad, con un peso corporal de 18-25 g, libres de patógenos, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales–Centro de Inmunología Molecular (LABEX-CIM, Santiago de Cuba).

En el cuidado de los animales se cumplieron las normativas internacionales establecidas por la Comunidad Económica Europea. Se emplearon condiciones sanitarias convencionales y la temperatura (T) y la humedad relativa (H) se mantuvieron en el intervalo óptimo para la especie.

Temperatura controlada según los requerimientos fisiológicos, experimentales y del local T (18-26 °C y H (50-70 %) (National Research Council, 2002).

Los ratones recibieron agua acidulada (pH 2.5-2.8) y se alimentaron con el pienso correspondiente a esta especie (Ratonina comercial), el cual fue suministrado por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana), con su certificado de calidad. El agua y el alimento se suministraron de forma controlada, pero en cantidades suficientes para permitir su ingestión *ad libitum*, durante todo el período de experimentación.

Para la realización de los ensayos, se emplearon 20 ratones distribuidos de forma aleatorizada en cuatro grupos experimentales (dos correspondientes a cada sexo) con un total de cinco ratones cada uno (n = 5). El protocolo experimental se desarrolló durante 14 días y la observación clínica de los animales se realizó dos veces al día.

A los grupos designados como SNP-Hembras y SNP-Machos, se les administró por vía oral durante los 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional preparada en solución salina fisiológica (SSF, 0.9 %) (Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba), al momento de ser utilizada. El volumen de la suspensión equivale aproximadamente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso.

La administración se realizó diariamente en las mañanas, a la misma hora y de forma pausada para tratar de disminuir el estrés, ocasionado normalmente con la sujeción a los animales, y para evitar el derrame de la suspensión.

Los grupos controles (C-Hembras y C-Machos) se alimentaron con dieta convencional para la especie durante toda la investigación. No se utilizaron controles administrados con SSF (0.9 %), debido a que en trabajos previos de nuestro grupo se reúnen evidencias suficientes que demuestran la no influencia de la sustancia per se y la vía de administración en la función inmunitaria (Morris, 2007; Llauro, 2008).

Al decimoquinto día se colectaron muestras de sangre por el plexo retroorbital de cada animal para realizar los estudios hematológicos y bioquímicos. Se emplearon tubos Eppendorf® (Alemania) para coleccionar la sangre y capilares heparinizados (TECNON®, Argentina) para realizar las extracciones. Posteriormente, se procedió al sacrificio de los animales por dislocación de la cervical.

2.6.2 Consumo de agua y alimentos.

El consumo de agua y alimentos se registró diariamente antes de aplicar los tratamientos. Cada día se colocó un frasco de 200 mL de agua acidulada y se determinó la diferencia entre la cantidad suministrada y el remanente luego de 24 h. Con estos datos se calculó el consumo promedio de agua por animal.

De forma similar se evaluó el consumo de alimentos (cantidad inicial: 50 g), pesado en balanza electrónica OHAUS®, Scout Pro SPU 123 (China).

2.6.3 Peso Corporal.

Los animales se pesaron de forma diaria, antes de ser suplementados, en balanza electrónica OHAUS®, Scout Pro SPU 123 (China), para monitorear las posibles fluctuaciones de este parámetro, respecto a los tratamientos aplicados y a la manipulación en general.

2.6.4 Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.

Se colectaron las muestras de sangre, para estas determinaciones, en tubos Eppendorf® (Alemania) que contenían una gota de anticoagulante Heparina Sódica (LIORAD, La Habana, Cuba). El contenido de hemoglobina se determinó mediante el método de la cianometahemoglobina (ICSH, 1996) con el empleo del reactivo Hemotest HELFA® Diagnósticos (E.P.B Carlos J. Finlay, La Habana).

Para el conteo total de leucocitos se tomaron 20 µL de sangre, añadidos a tubos Eppendorf® (Alemania) que contenían 0.4 mL de ácido acético (2 %) (E.P.B Carlos J. Finlay, La Habana). Se homogeneizó y se procedió al conteo en Cámara de Neubauer (Assistant, Alemania) en microscopio óptico NOVEL, N-400M Trivoc (China).

El conteo diferencial se practicó mediante el frotis de una gota de sangre fresca, sin adición de anticoagulante, sobre láminas SAIL BRAND (China). Se utilizó metanol como agente deshidratante, durante 5 min. Luego se procedió a la coloración con solución Giemsa Quimefa, (E.P.B Carlos J. Finlay, La Habana).

El conteo se realizó en base a 100 células, diferenciando las mismas según sus características morfológicas con el empleo del microscopio óptico NOVEL, N-400M Trivoc (China).

2.6.5 Análisis Bioquímicos en Suero.

Las muestras de sangre colectadas en tubos Eppendorf® (Alemania), sin adición de anticoagulante, fueron conservadas en refrigeración (4°C) hasta su coagulación. Posteriormente se realizó la retracción del coagulo, separándolo de las paredes de los tubos y se extrajo el suero con pipetas RONGTAI® (Biochemical, China). El suero fue centrifugado en centrífuga Spectrafugue, 24D (Labnet, USA) para eliminar restos de sangre.

Se determinó la concentración de proteínas séricas totales por el método de Biuret (Mc Murray, 1988). Se estimó la concentración de albúmina en suero mediante el juego diagnóstico Albumin-ELITech (Francia), basado en la reacción con el verde de bromocresol. Los niveles de globulinas fueron determinados a partir de la diferencia de la concentración de albúmina con las proteínas totales. Se calculó además, la relación albúmina/globulinas (A/G).

2.6.6 Celularidad en el Exudado Peritoneal.

Luego del sacrificio, se inoculó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) 5 mL de solución de Hanks. Luego de 5 min con aplicaciones de un masaje suave en el abdomen, se realizó una incisión y se colectaron las células de la cavidad peritoneal con pipetas Pasteur.

Luego de centrifugar la suspensión a 5 000 rpm en centrífuga Heal Force®, Neofugue 15 (China), las células fueron resuspendidas en 1 mL de solución de Hanks y se estimó la celularidad en Cámara de Neubauer (Assistant, Alemania) al microscopio óptico NOVEL, N-400M Trivoc (China).

2.6.7 Anatomopatología Macroscópica y Peso Relativo de los Organos.

Una vez sacrificados los animales, se realizó la disección y se extrajeron los órganos. El análisis macroscópico, implicó la observación de las características morfológicas de los órganos tales como: tamaño, volumen, coloración y textura.

Los órganos analizados fueron hígado, bazo, timo, corazón, riñones, pulmones. Estos fueron pesados en balanza analítica electrónica Sartorius®, BS 124S (Alemania) y se determinó luego el peso relativo en función del peso corporal de los animales.

2.6.8 Celularidad Esplénica.

La suspensión de células esplénicas se preparó homogeneizando suavemente el bazo con solución de Hanks helada. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada en una centrífuga Heal Force[®], Neofuge 15 (China) y las células del sobrenadante fueron contadas en Cámara de Neubauer (Assistent, Alemania) en un microscopio óptico NOVEL, N-400M Trivoc (China).

2.6.9 Ensayos de Estimulación de la Inmunidad Celular: Inducción de Respuesta de Hipersensibilidad Retardada (HR).

La respuesta inmune celular se evaluó mediante el ensayo de hipersensibilidad retardada (HR) según Kim y col. (1998). Los grupos experimentales se conformaron según se describió en el acápite 2.6.1.

El día 15 los ratones fueron sensibilizados por inoculación intradérmica (i.d.), con 50 µL de una solución de BSA (BDH, Inglaterra) de concentración 5 mg/mL en Adyuvante Completo de Freund (ACF) Sigma[®] (Sigma Chemical, USA) en dos sitios del abdomen. A los ocho días los animales se retaron por vía i.d. en el cojinete de la pata trasera izquierda con 20 µL de la solución de BSA (5 mg/mL). En el cojinete de la pata derecha se inoculó un volumen similar de SSF (0.9 %) (Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba).

La medición de la induración se realizó con un micrómetro K1972r (URSS) a las 24, 48 y 72 h del reto. La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSF (0.9 %).

2.7 Evaluación de las Propiedades Inmunomoduladoras del Suplemento Nutricional en Ratones Balb/c Inmunodeprimidos con Ciclofosfamida.

2.7.1 Animales y Tratamientos Experimentales.

Se utilizaron ratones Balb/c, machos de 8 semanas, con un peso corporal entre 18 y 25 g, libres de patógenos, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales–Centro de Inmunología Molecular (LABEX-CIM, Santiago de Cuba). En el cuidado de los animales se emplearon las mismas condiciones sanitarias, descritas en el diseño experimental con animales inmunocompetentes.

Se emplearon 25 ratones que fueron distribuidos de forma aleatorizada en cinco grupos experimentales con 5 animales cada uno (n = 5). El protocolo experimental se desarrolló durante 8 días y la observación clínica de los animales se realizó dos veces al día.

La inmunosupresión fue inducida mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de ciclofosfamida (CY) para inyección Genoxal[®] (Prasfarma S.A., España) a una dosis de 100 mg/kg. El suplemento nutricional (1 000 mg/kg) se suministró en los grupos seleccionados por vía oral en un volumen de suspensión aproximado de 0.2 mL.

El día 0 se administró el fármaco inmunosupresor en los grupos de tratamiento terapéutico CY-Pleurotus y CY-Salina, mientras que en los grupos Pleurotus-CY y Salina-CY se les inoculó al 5^{to} día de la experimentación (Tabla 1).

A los grupos administrados con **Pleurotus** (CY-Pleurotus y Pleurotus-CY) se les proporcionó el suplemento durante ocho días. Los animales de los grupos CY-Salina y Salina-CY fueron administrados con SSF (0.9 %) (Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba) en sustitución del preparado de **Pleurotus**.

Tabla 1. Diseño Experimental de los ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida.

Grupos	Administración Ciclofosfamida (100 mg/Kg)	Administración Tratamiento (0.2 mL)	
CY + Pleurotus	Día 0	Pleurotus Terapéutico (1 000 mg/Kg)	(0 – 7 días)
CY + Salina	Día 0	Salina	(0 - 7 días)
Pleurotus + CY	Día 5	Pleurotus Profiláctico (1 000 mg/Kg)	(0 - 7 días)
Salina + CY	Día 5	Salina	(0 - 7 días)
Control	---	---	

Un grupo control fue alimentado con dieta convencional (Ratonina) durante toda la experimentación.

Al octavo día se colectaron muestras de sangre por el plexo retroorbital de cada animal para los estudios hematológicos y bioquímicos. Posteriormente se procedió a su sacrificio para las evaluaciones inmunológicas.

2.7.2 Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.

Las determinaciones de hemoglobina y leucocitos totales se realizaron de la misma manera que en el esquema experimental de animales inmunocompetentes (acápite 2.6.4).

2.7.3 Análisis Bioquímico en Suero.

Las determinaciones de proteínas séricas totales, albúmina y globulinas; así como el cálculo de la relación albúmina/globulinas, se realizaron del mismo modo que en el esquema experimental de animales inmunocompetentes (acápite 2.6.5).

2.7.4 Celularidad de la Médula Osea.

Una vez sacrificados los animales, se les retiró el fémur de la pata trasera derecha y se extrajo la médula ósea. Se realizó una suspensión homogénea de la médula con 1.5 mL de solución de Hanks helada. Las células fueron contadas en Cámara de Neubauer (Assistent, Alemania), con ayuda de un microscopio óptico NOVEL, N-400M Trivoc (China).

2.7.5 Anatomopatología Macroscópica.

El análisis macroscópico de los órganos hígado, bazo, timo, corazón, riñones, pulmones, se realizó observando las características morfológicas, de la misma manera que en el experimento con animales inmunocompetentes (acápite 2.6.7).

2.7.6 Contenido de Proteínas Totales Hepáticas.

Una vez extraídos los hígados, se tomaron muestras de 0.1g de tejido que fueron maceradas suavemente con 2 mL de solución de Hanks helada. La suspensión se homogeneizó y luego fue centrifugada en una centrífuga Heal Force[®], Neofuge 15 (China). El sobrenadante fue decantado y utilizado para realizar las determinaciones.

Se estimó la concentración total de proteínas según el método de Lowry y col. (1951). Se utilizó como sustancia patrón, seroalbúmina bovina (BSA); se midió la A 650 nm en un espectrofotómetro Espectroquant[®], Pharo 300 (MERCK, Alemania) y el contenido de proteínas fue referido a una curva de calibración preparada con una solución de BSA (BDH, Inglaterra) de concentración 0.29 mg/mL.

2.7.7 Celularidad Esplénica.

La celularidad esplénica fue determinada del mismo modo que se describió en el esquema experimental con animales inmunocompetentes (acápite 2.6.8).

2.7.8 Ensayos de Estimulación de la Inmunidad Celular.

2.7.8.1 Inducción de Respuesta de Hipersensibilidad Retardada (HR).

La respuesta inmune celular se evaluó mediante el ensayo de hipersensibilidad retardada (HR) según Kim y col. (1998). Se conformaron dos grupos experimentales de tres animales cada uno (n = 3), tratados con ciclofosfamida al inicio del experimento. A continuación, uno de los grupos fue administrado diariamente durante ocho días con el suplemento de **Pleurotus**, y el otro recibió

SSF (0.9 %) (Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba), según se describió en el acápite 2.7.1.

El día 0 los ratones fueron sensibilizados por la inoculación intradérmica (i.d.) de 50 μ L de una solución de BSA (BDH, Inglaterra) (5 mg/mL) en Adyuvante Completo de Freund (ACF) Sigma® (Sigma Chemical, USA) en dos sitios del abdomen y a los ocho días se retaron según como se describe en el acápite 2.6.9.

La medición de la induración se realizó con un micrómetro K1972r (URSS) a las 24, 48 y 72 h del reto. La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSF (0.9 %).

2.7.8.2 Índice de Peso del Linfonodo Poplíteo.

En los animales del experimento de inducción de respuesta de hipersensibilidad retardada (HR), los linfonodos poplíteos (derecho e izquierdo) fueron localizados, extirpados y desgrasados con solución tampón fosfato (PBS) pH 7.2 - 7.4. Luego de lavados con SSF (0,9 %), se les eliminó el exceso de humedad con un papel de filtro e inmediatamente se pesaron por separado en una balanza analítica electrónica Sartorius®.

Se calculó el índice de peso (IP) según Descotes (2006), que se expresa como la relación del peso del linfonodo poplíteo tratado (izquierdo) con respecto al peso del linfonodo poplíteo control (derecho).

2.8 Análisis Estadísticos.

Los resultados experimentales de animales inmunocompetentes fueron expresados como la media $\pm$ la desviación estándar de los datos. Se evaluó el cumplimiento de las premisas para la utilización de métodos paramétricos: distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de varianzas (pruebas de Bartlett y Levene).

En estos casos, el procesamiento estadístico se realizó mediante un diseño de clasificación simple (ANOVA), y cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), se aplicó la prueba de Tukey para las comparaciones múltiples a posteriori de las medias de los tratamientos.

Cuando los datos no cumplían las premisas de una distribución normal o la homocidasticidad, se empleó el análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, de conjunto con la prueba de Student-Newman-Keuls (Sigarroat, 1985).

Los resultados del esquema experimental con animales inmunodeprimidos fueron procesados mediante el análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis y en los casos en que se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), se aplicó la prueba Student-Newman-Keuls no paramétrica para la comparación de las medianas.

Los datos correspondientes al experimento de evaluación de la inmunidad celular por inducción de la respuesta de hipersensibilidad retardada (índice de peso de linfonodos poplíteos) fueron analizados mediante la prueba de la *t* de Student.

En todos los casos se utilizó el software profesional Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphis Corporation, 1994-2001). Las tablas y figuras del capítulo 3 (Resultados y Discusión) incluyen la información de las pruebas realizadas.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Caracterización Bioquímica del Suplemento Nutricional de *Pleurotus*. Relación con sus Propiedades Medicinales Potenciales.

Las setas comestibles forman parte de la cultura culinaria en algunos países y se refieren numerosas aplicaciones en la medicina tradicional, fundamentalmente recogidas en las farmacopeas de la medicina tradicional asiática. De igual manera, los extractos y productos derivados de éstas han sido utilizados empíricamente en Asia, para tratar y prevenir muchas afecciones tumorales (Hirofumi y col., 2006; Janardhanan y George, 2006).

El empleo de los hongos comestibles-medicinales con fines terapéuticos ha despertado el interés por identificar aquellos componentes activos responsables de tales efectos. Una amplia gama de estos bioproductos ha sido caracterizada desde el punto de vista químico, y en ellos se ha referido la presencia de sustancias bioactivas que exhiben determinadas propiedades farmacológicas.

Entre la gran variedad de sustancias bioactivas aisladas, se destacan mayoritariamente, ciertos polisacáridos, proteínas y proteoglicanos de elevado peso molecular; y también metabolitos secundarios de bajo peso molecular como terpenoides, esteroides y fenoles (Wasser y col., 2005; Zaidman y col., 2005).

En el presente trabajo, se procedió a la **caracterización** de un suplemento nutricional obtenido a partir de cuerpos fructíferos de la seta comestible *Pleurotus* sp. (CCEBI-3024). El producto fue concebido por un equipo de investigadores del CEBI y desarrollado con la colaboración de especialistas del Laboratorio Farmacéutico Oriente.

En Cuba, hasta la fecha, no se conoce ningún producto natural elaborado a partir de setas comestibles, por lo que el conocimiento de la composición bioquímica de éste determinará sus aplicaciones nutricionales y médico-farmacéuticas potenciales.

La caracterización de la materia prima del suplemento, se realizó atendiendo a la identificación de macromoléculas mayoritarias (carbohidratos y proteínas), la cuantificación de estructuras polisacáridicas (β -1,3-1,6-glucanos), la determinación de minerales, la comprobación cualitativa de la existencia de componentes fitoquímicos bioactivos y la determinación del contenido de polifenoles.

3.1.1 Determinación de Componentes Macromoleculares Mayoritarios.

Diferentes tipos de compuestos, tales como proteínas, péptidos, glicoproteínas, lipopolisacáridos, y derivados de lípidos, han sido clasificados como moléculas que tienen potentes efectos sobre el sistema inmune (Tzianabos, 2000).

La composición de la preparación seca y pulverizada de cuerpos fructíferos, se caracterizó por la presencia mayoritaria de carbohidratos y proteína verdadera, con valores de 55 % y 20 %, respectivamente. Estos resultados se corresponden con los referidos en la literatura para diferentes especies y cepas de *Pleurotus* (García, 2008).

En investigaciones precedentes desarrolladas por nuestro grupo de trabajo, se caracterizaron diferentes bioproductos derivados de *Pleurotus* sp. Tal es el caso de los extractos acuosos obtenidos a partir de micelios producidos mediante cultivo sumergido y de cuerpos fructíferos producidos por FES. Los extractos fueron elaborados por ebullición a 95°C de temperatura y mostraron valores de carbohidratos totales 70.4 % y de proteínas 15 %, en los extractos de micelio obtenidos por cultivo sumergido. En los extractos de cuerpo fructífero obtenidos por FES, resultaron valores de 32.6 % y 28.6 %, respectivamente (Beltrán y col., 2005).

En otro de los trabajos se procedió a la caracterización bioquímica de extractos hidrosolubles crudos a partir de la extracción durante 10 h a temperaturas entre 95°C y 100°C del micelio, obtenido mediante cultivo sumergido (F-A) y de cuerpos fructíferos (F-B) de *Pleurotus* sp. producidos por FES. La composición bioquímica del extracto F-A mostró una composición de carbohidratos totales del 76.8 % y de proteínas (base seca) un 9.3 %. En el caso de F-B se evidenció un 29.6 % y un 23 % de carbohidratos y proteínas, respectivamente (Álvarez, 2009).

Otros investigadores informan valores para carbohidratos de 47.8 % y para proteínas de 20.7 %, en un extracto acuoso de *P. ostreato-roseus* (Barbosa y col., 2002). Por otra parte, Stamets (2000) refirió la composición química de un extracto de cuerpos fructíferos de *G. lucidum* que se destaca por la presencia de un 68.9 % de carbohidratos totales y un 8 % de proteínas. Un extracto liofilizado del micelio de *L. edodes* mostró una concentración de carbohidratos totales y proteínas de un 58-60 % y 20-23 % respectivamente (Hobbs, 2000).

Resulta válido aclarar que, de forma general, la diferencia cualitativa y cuantitativa en la composición bioquímica de los extractos podría depender de los distintos géneros y especies de setas, de las condiciones de cultivo, de los procesos de extracción utilizados en su obtención, entre otros factores (McKenna y col., 2002).

3.1.2 Cuantificación de polisacáridos del tipo β -1,3-1,6-glucanos.

Con las ventajas de la elucidación moderna de las estructuras de las biomoléculas, los β -glucanos se han identificado como uno de los elementos con actividad biológica más potentes en los hongos (Nitschke y col., 2011). Son modificadores de la respuesta biológica, activan principalmente el sistema inmune y pueden presentar efectos anticarcinogénicos (Novak y Vervicai, 2008).

Los β -glucanos de setas consisten principalmente en un esqueleto de glucosa con enlaces β -1,3 con la posibilidad de tener cada 2-3 moléculas de glucosa un enlace β -1,6 a otra cadena de glucosa β -1,3. La estructura terciaria varía con el número de enlaces (Nitschke y col., 2011).

Los β -glucanos con pocos o ningún enlace β -1,6, principalmente, tienen una estructura de hélice simple. Mientras los β -glucanos con mayor número de enlaces β -1,6-glucosídicos forman una triple hélice como estructura terciaria. La estructura de triple hélice y la masa molecular, afectan positivamente la actividad biológica de estos compuestos (Nitschke y col., 2011).

De varias especies de *Pleurotus* han sido aislados diferentes polisacáridos β -D-glucanos. Por ejemplo, del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*, se extrajo un β -D-glucano (con ramificaciones de β -1,3 y β -1,6) al que se nombró **Pleurano**. El mismo mostró un efecto antioxidante y provocó la disminución de las lesiones precancerosas inducidas en el colon de ratas Wistar machos. También se ha demostrado que posee actividad inmunomoduladora y antioxidante en ratas con colitis inducida (Nosálová y col., 2001).

Otros β -glucanos ramificados con una cadena principal de enlaces β -1,3 unidos a residuos β -GLcp en las cadenas laterales, aproximadamente en uno de cada tres residuos de la cadena principal, se obtuvieron de *P. ostreato-roseus* y *P. eryngii*. Un β -glucano similar con actividad antitumoral fue aislado de *P. ostreatus* y su acción puede deberse a los enlaces β -1,3 en la cadena principal, con sustituciones β -1,6 y a su solubilidad en agua (Santos-Neves y col., 2008).

Para fines de investigación, la información de la composición estructural de β -glucanos puede ser evaluada por una variedad de métodos (Chi-Fung y col., 2009). Algunos métodos actuales determinan la cantidad total de β -1,3-glucanos pero no distinguen sus importantes estructuras terciarias. Normalmente se basan en la hidrólisis enzimática o ácida y la cuantificación de los

azúcares reductores liberados. Sin embargo, el uso de enzimas es costoso y consume mucho tiempo y la hidrólisis ácida es muy inespecífica, por lo que es preferible un método más rápido y directo (Nitschke y col., 2011).

Otros métodos también empleados incluyen la Cromatografía Líquida, acoplada a la Espectrometría de Masas (LC/MS), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y con menos frecuencia Cristalografía de Rayos X o Microscopía de Fuerza Atómica. Sin embargo, debido a la complejidad y a la falta de naturaleza cuantitativa de la mayoría de estos métodos técnicos, no es posible aplicarlos de forma rutinaria como una herramienta de detección. Otras técnicas menos complejas permiten estudiar los contenidos de β -glucanos, entre los que se incluyen el ensayo del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos, la reacción con azul de anilina y ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida (ELISA) (Chi-Fung y col., 2009).

El método colorimétrico usado en nuestro trabajo para la cuantificación de polisacáridos β -glucanos, es basado en la reacción con el colorante Rojo Congo. Este es un método específico para β -glucanos de triple hélice. Se utilizó para la identificación de estructuras terciarias debido a sus interacciones con la triple hélice de los β -1,3-1,6-glucanos (Ching-Feng y col., 2007) y a que no reacciona con otros polisacáridos (Nitschke y col., 2011).

En nuestro trabajo, los resultados de la cuantificación de estructuras β -1,3-1,6-glucanos en la biomasa seca y pulverizada del cuerpo fructífero de la seta *Pleurotus* sp., arrojó la presencia en las mismas de un total de 1,54 g/100g de biomasa seca. Asimismo, las diferentes fracciones (KOH, HCl y NaOH) aportaron valores de los β -glucanos, en un intervalo de 0.4-1.0 g/100g (Tabla 2).

En estudios realizados por Nitschke y col. (2011) se determinó, con el empleo de este mismo método, los contenidos totales de β -1,3-1,6-glucanos en el micelio y los cuerpos fructíferos de diferentes especies de setas comestibles, entre las que se encontraban *A. bisporus*, *F. velutipes*, *G. frondosa*, *L. edodes* y *P. pulmonarius*. Los mayores valores se encontraron en los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* y *P. eryngii*, respecto al resto de las especies evaluadas.

En este trabajo, al igual que en el nuestro, la fracción HCl fue la que extrajo menor cantidad de estructuras de triple hélice mientras que la fracción NaOH fue la que mostró un mayor contenido. Los resultados además, indicaron que los cuerpos fructíferos no solo tienen más β -glucanos, sino también más cantidad de β -glucanos de triple hélice.

Por otro lado, Synytsya y col. (2008) mostraron que β -glucanos identificados en *P. ostreatus* y *L. edodes* consisten, principalmente, en cadenas altamente ramificadas de β -1,3-1,6-glucanos, con una estructura de triple hélice.

Con anterioridad en trabajos realizados por nuestro grupo, se había determinado por espectrofotometría, la presencia de una conformación ordenada (simple o triple hélice), correspondiente presumiblemente a la estructuras de β -D-glucanos, en un extracto hidrosoluble micelial (Alcántara, 2010).

La confirmación de la presencia de estas estructuras, en la preparación pulverizada de la seta comestible *Pleurotus* sp., también es un indicio de sus posibles propiedades inmunomoduladoras y antitumorales.

3.1.3 Determinación de Minerales.

Gran parte del interés en el valor alimenticio de los hongos está relacionado con la cantidad y calidad nutricional del contenido de proteínas y minerales. Como más del 1 % del peso fresco de

Tabla 2. Contenido de β -1,3-1,6-glucanos en la biomasa seca y pulverizada de *Pleurotus* sp., determinado con el método de Nitschke y col. (2011).

Contenido de β -1,3-1,6-glucanos (g/100g biomasa seca)			
Fracción KOH	Fracción HCl	Fracción NaOH	Total
0.44	0.2	0.9	1.54

las setas es cenizas, el contenido de minerales en ellas es generalmente más alto que en muchas frutas y hortalizas (Patrabansh y Madan, 1999).

El rendimiento y la composición química de los hongos varían, según las especies y pueden ser influenciados por los sustratos y las condiciones usadas para su crecimiento. De manera que estos parámetros pueden ser mejorados mediante la adición de elementos esenciales (da Silva y col., 2011).

En las setas comestibles se encuentran cantidades relativamente altas de minerales, en correspondencia con el contenido de minerales que también está presente en el sustrato (Cardona, 2001). En un estudio realizado por Caglarirmak y col. (2002), sobre la composición química y el valor nutricional de las setas comestibles *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarus* y *Lactarius piperatus*, los resultados mostraron la presencia de diferentes vitaminas (C, B1, B2, niacina y ácido fólico) y minerales como el Zn, Cu, K, Na, Fe, Ca, Cr y P.

La determinación de minerales realizada al suplemento de **Pleurotus**, mediante Espectrometría de Plasma de Acoplamiento Inductivo, arrojó la presencia de elementos como Fe, Cu, Zn, Mn, Mg y Co (Tabla 3). En estudios realizados por da Silva y col. (2011), con el empleo del mismo método, se comprobó la presencia de Fe, Cu, Zn, Mn, Mg y Se en *Pleurotus ostreatus* cultivado sobre cáscara de café enriquecida con Se.

Con anterioridad en nuestro centro, se habían realizado determinaciones de los componentes minerales, a los cuerpos fructíferos de la seta comestible *Pleurotus* sp., cultivadas sobre pulpa de café y bagazo de caña. Los resultados arrojaron la presencia de Ca, K, Na, P, Fe, Cu, Zn y Mg (García, 1999).

En una investigación similar, Sales-Campos y col. (2009) realizaron análisis, con el empleo de otros métodos, a diferentes sustratos de crecimiento formulados a base de aserrín y de bagazo de caña, y a los cuerpos fructíferos de la seta *Pleurotus ostreatus*. Los resultados evidenciaron que la composición mineral del hongo varió con el sustrato de cultivo, lo que hizo posible la producción de fructificaciones ricas en Fe, K, P y Mg. El potasio fue el mineral de mayor contenido en el hongo en todos los sustratos ensayados.

También Patrabansh y Madan (1999), refirieron contenidos de Fe, Mn, Mg y Zn, además de Ca, P, K y Na, en los cuerpos fructíferos de *Pleurotus sajor-cuju*, cultivado sobre tres sustratos diferentes en los que se encontraban presentes cada uno de estos elementos.

Se ha planteado que la función inmune es la diana para el desarrollo de alimentos funcionales y que la modulación inmune, a través de estrategias dietéticas, puede ser prometedora, para mantener la homeostasis en un organismo sano. En particular, vitaminas, como A, C, D y E, y minerales como el Zn y el Se son esenciales para estos propósitos (Wichers, 2009).

Específicamente el oligoelemento Zn es esencial para el sistema inmunológico y la tasa de proliferación y diferenciación de las células inmunes. Su deficiencia afecta a múltiples aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo una reducción en la actividad del timo, cambios en el balance de células Th1 hacia células Th 2 y alteraciones funcionales de las células inmunes (Haase y Rink, 2009).

La ingesta adecuada de vitaminas y minerales es esencial para el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades (Verkaik-Kloosterman y col., 2012) y en general, las setas comestibles contienen cantidades significativas de estos elementos, principalmente en los cuerpos fructíferos (Patrabansh y Madan, 1999).

Tabla 3. Contenido de Minerales en la biomasa seca y pulverizada de *Pleurotus* sp., determinado mediante Espectrometría de Plasma de Acoplamiento Inductivo.

Contenido de Minerales (g/100g biomasa seca)	
Minerales	Cantidad
Fe	0.05
Cu	0.001
Mg	0.343
Mn	0.002
Co	0.001
Zn	0.008

3.1.4 Tamizaje fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico derivados del suplemento.

Otras sustancias activas de interés terapéutico y que están siendo estudiadas actualmente, son compuestos de bajo peso molecular, derivados de algunos intermediarios del metabolismo primario (Zaidman y col., 2005). Estas sustancias que no están involucradas en los procesos metabólicos fundamentales del organismo, tales como la generación de energía y la formación de membranas celulares, entre otros, se conocen como metabolitos secundarios (Petrova y col., 2005).

Los triterpenos y sus derivados, flavonoides, esteroides y los derivados de lípidos, son algunos de los metabolitos secundarios que presentan propiedades medicinales, entre las que se destacan los efectos inmunomoduladores (Wasser y col., 2005; Wasser, 2005b; Garza y col., 2006).

Con el objetivo de identificar los principios químicos, con posibles efectos medicinales, se realizó un **tamizaje fitoquímico** a los extractos acuoso e hidroalcohólico del suplemento nutricional obtenido de *Pleurotus* sp. (Tabla 4).

El tamizaje fitoquímico es una técnica que se utiliza para detectar metabolitos secundarios presentes en especies vegetales desde el punto de vista cualitativo. Se basa en la realización de reacciones químicas con diferentes reactivos, donde la aparición o no de un color o precipitado coloreado es indicativo de la presencia de un determinado metabolito (Ochoa y col., 2006).

Los ensayos no brindan un criterio absoluto y confirmativo de la existencia de estos compuestos, pues se pueden producir interferencias producto de la presencia en el medio de otras sustancias (metabolitos secundarios o no), capaces de reaccionar en forma similar y provocar resultados falsos positivos. Sin embargo, este procedimiento sí brinda un criterio de la composición química del extracto de una droga vegetal (Ochoa y col., 2006).

Entre las sustancias químicas presentes en los extractos derivados del suplemento de ***Pleurotus***, se encontraron alcaloides, azúcares reductores y saponinas.

Los primeros se utilizan en la terapéutica como estimulantes cardíacos, tal es el caso de alcaloides encontrados en algunas setas comestibles (Meletis y Barker, 2005). Por su parte, algunos azúcares reductores forman parte de las unidades monoméricas presentes en los β -D-glucanos, compuestos que exhiben propiedades inmunomoduladoras y antitumorales, entre otras (Wasser y col., 2005). En el caso de las saponinas, éstas se comportan como laxantes cuando se administran por vía oral (Miranda y Cuellar, 2001).

De igual forma resultaron positivos a sus respectivos ensayos los terpenoides y flavonoides. En el caso de los triterpenos, sólo fueron identificados en el extracto hidroalcohólico por su alta solubilidad en solventes de menor polaridad que el agua. Dichos compuestos poseen una variada actividad biológica, entre las que se destacan sus efectos antitumorales e inmunomoduladores; así como hepatoprotectores y antioxidantes, entre otros (Miranda y Cuellar, 2001).

En este sentido, cerca de 140 terpenoides y sus derivados han sido identificados en *Ganoderma lucidum* (Wasser, 2005b). Entre estos se destacan el ácido ganodérico y lucidénico potentes inhibidores del crecimiento tumoral aislados del cuerpo fructífero (Wu y col., 2001). Por otra parte, un triterpeno lanostenoides obtenido de *G. applanatus*, inhibió la carcinogénesis inducida por el virus de Epstein Barr (Gao y col., 2003).

Por su parte, los flavonoides han demostrado capacidad de secuestro de las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) que se generan enzimáticamente o no en sistemas libres de células (Cimanga y col., 2001). La rutina, es un flavonoide polifenólico, con mayor actividad antioxidante que otros flavonoides, como naringina y galangina (Miyake y

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de los extractos acuoso e hidroalcohólico derivados de la biomasa seca de *Pleurotus* sp. según la “Guía Metodológica para la Investigación de las Plantas Medicinales”, 1997.

	Metabolitos	Ensayos	Extracto acuoso	Extracto hidroalcohólico
1	Alcaloides	Dragendorff	+++	+++
		Wagner	++	++
2	Triterpenos y esteroides	Solkowski	(-)	+
		Lieberman-Burchard	(-)	+++
3	Quinonas	Borntrager	¿	(-)
4	Cumarinas	Baljet	(-)	(-)
5	Saponinas	Espuma	+	+
6	Mucílagos	Mucílagos	(-)	(-)
7	Aceites esenciales	C/ papel blanco sin reactivo	(-)	(-)
8	Azúcares reductores	Fehling	+	+
		Benedict	+	+
9	Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+	+
10	Aminoácidos libres y aminas en general	Ninhidrina	+	+++
11	Carbohidratos	Molisch	+	+
12	Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	+	+
13	Principios amargos y astringentes	Sabor	(-)	(-)

Leyenda:

(-): ensayo negativo

(+): ensayo positivo

Shibamoto, 1997). La crisina es un flavonoide natural, que según se ha informado tiene efectos anticancerígenos (Fu y col., 2007). Altas concentraciones de flavonoides como la crisina y la rutina han sido encontrados en extractos de *P. ostreatus*, lo que posiblemente explica las propiedades antioxidantes de un extracto etanólico de la seta (Jayakumar y col., 2009).

Otras investigaciones permitieron la identificación de una isoflavona designada como Genistein, que se encuentra principalmente en legumbres, la soya etc.; y referida recientemente en el hongo comestible *F. velutipes* (Kang y col., 2003). Este compuesto inhibe el crecimiento del carcinoma ovárico humano SKOV-3 en una relación dosis dependiente (Li y Mi, 2003).

La presencia de aminoácidos libres en ambos extractos del suplemento de **Pleurotus** es un aspecto de gran importancia. Como es conocido los aminoácidos juegan un papel fundamental desde el punto de vista nutricional, de ahí el valor de su identificación. En este sentido, el suplemento nutricional de **Pleurotus** podría representar una fuente de aminoácidos esenciales involucrados en los procesos metabólicos del organismo.

En la actualidad se informan numerosos trabajos donde se resalta el uso de aminoácidos como la glutamina y la arginina, a modo de inmunonutrientes, en la estimulación de la respuesta inmunitaria de pacientes con estados de malnutrición, adquirida como resultado de sepsis severas, traumas e intervenciones quirúrgicas (Heys y col., 2004).

En los extractos derivados del suplemento nutricional, también se destacó la presencia de taninos y fenoles, compuestos en los que se han demostrado propiedades antimicrobianas y fundamentalmente antioxidantes. Estos también participan en la inhibición de enzimas pro-inflamatorias, modifican la actividad de las prostaglandinas e inhiben la agregación plaquetaria (Obukowicz y Hummert, 2002).

En un análisis fitoquímico realizado a dos extractos obtenidos de un preparado seco y pulverizado de *P. ostreatus*, con éter de petróleo y acetona, se identificaron compuestos entre los que se encontraron triterpenos, taninos, glicósidos esteroideos y carbohidratos (Iwalokun y col., 2007).

Se ha descrito la existencia de una correlación positiva entre la actividad antioxidante de extractos de hongos comestibles-medicinales con el contenido de compuestos fenólicos. En un estudio realizado por Li y col. (2007), se refirió una elevada correspondencia entre la actividad secuestradora de radicales libres, la inhibición de la producción de óxido nítrico por células inflamatorias y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, en extractos de *Tricholoma matsutake*. Por otra parte, Janardhanan y Jose (2000), planteron que los antioxidantes representan la principal defensa del organismo contra la toxicidad mediada por los radicales libres.

De modo general, los resultados en el tamizaje fitoquímico de los extractos (etanólico y acuoso) del suplemento obtenido a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus* sp.; coinciden con lo informado por Álvarez (2009), acerca de los metabolitos secundarios de mayor importancia farmacológica presentes en extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. (CCEBI-3024), obtenidos mediante decocción.

Hasta la fecha se han caracterizado desde el punto de vista químico un elevado número de productos provenientes de setas comestibles. Estos estudios incluyen particularmente extractos acuosos, etanólicos y algunos obtenidos en otros solventes, derivados tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos de las setas.

En la literatura consultada, sin embargo, se informan muy pocos trabajos acerca de la presencia de compuestos de bajo peso molecular, en especies de **Pleurotus**, que posean actividad biológica demostrada. Un ejemplo a tener en cuenta, es el estudio realizado por Yassin y col. (2003), donde se obtuvieron resultados satisfactorios en la inhibición de la proliferación y diferenciación de células leucémicas humanas K562, por sustancias de bajo peso molecular aisladas de extractos acuosos de *P. ostreatus*.

En los suplementos nutricionales se refiere fundamentalmente, la composición bioquímica atendiendo al contenido de las macromoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos). En tal sentido, nuestro trabajo recoge como aspecto novedoso, la identificación cualitativa de compuestos bioactivos de bajo peso molecular, presentes en el suplemento.

A pesar de que el tamizaje fitoquímico ofrece información cualitativa, permite identificar los tipos de sustancias mayoritarias presentes en los extractos, representando esta información un antecedente para la realización de estudios químicos más profundos. Se debe, por lo tanto, continuar profundizando en la caracterización química de estos compuestos con potenciales aplicaciones terapéuticas y como punto de partida, se consideró oportuno realizar la determinación del contenido de fenoles totales presente en el suplemento de **Pleurotus**.

3.1.5 Contenido fenólico en extractos del suplemento de *Pleurotus*.

Los polifenoles son eficaces antioxidantes, que se encuentran entre los fitoquímicos de alimentos de origen natural, con efectos positivos en la salud de las personas (Pérez, 2006). En la actualidad los compuestos fenólicos están siendo intensamente investigados por su alto beneficio para la salud humana.

Los hongos comestibles se han considerado como una fuente de compuestos antioxidantes como las vitaminas A, C y el β -caroteno. Pero las setas contienen además, numerosos compuestos fenólicos, considerados potentes secuestradores de radicales peroxilo (Murcia y col., 2002).

Extractos de *L. edodes* y *Volvariella volvacea*, han demostrado actividad antioxidante y capacidad de secuestro de radicales libres (Cheung y Cheung, 2005). Este efecto farmacológico se relaciona con compuestos fenólicos contenidos en las setas, similares a los presentes en la uva y el vino (Landrault y col., 2001). En este sentido, Mau y col. (2002) también refirieron una elevada capacidad antioxidante en *Ganoderma lucidum* y demostraron, que los fenoles constituían los componentes mayoritarios en esta acción farmacológica.

En un estudio realizado por Brujin y col. (2009) se informaron los mayores niveles de extracción de polifenoles y flavonoides a partir de cuerpos fructíferos de *Grifola gargal* en el siguiente orden de solventes: agua > etanol > acetona > acetato de etilo > n-hexano. La extracción acuosa de estos metabolitos reviste particular importancia para aplicaciones en el diseño de alimentos funcionales y suplementos dietéticos.

El agua y el etanol son solventes de diferente polaridad que disuelven muchos solutos polares e iónicos, como proteínas, carbohidratos solubles y sales minerales. Los niveles de extracción de polifenoles en los extractos del pulverizado de *Pleurotus* sp. en estos solventes, obtenidos en nuestro trabajo, son similares a los referidos por Brujin y col. (2009). Se observa el mismo orden para los solventes (agua > etanol) en los diferentes niveles de extracción, con valores de 138.4 mg/100 g y 86.37 mg/100 g respectivamente.

En un trabajo realizado por Mau y col., (2001, 2002), se determinó que el contenido fenólico total de *P. ostreatus*, resultó alto, en comparación con los valores informados en otros hongos, como el hongo oreja, *C. versicolor*, *G. tsugae* y *G. lucidum*.

En general, se considera que los hongos de pudrición blanca, a los que pertenecen las setas del género **Pleurotus**, poseen sustancias con propiedades antioxidantes, por lo que pueden constituir una fuente potencial de bio-antioxidantes, o de preparaciones complejas con propiedades antioxidantes (Wang y col., 2002). Sin embargo, los compuestos fenólicos se han estudiado no solo por sus propiedades antioxidantes, sino también porque en estrecha relación con esta capacidad, desempeñan un papel importante como compuestos antitumorales (Dubost y col., 2007).

Aunque los polisacáridos parecen ser el componente bioactivo más importante, con respecto a la inmunomodulación en las setas comestibles, la presencia de diferentes metabolitos secundarios en el suplemento del cuerpo fructífero de *Pleurotus* sp., pudiera contribuir a un efecto sinérgico reflejado en su actividad inmunoestimulante (Llauradó y col., 2012).

3.2 Formulación del Suplemento

La tableta diseñada por los especialistas del Laboratorio Farmacéutico Oriente, mostró una dureza de 6 kgf, parámetro que evidencia su comprensibilidad. El tiempo de desintegración resultó de 15 mn, valor comprendido en el intervalo referido para los productos naturales (inferior a 30 mn).

Para tabletas sin cubierta el tiempo de desintegración que proponen las farmacopeas (USP 2007; BP, 2010) es de 15 mn. El tiempo de desintegración es el parámetro de calidad más importante que se evalúa en tabletas de rápida liberación. La desintegración de un comprimido es el paso inicial del proceso de absorción del principio activo contenido en este, y solo cuando comienza, es que se inician el resto de los procesos que deben ocurrir, para que el fármaco alcance la circulación sistémica. Este parámetro puede afectarse por muchas causas, razón por la cual el tecnólogo debe observarlo cuidadosamente, para asegurar una óptima calidad de la formulación (British Pharmacopeia, 2010).

3.3 Evaluación de los Efectos Inmunomoduladores del Suplemento Nutricional de *Pleurotus* sp. en Ratones Balb/c Inmunocompetentes.

Durante los últimos diez años se han publicado numerosos informes de estudios preclínicos y ensayos clínicos relacionados con la actividad antitumoral e inmunomoduladora de los hongos comestibles-medicinales y sus derivados. El 77 % de todos los productos se ha obtenido de los cuerpos fructíferos, cultivados con fines comerciales o recolectados del medio silvestre, el 21 % procede del micelio y aproximadamente el 2 % de filtrados de medios de cultivo (Chang y Miles, 2004; Wasser, 2010).

Más de cien tipos de polisacáridos se han aislado a partir de setas comestibles, destacándose los β -D-glucanos por su diversa actividad biológica e inmunofarmacológica (Chang y Miles, 2004; Wasser, 2010). Algunos estudios han sugerido que su acción antitumoral, podría ser el resultado de sus acciones como modificadores de la respuesta biológica (BRMs) (Gregori y col., 2007).

La evaluación de parámetros de la respuesta inmune constituye un medio sensible y funcional de detección de la respuesta a una intervención determinada (Shankar, 2003). El análisis de la literatura consultada demuestra la importancia de tomar en consideración en las evaluaciones de actividad biológica la naturaleza de los productos estudiados, su método de obtención, la vía de administración, la dosis utilizada y el biomodelo, en la interpretación de los resultados de los efectos inmunomoduladores de los hongos comestibles-medicinales.

Con anterioridad, en nuestro grupo se realizó la evaluación de extractos acuosos derivados de *Pleurotus* sp., en ratones inmunocompetentes, empleando las vías de administración endovenosa a dosis única (Alcántara, 2010) e intraperitoneal a dosis repetidas (Álvarez, 2009). De modo que en esta investigación se evaluaron, por vía oral, los efectos fisiológicos del suplemento dietético propuesto, a través del comportamiento de algunos parámetros inmunológicos.

En el trabajo se valoraron las propiedades inmunomoduladoras, de la administración del suplemento nutricional formulado a partir de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. en ratones Balb/c inmunocompetentes, a través de parámetros relacionados con la celularidad de sangre periférica, esplénica y peritoneal, el comportamiento de las proteínas séricas y la respuesta inmune celular.

3.3.1 Efectos del Suplemento de *Pleurotus* en los Niveles de Proteínas Séricas.

Aunque no se reflejan resultados significativos en cuanto al efecto de la suplementación con *Pleurotus* en los niveles de proteínas séricas totales y albúmina (Tabla 5), se pudiera acudir a criterios más sensibles seleccionando proteínas de transporte de menor tiempo de vida media que la albúmina. En este sentido, pudieran seleccionarse la transferrina, la prealbúmina y la proteína de enlace al retinol.

En los estudios realizados por Llauradó (2008), se informó un incremento en la concentración de proteínas séricas totales en ratones Balb/c malnutridos y suplementados con el extracto F-I, sugiriendo un efecto estimulador de los componentes presentes en el extracto sobre la síntesis proteica hepática.

Por otra parte, se destaca el incremento en la concentración de la fracción globulínica en los grupos tratados con el suplemento nutricional, siendo significativo para las hembras ($p < 0.05$), mientras los machos solo mostraron valores ligeramente superiores a los controles.

La relación albúmina/globulina es muy utilizada por diferentes autores en la evaluación de las proteínas del suero. En nuestro estudio, los animales que recibieron el suplemento de *Pleurotus* sp., mostraron los valores inferiores en la relación A/G ($p < 0.05$), lo cual apoya la idea de una posible estimulación de la síntesis de globulinas séricas. En adición a la síntesis hepática de las fracciones α y β , es probable que también ocurra la síntesis de γ -globulinas por linfocitos B activados.

3.3.2 Efectos Sobre Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.

Hemoglobina

En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a los niveles de hemoglobina en sangre entre los diferentes grupos experimentales (Figura 1). La no existencia de diferencias podría estar asociada a la duración relativamente corta del período de tratamiento (catorce días) y al hecho de que las variaciones en este parámetro, reflejan en forma lenta los cambios ante intervenciones nutricionales (Morris y col., 2007). En este sentido, se haría necesario evaluar el comportamiento de este parámetro, en un esquema experimental con una mayor duración.

Leucocitos Totales

Los leucocitos o células blancas son las células que componen el sistema inmune y se encuentran divididas en dos categorías: los fagocitos, que incluyen los granulocitos (también llamados polimorfonucleares), monocitos y macrófagos; y por otra parte, los leucocitos no granulados, conocidos como linfocitos (Abbas y col., 2008).

Tabla 5. Niveles de proteínas séricas en ratones Balb/c inmunocompetentes, tratados o no con el suplemento nutricional de *Pleurotus* sp.

	SNP-Hembras	Control Hembras	SNP-Machos	Control Machos
Prot. Séricas Ttles. (g/dl)	7,32 ± 2,36	6,36 ± 1,25	5,72 ± 2,07	4,84 ± 0,97
Albúmina (g/dl)	3,67± 1,02	3,54 ± 0,45	3,99 ± 0,83	3,00 ± 0,95
*Globulinas (g/dl)	4,67 ± 1,27 a	2,06 ± 1,05 b	2,73 ± 1,29 ab	1,92 ± 0,84 b
Relación Albúmina/ Globulinas (A/G)	0,80 ± 0,46	2,12 ± 0,98	1,92 ± 0,92	2,35 ± 0,89

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente aproximadamente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso. Los grupos controles (Control-Hembras y Control-Machos) se alimentaron con dieta convencional para la especie durante la investigación.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo ± DE (n= 5).

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de clasificación simple, Tukey, $p < 0.05$).

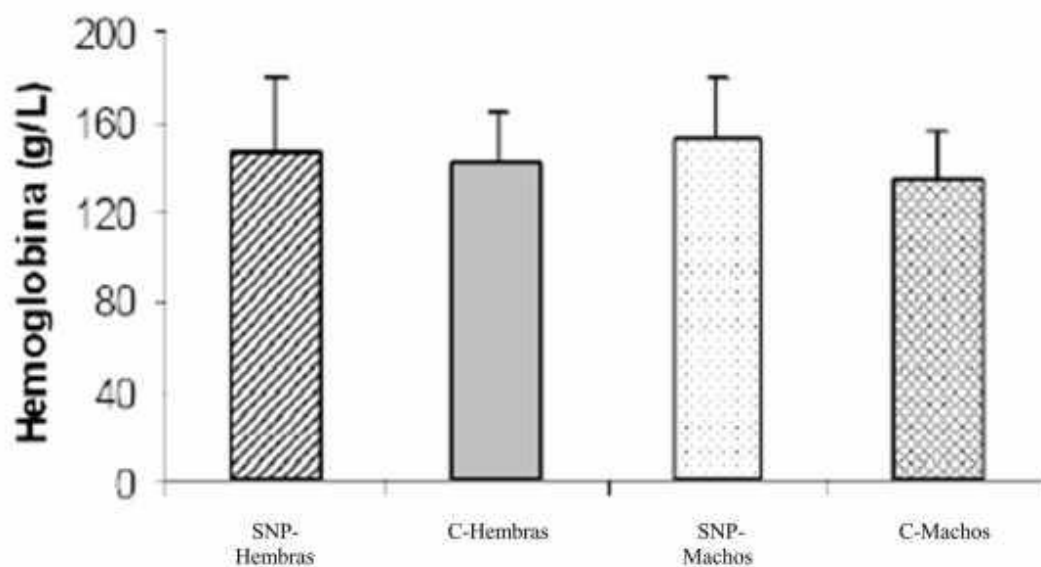


Figura 1. Niveles de hemoglobina en sangre de ratones Balb/c, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso, más la dieta convencional. Los grupos controles (C-Hembras y C-Machos) se alimentaron solo con dieta convencional para la especie.

Los resultados se presentan como la media en cada grupo $\pm$ DE (n= 5), ($p > 0.05$)

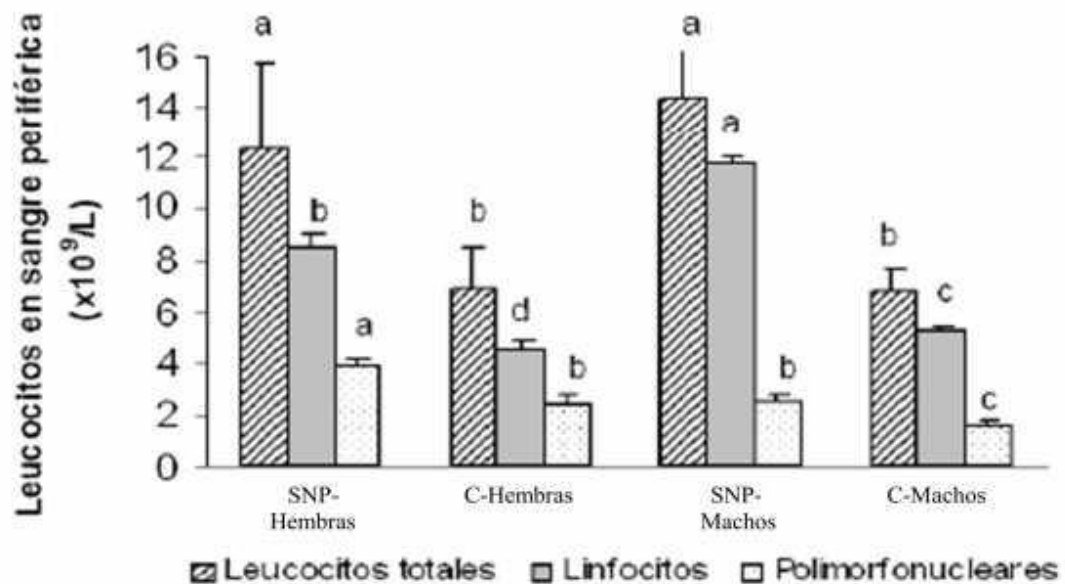


Figura 2. Conteo de leucocitos en sangre periférica en ratones Balb/c, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso, más la dieta convencional. Los grupos controles (C-Hembras y C-Machos) se alimentaron solo con dieta convencional para la especie.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo $\pm$ DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls). Los valores de $p < 0.05$, para los leucocitos totales, linfocitos y polimorfonucleares.

Como resultado de la administración oral del suplemento nutricional de **Pleurotus**, se evidenció un incremento estadísticamente significativo en el conteo total de leucocitos, de los grupos administrados con el suplemento, respecto a los controles ($p < 0.05$) (Figura 2). Aunque es válido señalar que los valores de este parámetro se encontraron dentro del intervalo referido como normal para la especie ($6-15 \times 10^9$ cel/L) (Iowa State University of Science and Technology, http://www.lar.iastate.edu/index.php?option=com_content&view=artic...).

Estos hallazgos podrían estar relacionados con la estimulación de la producción de precursores de estas células en la médula ósea y probablemente también, con un aumento en su tiempo de vida media, aspecto que debe ser dilucidado en futuros trabajos.

El conteo total de linfocitos y el estudio de sus subpoblaciones ha sido propuesto como un indicador funcional o dinámico del estado nutricional (Albers y col., 2005). Si relacionamos el aumento en el conteo linfocitario observado en los animales suplementados con el incremento en la magnitud de la reacción de hipersensibilidad retardada (HR) que se aprecia, en estos grupos (acápite 3.3.5), se puede suponer que la estimulación ocurre fundamentalmente a nivel de las poblaciones de linfocitos T, lo cual favorecería los mecanismos de la respuesta adaptativa contra antígenos T dependientes.

Si bien las poblaciones leucocitarias (linfocitos y polimorfonucleares) experimentaron incrementos en los animales que recibieron como complemento de la dieta la preparación de **Pleurotus**, se apreció en ellas un comportamiento diferencial entre los sexos. En este sentido, los conteos linfocitarios fueron superiores en los machos tratados con el suplemento nutricional ($p < 0.05$), y el de polimorfonucleares en las hembras tratadas con dicho producto ($p < 0.05$).

Aunque estas evidencias aparentemente resultan contradictorias, si tomamos en cuenta que la mayoría de las publicaciones en el tema refieren respuestas inmunológicas superiores en las hembras, todavía son necesarios diversos estudios para esclarecer los efectos de los esteroides sexuales en los parámetros inmunitarios. Ello es particularmente importante en el caso de los andrógenos, puesto que han recibido poca atención con respecto a los estrógenos y la progesterona (de León y Morales, 2006).

3.3.3 Influencia Sobre la Celularidad Esplénica.

El bazo es el más grande de los órganos linfoides y una de sus funciones más importantes es la producción de anticuerpos por estimulación antigénica de las células plasmáticas. Es además, un órgano hematopoyético importante que produce linfocitos y monocitos, estos últimos precursores de los macrófagos (Harada y col., 2002).

Con independencia del tratamiento, la celularidad esplénica resultó estadísticamente superior en las hembras con respecto a los machos ($p < 0.05$) (Figura 3). No obstante, el efecto del suplemento nutricional de *Pleurotus* sp. a este nivel podría estar relacionado no con un incremento en el número de células, sino con una activación funcional de éstas.

Es necesario por lo tanto, considerar en futuros trabajos la realización de ensayos de actividad funcional en esplenocitos y estudios histológicos. En este sentido, Pillet y col. (2006) aportaron evidencias acerca del control a nivel fisiológico del 17- β -estradiol en importantes funciones inmunitarias, entre ellas la fagocitosis por células esplénicas.

Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Álvarez (2009), quien refirió un incremento de la celularidad esplénica en ratones machos inmunocompetentes, administrados intraperitonealmente (i.p.) con un extracto de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., en el cual se

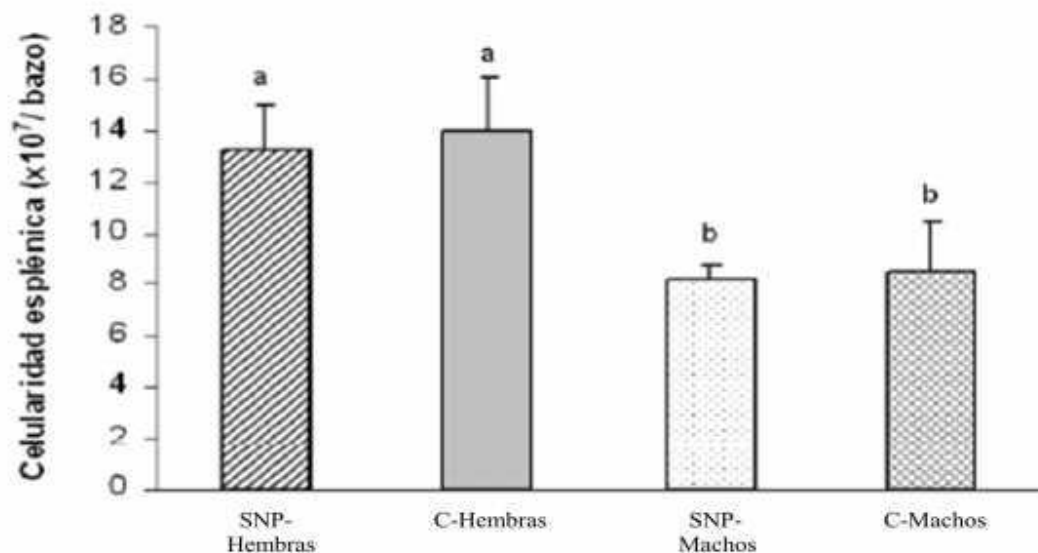


Figura 3. Número de células esplénicas en ratones Balb/c, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso, más la dieta convencional. Los grupos controles (C-Hembras y C-Machos) se alimentaron solo con dieta convencional para la especie.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo $\pm$ DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

alcanzaron valores superiores al grupo tratado con un extracto micelial y al control tratado con SSF.

3.3.4 Estimulación de Macrófagos Peritoneales.

Se conoce que los macrófagos desempeñan un papel central en la regulación de la inmunidad innata y específica (Abbas y col., 2008). Se ha referido además, que éstos juegan una importante función en los efectos inmunomoduladores y antitumorales de los BRMs como los glucanos (Morris y col., 2003; Gregori y col., 2007).

Tradicionalmente, los macrófagos y las células dendríticas se han considerado las células diana principales de los β -glucanos. Estas poseen receptores de superficie celular (TLRs) que detectan moléculas no propias, incluyendo los PAMPs (Kim y col., 2011).

Los resultados de nuestro trabajo, mostraron un incremento en el número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal de los animales suplementados con **Pleurotus**, en comparación con los grupos controles ($p < 0.05$) (Figura 4). Es probable que el aumento en la proporción de polimorfonucleares neutrófilos en sangre y de la población de macrófagos en la cavidad peritoneal, observado principalmente en las hembras que recibieron el complemento nutricional, esté relacionado con la síntesis de factores estimulantes de colonias (CSFs).

Los fagocitos como macrófagos y granulocitos, se derivan de los progenitores hematopoyéticos en la médula ósea, y la producción y movilización de estas células depende de la presencia de las citocinas llamadas colectivamente CSFs (Torello y col., 2010).

La activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos por fracciones polisacarídicas (F-I a F-V) del micelio de *Pleurotus* sp. fue informada por Morris y col. (2007), en función del mayor consumo de glucosa y el incremento en la producción de la enzima fosfatasa ácida lisosomal, con respecto al control.

Se ha demostrado que el 17- β -estradiol (E2) incrementa la expresión de marcadores moleculares asociados al crecimiento y proliferación celular en macrófagos y fibroblastos (Cutolo y col., 2004). Esta función en las respuestas inmune e inflamatoria está mediada por la vía de señalización del NF- κ B. En líneas celulares de macrófagos de ratón, el estradiol incrementa la producción del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y disminuye la síntesis de IL-10 en cultivos estimulados con lipopolisacárido (LPS) (de León y Morales, 2006).

Por otro lado, la unión de los β -glucanos a receptores específicos en los macrófagos puede inducir la producción de diversas citoquinas, activando indirectamente otras células inmunes tales como las células T y B (Kim y col., 2011).

3.3.5 Estimulación de la Respuesta Inmune Celular *in vivo*.

La prueba cutánea de hipersensibilidad retardada (HR) se utiliza para determinar si existe una exposición previa a los antígenos y depende totalmente de la presencia de células T. Por esta razón, ha sido ampliamente utilizada para evaluar la inmunidad celular *in vivo* (Schaible y Kaufmann, 2007).

Los ratones machos tratados con el complemento nutricional mostraron una respuesta de HR superior a la del grupo control que resultó significativa a las 48 horas ($p < 0.05$). Las hembras en cambio, mostraron valores comprendidos estadísticamente entre los machos tratados o no con el suplemento (Figura 5). Este resultado sugiere un efecto estimulador del suplemento de *Pleurotus* sp. sobre la respuesta inmune mediada por células T (CD4⁺ Th1), particularmente en machos.

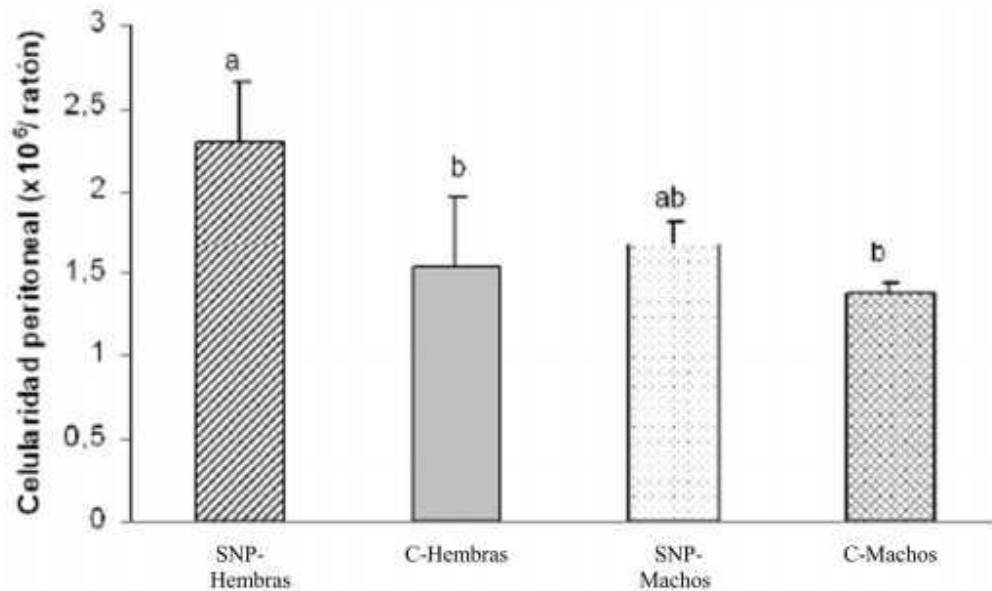


Figura 4. Número de células en el exudado peritoneal en ratones Balb/c, tratados ó no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso, más la dieta convencional. Los grupos controles (C-Hembras y C-Machos) se alimentaron solo con dieta convencional para la especie.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo $\pm$ DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

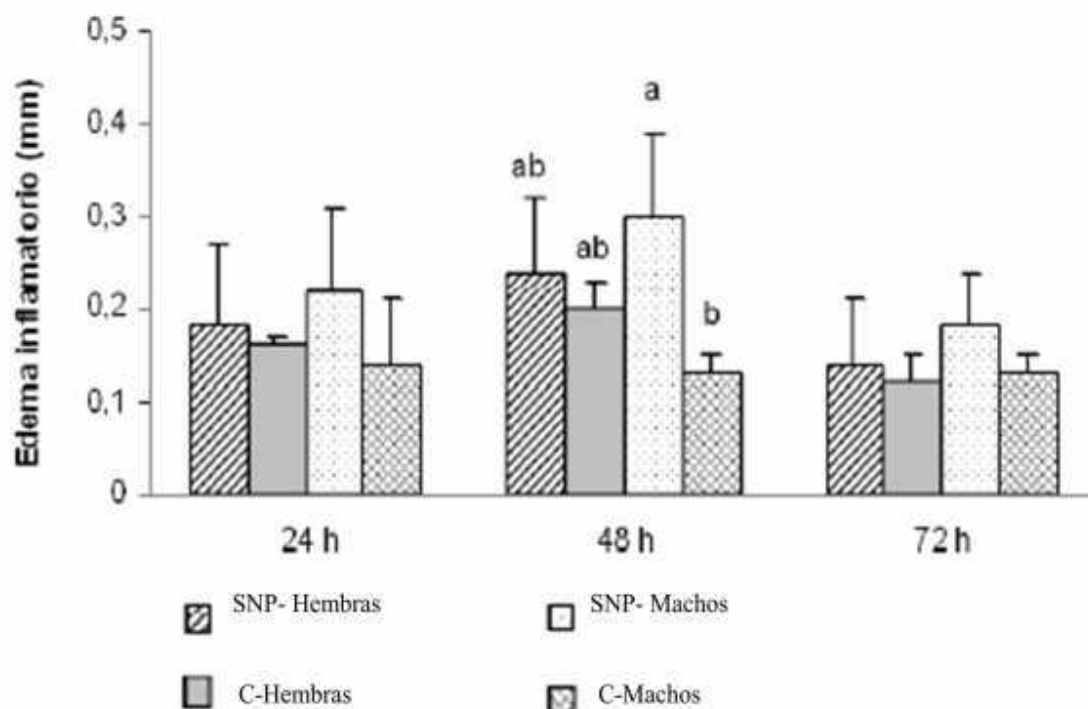


Figura 5. Respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) específica a la BSA en ratones Balb/c de ambos sexos tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso, más la dieta convencional. Los grupos controles (C-Hembras y C-Machos) se alimentaron solo con dieta convencional para la especie.

Al término de la administración, los ratones fueron sensibilizados por la inoculación i.d. de 50 μ L de una solución de BSA 5 mg/mL en Adyuvante Completo de Freund. A los ocho días, los animales se retaron vía i.d. en el cojinete de la pata trasera izquierda con 20 μ L de la solución de BSA 5 mg/mL. En el cojinete de la pata derecha se inoculó un volumen similar de solución salina tamponada con fosfato (SSTF). La medición de la induración producida se realizó a las 24, 48 y 72 h. La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema inflamatorio en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSTF.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo $\pm$ DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

Se ha planteado que las células $CD4^+$ (Th1) actúan como inductoras de la HR. Estas subpoblaciones de linfocitos Th1 circulantes se inducen en el primer contacto con el antígeno y al enfrentarse con él en un segundo contacto se activan y liberan citocinas promotoras de inflamación, como el IFN- γ y el TNF- α , potentes activadores de los macrófagos que se encuentran infiltrando los sitios inflamados. (Abbas y col., 2008).

Diferentes estudios realizados en setas comestibles han puesto de manifiesto la activación de los linfocitos T. Mizuno (1996) refirió que el esquizofilano aumenta la actividad de las células T e incrementa la sensibilidad de las células LAK citotóxicas y de las células NK mediante la secreción de IL-2.

Por otro lado, Paulik y col. (1996) evaluaron el efecto, en ratones, de dos glucanos extraídos de *P. ostreatus* y una levadura, en diferentes funciones del sistema inmune. Ambos glucanos incrementaron la respuesta de HR respecto al control, aunque el glucano aislado de la seta comestible mostró una respuesta superior.

Un incremento significativo en el número de células T ($CD4^+$ y $CD8^+$) se encontró también en ratones administrados con un polisacárido soluble en agua, extraído del medio de fermentación de *P. citrinopileatus* (Wang y col., 2005).

En estudios realizados por Bilbo y Nelson (2001) en el hámster de Siberia, se encontró que las hormonas sexuales esteroideas potencian la inmunidad mediada por células tanto en individuos machos como en hembras. Un resultado similar fue referido por Klein y Nelson (1998) al investigar la respuesta proliferativa de esplenocitos con un mitógeno de células T (ConA) en dos especies de *Microtus* (rata de agua).

3.3.6 Anatomopatología Macroscópica y Masa Relativa de Órganos.

Al término de la experimentación *in vivo*, la observación de las características anatómicas de los órganos no mostró evidencias que indicaran trastornos patológicos, ni alteraciones fisiológicas.

Respecto al peso relativo de los órganos, sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos relativos del timo y riñones, que con independencia del tratamiento, fueron superiores respectivamente en las hembras ($p < 0.05$), y en los machos ($p < 0.05$) (Tabla 6). Sin embargo, el comportamiento de estos parámetros se corresponde con el de los datos de referencia para la especie, informados por Alemán y col. (2000).

3.3.7 Consideraciones Preliminares de la Toxicidad a Dosis Repetida del Suplemento de *Pleurotus* Administrado por Vía Oral.

Los estudios preclínicos para evaluar el perfil de seguridad de los BRMs incluyen las pruebas de toxicidad. Por tal motivo, en nuestro estudio se llevó a cabo de forma preliminar una evaluación de los posibles efectos tóxicos asociados a la administración oral del suplemento nutricional de **Pleurotus** en ratones Balb/c inmunocompetentes.

En las observaciones clínicas realizadas dos veces al día, no se encontraron síntomas que evidenciaran procesos patológicos, ni se registró la muerte de ningún animal durante el período experimental.

Los ratones de los grupos suplementados, manifestaron un comportamiento diferente al de los controles con relación al peso corporal, así como entre los sexos. Los datos muestran diferencias significativas entre todos los grupos, siendo mayores los valores en los controles en relación a los suplementados y en los machos respecto a las hembras ($p < 0.05$). Aunque es válido señalar que

Tabla 6. Masa relativa de diferentes órganos en ratones Balb/c inmunocompetentes, tratados o no con el suplemento nutricional de *Pleurotus* sp.

Órganos	Masa relativa (g/ 100 g) en los diferentes grupos experimentales.			
	SNP-Hembras	Control Hembras	SNP-Machos	Control Machos
Hígado	5,01 ± 0,18	5,12 ± 0,25	5,29 ± 0,29	5,23 ± 0,94
Bazo	0,48 ± 0,05	0,44 ± 0,11	0,46 ± 0,09	0,43 ± 0,04
*Timo	0,33 ± 0,03 a	0,35 ± 0,07 a	0,23 ± 0,04 b	0,23 ± 0,10 b
Pulmones	0,89 ± 0,08	0,85 ± 0,14	0,62 ± 0,04	0,75 ± 0,04
Corazón	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,07	0,52 ± 0,02	0,55 ± 0,03
*Riñones	1,41 ± 0,11 b	1,52 ± 0,06 b	2,15 ± 0,12 a	2,12 ± 0,21 a

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente aproximadamente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso. Los grupos controles (Control-Hembras y Control-Machos) se alimentaron con dieta convencional para la especie durante la investigación.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo ± DE (n= 5).

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

en todos los casos, los animales experimentaron un incremento del peso corporal durante la totalidad del período experimental (datos no mostrados).

El comportamiento resulta lógico, si tenemos en cuenta que los animales que fueron administrados con el suplemento de *Pleurotus*, fueron sometidos a un estrés adicional durante las inmovilizaciones realizadas diariamente para ser suplementados. Sin embargo, los controles solo percibieron el estrés mínimo provocado por los manejos habituales de la experimentación.

Aún cuando el método utilizado para la suplementación por vía oral, resulta mucho menos invasivo y fue escogido en función de proporcionar mayor bienestar a los animales, en correspondencia con lo observado en el Principio de las tres Rs (Russell y Burch, 1959), el procedimiento es lento y requiere someter al animal a un período de manipulación superior.

Como se ha reflejado en la literatura, la sujeción puede ser tan estresante o más que el propio procedimiento, especialmente si los períodos de retención son más duraderos. Los procedimientos de manejo o inmovilización, no sólo resultan más estresantes para el animal y más difíciles para el operario, sino que también es probable que el estrés se convierta en un factor que influya en el comportamiento de los parámetros fisiológicos y pueda afectar los resultados que se obtienen en las investigaciones con biomodelos animales (Morton y col. 2001).

Por otro lado, el mayor incremento de peso de los machos en relación a las hembras se corresponde con los datos referidos como normales por Aleman y col. (2000), para el comportamiento de este parámetro en esta especie animal.

La conducta ante la alimentación mostró diferencias significativas en los datos obtenidos, de los machos respecto a las hembras ($p < 0.05$). Este resultado se corresponde en parte con los anteriores, ya que el peso promedio de los machos fue superior al de las hembras y el de los controles, superior al de los suplementados.

Por su parte, el consumo de agua fue similar en todos los grupos, indicando que la administración del producto no provocó alteraciones fisiológicas que influyeran de manera negativa en esta función. Los datos no refirieron diferencias significativas entre los grupos tratados o no con el suplemento, ni entre los sexos ($p > 0.05$). Aunque los valores reflejaron una tendencia similar al de los parámetros anteriores, siendo mayores en los machos respecto a las hembras y en los controles respecto a los suplementados (Tabla 7).

El hecho de que la ganancia en peso y el consumo de agua y alimentos hayan sido mayores en los machos que en las hembras, puede obedecer a las diferencias fisiológicas existentes entre los dos sexos (Infante y col., 2001).

La condición de inocuo del suplemento que se evalúa, ha sido previamente reflejada en un perfil fármaco-toxicológico, confeccionado por especialistas del Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) de Santiago de Cuba (Marcos, 2009).

Estudios de toxicidad aguda realizados a extractos acuosos de *P. ostreatus*, obtenidos con agua destilada y administrados por vía oral e i.p. a ratones, estimaron una dosis letal media (LD-50) superior a 3 g/kg a las 24 horas para ambas rutas. En el ensayo de toxicidad sub-aguda (30 días) la LD-50 mostró un valor de 1 143 mg/kg de peso en los animales tratados por vía i.p. (Deen y col., 1987).

Por otra parte, Alcántara (2010) informó que el extracto F-I obtenido por decocción a partir del micelio de *Pleurotus* sp., presentó un comportamiento satisfactorio durante su administración a dosis única por vía endovenosa (100 mg/kg), a ratones Balb/c inmunocompetentes.

Tabla 7. Peso corporal y consumo de agua y alimentos, en ratones Balb/c inmunocompetentes, tratados o no con el suplemento nutricional de *Pleurotus* sp.

Parámetros/Grupos	SNP-Hembras	Control Hembras	SNP-Machos	Control Machos
*Peso corporal (g)	17.46 ± 0.38 a	18.69 ± 1.05 b	20.32 ± 0.35 c	20.9 ± 1.07 d
Consumo de agua (mL)	6.0 ± 1.21	7.0 ± 0.72	7.36 ± 0.62	7.48 ± 1.95
*Consumo de alimentos (g)	2.23 ± 0.46 a	2.39 ± 0.33 a	2.83 ± 0.32 b	3.16 ± 0.21 b

A los grupos SNP-Hembras y SNP-Machos se les administró diariamente por vía oral durante 14 días 0.2 mL de una suspensión del suplemento nutricional, equivalente aproximadamente a una dosis de 1 000 mg/kg de peso. Recibieron además la dieta convencional y agua *ad libitum*. Los grupos controles (Control-Hembras y Control-Machos) se alimentaron con dieta convencional para la especie durante la investigación y consumieron agua *ad libitum*.

Todos los grupos fueron pesados diariamente y se les registró el consumo de agua y alimentos

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo ± DE (n= 5).

*Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

Teniendo en cuenta los resultados que hemos presentado y discutido con anterioridad, se puede concluir que el suplemento dietético que se propone posee las propiedades necesarias para ser considerado como tal y contiene los compuestos bioactivos para inducir una estimulación positiva de la respuesta inmune en un organismo inmunocompetente. Consideramos posible entonces, evaluar sus efectos en un biomodelo de inmunodeficiencia secundaria, inducida por un fármaco inmudepresor (citostático) empleado convencionalmente en los esquemas de quimioterapia antitumoral.

3.4 Evaluación de las Propiedades Inmunomoduladoras del Suplemento Nutricional de *Pleurotus* en Ratones Balb/c Inmunodeprimidos.

Investigaciones recientes en el campo biomédico resaltan el interés existente en el empleo de productos naturales y sus derivados con fines terapéuticos; tal es el caso de las plantas, las algas y las setas comestibles, entre otras (Marcos, 2009).

En los últimos tiempos, las setas comestibles han surgido como una fuente extraordinaria de productos nutraceuticos, con diversas funciones sobre la respuesta inmune (Synytsya y col., 2009), demostradas mediante estudios preclínicos y clínicos. Lo que obedece, entre otras razones, a su utilidad en patologías con difícil diagnóstico y tratamiento, asociadas a un número elevado de reacciones adversas, como el cáncer y las inmunodeficiencias (Sullivan, 2006).

La quimioterapia y la radioterapia en el tratamiento del cáncer, contribuyen a deprimir el sistema inmune como resultado de la destrucción de las células linfoides y de la médula ósea (Janeway y col., 2005). Tomando en consideración estos antecedentes, en el presente trabajo se investigó la actividad inmunocética potencial de un suplemento nutricional de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp., en un biomodelo experimental de inmunosupresión con el quimioterapéutico ciclofosfamida.

Los experimentos fueron realizados utilizando ratones Balb/c a los que se les indujo una inmunodepresión con ciclofosfamida y los diferentes efectos moduladores se evaluaron mediante el análisis de parámetros relacionados con la hematopoyesis, el comportamiento de las proteínas séricas y hepáticas, así como la estimulación de la respuesta inmune celular *in vivo* e *in vitro*.

3.4.1 Influencia de la Suplementación sobre las Proteínas Séricas.

Al igual que en el experimento realizado con animales inmunocompetentes, en este, no se reflejan resultados significativos en cuanto al efecto de la suplementación con *Pleurotus* sp. en los niveles de proteínas séricas (Tabla 8). Igualmente consideramos, se pudiera evaluar proteínas de transporte de menor tiempo de vida media que la albúmina, como la transferrina, la prealbúmina o la proteína de enlace al retinol y con ello garantizar una selección más sensible.

En este estudio, los animales que recibieron profilácticamente el suplemento de *Pleurotus* sp. exhibieron los valores inferiores en la relación A/G ($p < 0.05$), lo cual respalda la idea de una posible estimulación de la síntesis de globulinas séricas. La relación albúmina/globulina, como ya se ha planteado, es muy utilizada en la evaluación de las proteínas del suero.

Se ha informado que las células B son más sensibles a la ciclofosfamida que las T y en algunos casos, la supresión de la respuesta de anticuerpos ante un estímulo específico puede ser muy duradera (Flórez, 1998). Estos elementos nos motivan a estudiar en trabajos futuros el efecto del suplemento de **Pleurotus** en la respuesta inmune humoral.

Tabla 8. Efecto del suplemento nutricional de *Pleurotus* sp. sobre el contenido de proteínas séricas en ratones Balb/c inmunodeprimidos.

	Pleurotus- CY	Salina-CY	CY- Pleurotus	CY-Salina	Control
Proteínas séricas totales (g/dL)	6,07 ± 0,8	5,29 ± 0,2	5,3 ± 0,35	5,5 ± 0,58	6,49 ± 0,05
Albúmina (g/dL)	3,12 ± 0,62	3,99 ± 0,08	3,63 ± 0,37	4,02 ± 0,38	3,61 ± 0,11
Globulinas (g/dL)	2,93 ± 1,37	1,8 ± 0,98	1,98 ± 0,57	1,47 ± 0,62	2,88 ± 0,48
*Albumina/ Globulinas (A/G)	1,3 ± 0,76 c	3,15 ± 0,74ab	2,32 ± 0,74ab	3,18 ± 1,75a	1,25 ± 0,43abc

La inmunosupresión fue inducida mediante la inoculación i.p. de ciclofosfamida (CY) 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-Salina y CY-Pleurotus, o el día 5 en los grupos Pleurotus-CY y Salina-CY. A los grupos Pleurotus-CY y CY-Pleurotus se les administró el suplemento de *Pleurotus* sp. (1 000 mg/kg) durante 8 días por vía oral.

Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo ± DE (n= 5).

*Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student- Neuman-Keuls, $p < 0.05$).

3.4.2 Resultados de la Administración del Suplemento sobre Parámetros Hematológicos en Sangre Periférica.

Hemoglobina

Si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de hemoglobina en los grupos tratados con el suplemento de **Pleurotus**, tanto en régimen profiláctico como terapéutico, solo los que recibieron el producto con anterioridad al tratamiento inmunosupresor mostraron una recuperación en este parámetro con valores similares a los del grupo control ($p < 0.05$) (Figura 6).

En el estudio realizado por Morris y col. (2003), les fue administrado un extracto acuoso de micelio de *Pleurotus* sp. (F-1), obtenido por decocción, a un grupo experimental de ratones Balb/c, que posteriormente fue inmunodeprimido con ciclofosfamida. Los resultados mostraron niveles de hemoglobina significativamente superiores en estos animales, en comparación con el grupo control, al que no se le suministró el extracto.

Aunque la vía de administración (i.p.) utilizada en este trabajo, difiere de la empleada en nuestra investigación, el régimen de administración profiláctico coincide en cuanto a los resultados de la recuperación de este parámetro. Este efecto favorable sobre los niveles de hemoglobina podría ser un aspecto a considerar para la aplicación del suplemento de **Pleurotus**, en el manejo nutricional y/o farmacológico de diferentes patologías.

Leucocitos

Uno de los parámetros más afectados en estados de inmunodeficiencias inducidas con citostáticos es el conteo total de leucocitos. Los quimioterápicos suelen ser citotóxicos para los linfocitos y para los precursores de los granulocitos y los monocitos (Abbas, 2008).

En nuestro trabajo, se apreció una recuperación de esta población celular en los animales tratados profilácticamente con el suplemento de *Pleurotus* sp., que alcanzaron valores similares al control ($p < 0.05$) (Figura 7). Los datos obtenidos estuvieron comprendidos dentro del intervalo considerado como normal para la especie ($6-15 \times 10^9$ cel/L) (Iowa State University of Science and Technology, http://www.lar.iastate.edu/index.php?option=com_content&view=artic).

Sin embargo, los ratones administrados con el producto, una vez inducido el estado de inmunodepresión, no mostraron una recuperación en los conteos leucocitarios en sangre periférica, ya que no difirieron de los conteos realizados en los grupos controles tratados con SSF.

La ciclofosfamida, es un fármaco inmunosupresor usado comúnmente en la terapia del cáncer. En nuestras experiencias, ejerció una potente actividad inmunosupresora, causando severos daños en el tejido hematopoyético de los ratones a los cuales se les administró SSF (0.9 %). Pero en contraste, se pudo constatar que el suplemento de **Pleurotus** tuvo un efecto protector sobre el sistema cuando fue administrado con anterioridad al citostático.

La administración de un glucano genéticamente modificado (betafectina o PGG), de *Sacharomyces cerevisiae*, aceleró la recuperación de leucocitos en ratones con leucopenia inducida por tratamiento con ciclofosfamida (Lagrange, 1991).

Por su parte, Meerovich y col. (2005) informaron la inhibición del crecimiento de tumores en ratones, por un extracto micelial de una especie de *Pleurotus*, administrado solo y combinado con ciclofosfamida. En este estudio se observó que la administración combinada de la ciclofosfamida

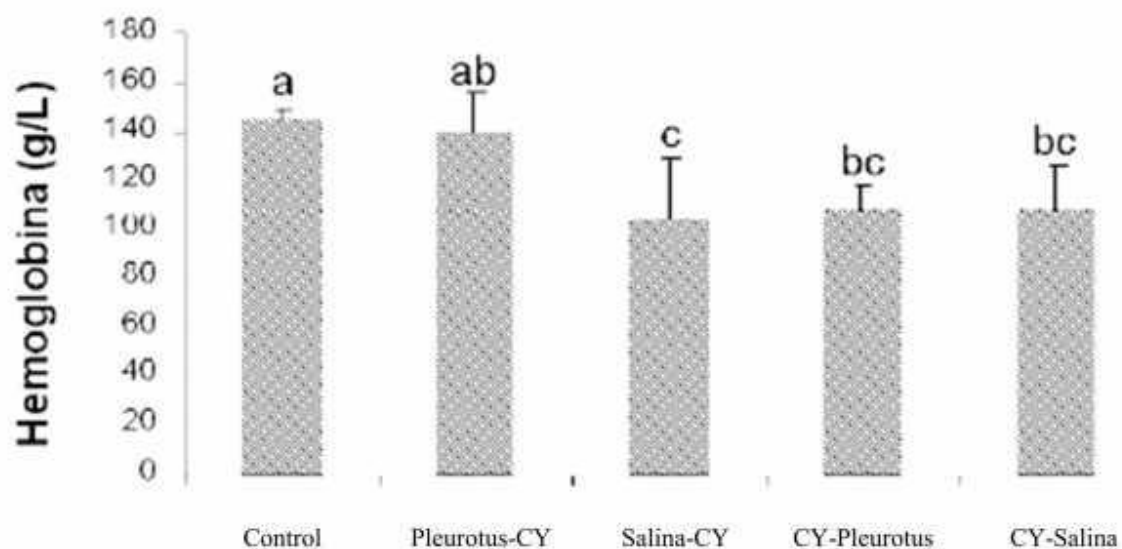


Figura 6. Niveles de hemoglobina en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

La inmunosupresión fue inducida mediante la inoculación i.p. de ciclofosfamida (CY) 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-Salina y CY-*Pleurotus*, o el día 5 en los grupos *Pleurotus*-CY y Salina-CY. A los grupos *Pleurotus*-CY y CY-*Pleurotus* se les administró el suplemento de *Pleurotus* sp. (1 000 mg/kg) durante 8 días por vía oral.

Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$).

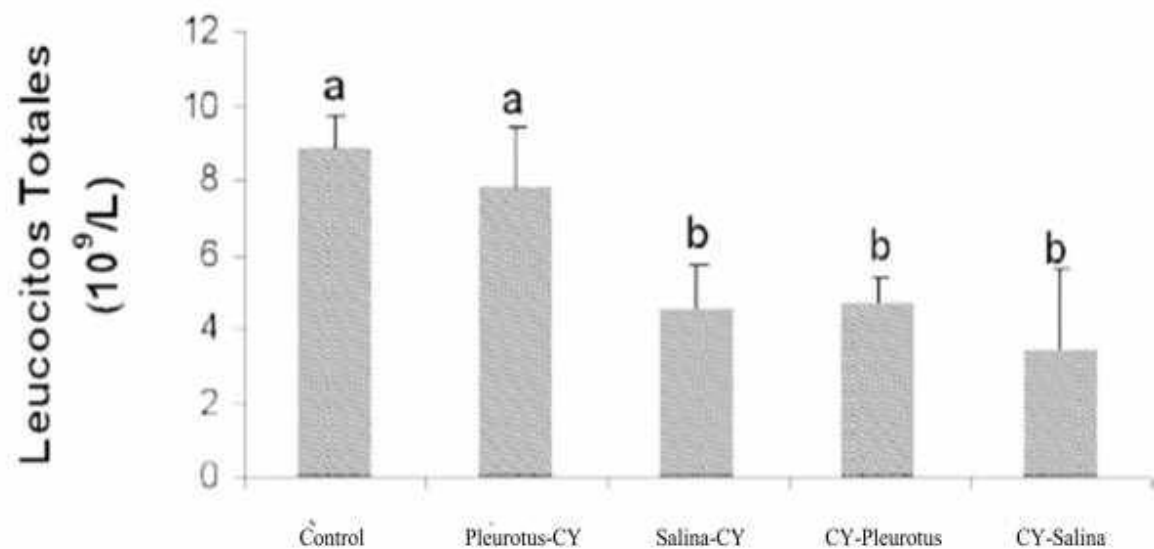


Figura 7. Evaluación del número de leucocitos totales en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

La inmunosupresión fue inducida mediante la inoculación i.p. de ciclofosfamida (CY) 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-Salina y CY-*Pleurotus*, o el día 5 en los grupos *Pleurotus*-CY y Salina-CY. A los grupos *Pleurotus*-CY y CY-*Pleurotus* se les administró el suplemento de *Pleurotus* sp. (1000 mg/kg) durante 8 días por vía oral.

Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$).

con el extracto redujo el grado de leucopenia, comparado con la administración del agente quimioterapéutico solo.

3.4.3 Celularidad de la Médula Ósea.

Es conocida la importancia que tiene la médula ósea en la producción de células madres autorregeneradoras y pluripotenciales, precursoras de los progenitores mieloide y linfoide, a partir de los cuales se originan, por procesos de proliferación y diferenciación mediados por citocinas (CSFs), los variados elementos celulares implicados en las diferentes respuestas inmunitarias (Abbas, 2008).

Uno de los efectos adversos más comunes de la quimioterapia es la neutropenia, provocada por la depresión de la médula ósea. Como resultado, este tipo de terapia puede acelerar y aumentar el riesgo de infecciones, lo que se traduce en un detrimento en la calidad de vida de los pacientes (Akramiené y col., 2007).

Los resultados del conteo de células en la médula ósea mostraron un efecto potenciador de la actividad hematopoyética, cuando el suplemento fue administrado de forma profiláctica (9.89×10^6 cel/fémur). Este valor es estadísticamente similar al de los animales inmunocompetentes utilizados como control ($p < 0.05$) (Figura 8). Sin embargo, la administración de forma terapéutica, no presentó diferencias significativas respecto a los grupos controles tratados con SSF.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se informó el efecto estimulador de un extracto crudo del micelio, obtenido por FES de *Pleurotus* sp., sobre la médula ósea de ratones con una inmunodeficiencia adquirida, como resultado del tratamiento con ciclofosfamida (Morris y col., 2003). Los β -glucanos son considerados como importantes estimuladores de la hematopoyesis, actuando no sólo a través de los factores endógenos liberados por la activación de las células mieloides, sino también a través de una acción directa sobre las principales células precursoras (Torello y col., 2010).

El resultado obtenido en nuestro trabajo, permite suponer un efecto modulador de los componentes presentes en el suplemento en la hemopoyesis, posiblemente a través de la estimulación de la síntesis de factores, como las citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis CSFs. Este mecanismo ha sido demostrado en la actividad de un extracto del alga *Chlonella kessleri*, (Ivastimul) de uso veterinario (Vacek y col., 1990).

3.4.4 Comportamiento de la Celularidad Esplénica.

En todos los grupos experimentales tratados con el fármaco inmunosupresor se observó una reducción significativa de la celularidad esplénica en comparación con los animales inmunocompetentes ($p < 0.05$) (Figura 9).

Otras investigaciones desarrolladas por nuestro grupo con animales inmunocompetentes evidenciaron un incremento en la celularidad esplénica de ratones que recibieron el extracto F-B de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. durante 7 días por vía i.p. (100 mg/kg) (Alvarez, 2009).

Resultados similares fueron informados por Morris y col., (2003) al evaluar el efecto de un extracto micelial de *Pleurotus* sp. obtenido por FES en ratones tratados con ciclofosfamida. No obstante en un estudio análogo, Morris y col. (2003) refirieron que la celularidad esplénica de los ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida, fue ligeramente incrementada en el grupo tratado con el extracto.

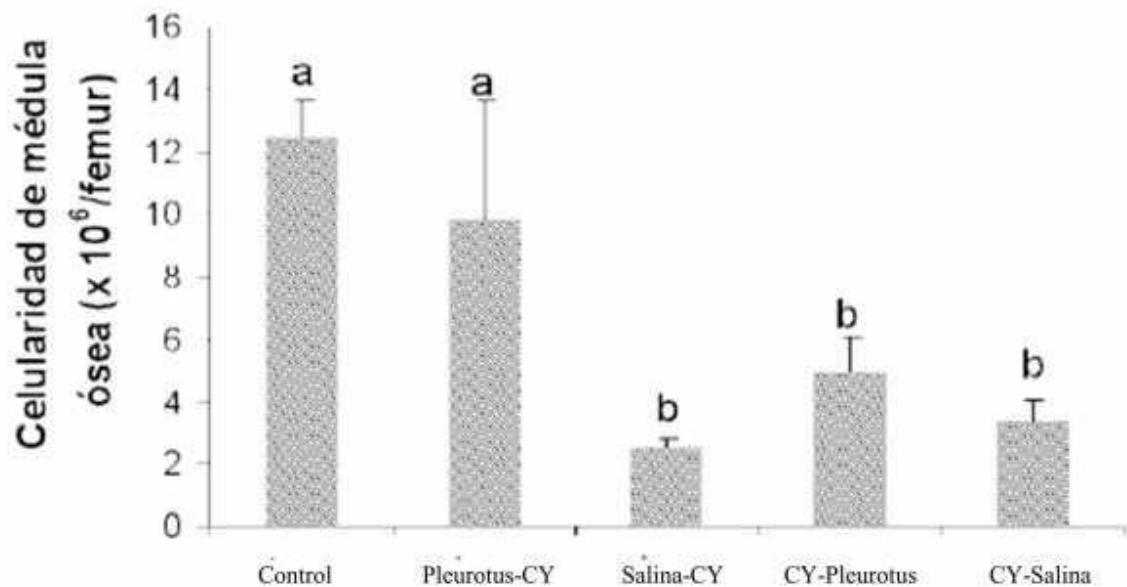


Figura 8. Evaluación del número de células en la medula ósea de ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con el suplemento de **Pleurotus**.

La inmunosupresión fue inducida mediante la inoculación i.p. de ciclofosfamida (CY) 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-Salina y CY-Pleurotus, o el día 5 en los grupos Pleurotus-CY y Salina-CY. A los grupos Pleurotus-CY y CY-Pleurotus se les administró el suplemento de Pleurotus sp.(1000 mg/kg) durante 8 días por vía oral.

Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$).

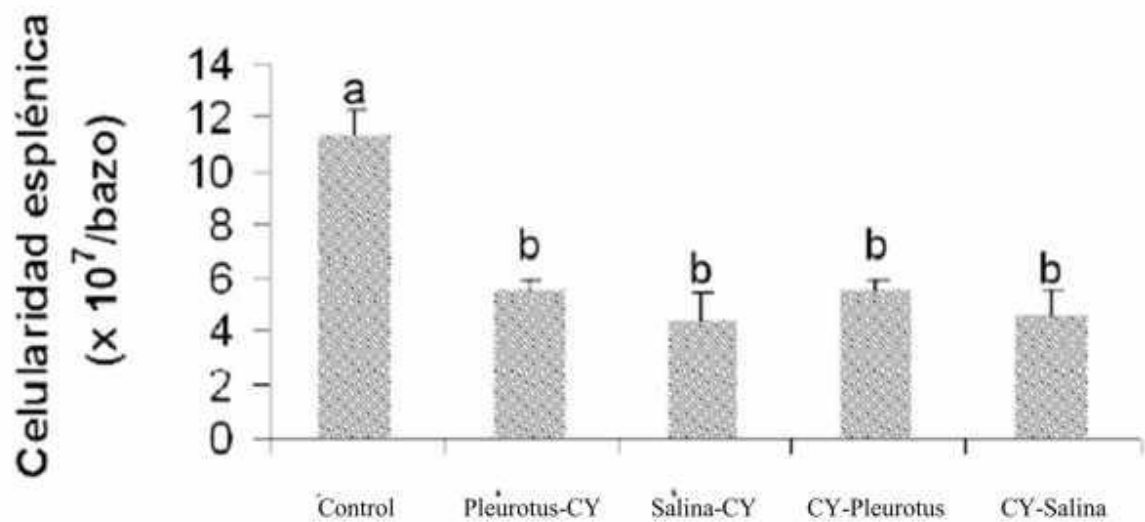


Figura 9. Evaluación de la celularidad del bazo en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

La inmunosupresión fue inducida mediante la inoculación i.p. de ciclofosfamida (CY) 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-Salina y CY-*Pleurotus*, o el día 5 en los grupos *Pleurotus*-CY y Salina-CY. A los grupos *Pleurotus*-CY y CY-*Pleurotus* se les administró el suplemento de *Pleurotus* sp. (1000 mg/kg) durante 8 días por vía oral.

Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$).

Aunque en el biomodelo de inmunosupresión evaluado no se evidenció una estimulación de la celularidad esplénica, en futuros trabajos debe ser abordado el estudio de la posible activación funcional de estas células.

En una investigación, Wagnerova y col. (1993) administraron dos derivados de un carboximetilglucano con varios grados de sustitución, en tres dosis diferentes (10, 50 y 100 mg/kg), a ratones tratados con ciclofosfamida (200 mg/kg). El tratamiento con ciclofosfamida estuvo asociado a una disminución de parámetros celulares como el conteo total de leucocitos en sangre periférica, la celularidad de la médula ósea y la celularidad esplénica. En consecuencia, se encontró que el grado de inmunodepresión fue mucho menor en los ratones que recibieron el carboximetilglucano; así como también fue más rápida en este grupo la recuperación de la actividad hematopoyética.

3.4.5 Contenido de Proteínas Hepáticas Totales.

Los ratones que recibieron el suplemento nutricional obtenido de *Pleurotus* sp., con anterioridad al tratamiento con ciclofosfamida, presentaron niveles de proteínas hepáticas totales superiores al grupo administrado con el producto en régimen terapéutico ($p < 0.05$), si bien no se restablecieron los valores respecto a los animales inmunocompetentes (Figura 10).

El incremento en los niveles de proteínas hepáticas en el grupo administrado profilácticamente con **Pleurotus**, podría suponer una utilización más eficiente del nitrógeno que permita la estimulación del metabolismo proteico en el hígado, y también podría estar relacionado con un aumento en la síntesis de proteínas de fase aguda entre ellas las proteínas del complemento (Abbas y col., 2008).

3.4.6 Estimulación de la Respuesta Inmune Celular *in vivo*.

La prueba cutánea de hipersensibilidad retardada (HR) también fue utilizada en este estudio, para evaluar el comportamiento de la inmunidad celular *in vivo*.

Los ratones que recibieron el suplemento nutricional de **Pleurotus** mostraron una respuesta de HR superior a la del grupo tratado con solución salina que resultó estadísticamente significativa a las 48 y 72 horas ($p < 0.05$). No se apreciaron diferencias en los valores del edema inflamatorio entre el grupo suplementado y el control a partir de las 48 h. Este resultado sugiere un efecto estimulador del suplemento de *Pleurotus* sp. sobre la respuesta inmune mediada por células T (CD4⁺ Th1) (Figura 11).

La inducción de reacción de HR fue corroborada con el incremento observado en el índice de peso de los linfonodos poplíteos en los animales suplementados ($p < 0.05$) (Figura 12). Los ganglios linfáticos son órganos secundarios o periféricos que proporcionan el entorno para que los linfocitos interactúen entre sí, o con las células presentadoras de antígeno (APC) y otras células accesorias, y para que entren en contacto con antígenos captados de los tejidos (Janeway y col., 2005).

Numerosos polisacáridos bioactivos se han considerado como inmunomoduladores que afectan la proliferación y diferenciación de células inmunes, citoquinas e interleucinas, debido al reconocimiento de estos compuestos, por ciertos receptores situados en la superficie de los leucocitos y otras células inmunes que conducen a mejorar la respuesta inmunitaria innata y mediada por células (Moradali y col., 2007).

Estos resultados, vienen a complementar los obtenidos en el experimento con animales inmunocompetentes y reafirman la idea de que los β -glucanos presentes en el suplemento, pueden actuar como inductores de la respuesta inmune celular.

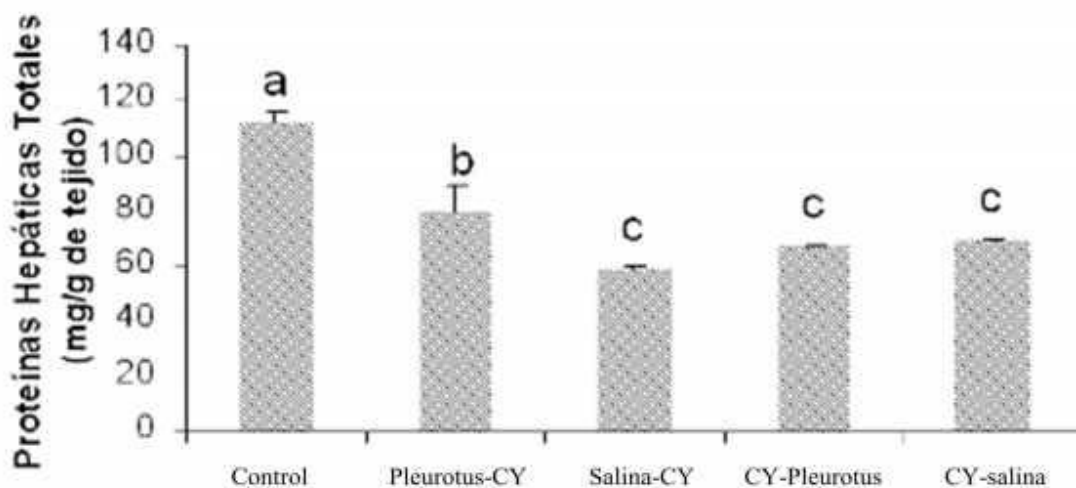


Figura 10. Evaluación las proteínas hepáticas totales en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con el suplemento nutricional de **Pleurotus**.

La inmunosupresión fue inducida mediante la inoculación i.p. de ciclofosfamida (CY) 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-Salina y CY-*Pleurotus*, o el día 5 en los grupos *Pleurotus*-CY y Salina-CY. A los grupos *Pleurotus*-CY y CY-*Pleurotus* se les administró el suplemento de *Pleurotus* sp. (1000 mg/kg) durante 8 días por vía oral.

Los resultados se presentan como la media en cada grupo $\pm$ DE (n = 5). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls, $p < 0.05$).

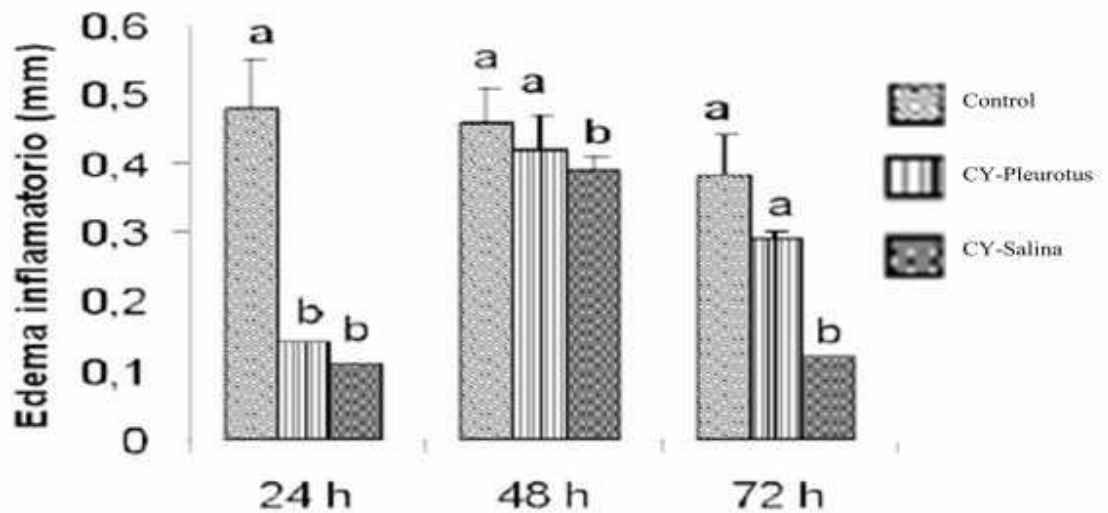


Figura 11. Evaluación de la respuesta inmune celular en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con suplemento nutricional de **Pleurotus**.

Se conformaron dos grupos experimentales ($n = 3$) inmunosuprimidos con ciclofosfamida el día 0; uno de los grupos fue administrado con el suplemento de *Pleurotus* sp. durante 8 días y el otro recibió solución salina fisiológica (SSF). El día 0 los ratones fueron sensibilizados por la inoculación intradérmica (i.d.) de 50 μ L de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) 5 mg/mL en Adyuvante Completo de Freund, en dos sitios del abdomen. A los 8 días los animales se retaron por vía i.d. en el cojinete de la pata trasera izquierda con 20 μ L de la solución de BSA 5 mg/mL. En el cojinete de la pata derecha se inoculó un volumen similar de solución salina fisiológica. La medición de la induración se realizó con un micrómetro K1972r (URSS) a las 24, 48 y 72 h del reto. La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSF.

Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$).

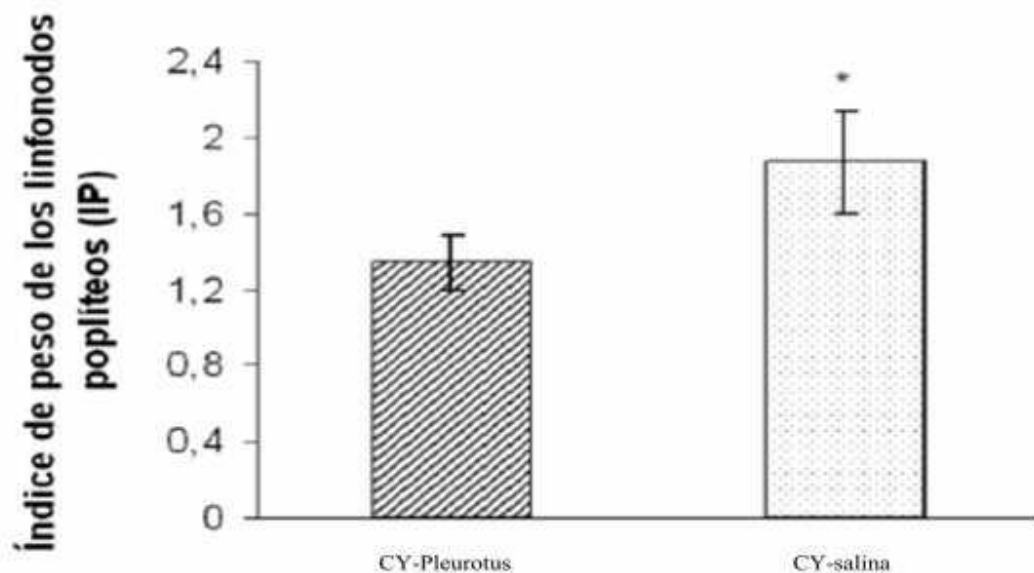


Figura 12. Índice de peso (IP) de los linfonodos poplíteos en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida, tratados o no con suplemento nutricional de **Pleurotus**.

En los animales inmunodeprimidos con ciclofosfamida del experimento de inducción de respuesta de hipersensibilidad retardada ($n = 3$), fueron localizados los linfonodos poplíteos, extirpados y pesados por separado en balanza analítica. El índice de peso se expresó como la relación del peso del linfonodo poplíteo tratado (izquierdo) con respecto al peso del linfonodo poplíteo control (derecho).

El asterisco indica diferencias significativas (t de Student, $p < 0.05$).

3.4.7 Anatomopatología Macroscópica y Observaciones Clínicas.

Durante el desarrollo de la investigación no hubo factores ambientales que afectaran los resultados del estudio, así como tampoco se produjo muerte alguna entre los individuos sometidos a la experimentación. Sin embargo, aún cuando la administración a dosis única del fármaco, fue solo con el objetivo de inducir inmunodepresión, es evidente que el mismo tuvo un efecto supresor sobre la hemopoyesis.

De manera general, los órganos de los animales tratados con el citostático (hígados, bazo, pulmones, riñones, corazón y timo), mostraron diferencias respecto a los del grupo control. Se observó palidez en relación a la coloración y una notable disminución del tamaño. En el caso específico del bazo, la textura también evidenció características diferentes, notándose reblandecidos al momento de ser macerados para obtener los extractos. Por su parte, las médulas óseas también mostraron un deterioro reflejado en su coloración.

Según Cruese y Lewis (2004), la administración de ciclofosfamida, supone una toxicidad que implica a determinados órganos con cierta especificidad; donde los más frecuentemente afectados son los pulmones, el hígado, los riñones y las estructuras nerviosas.

3.5 Discusión General.

La caracterización de la biomasa seca y pulverizada del suplemento de *Pleurotus*, es un paso importante en el desarrollo del producto, así como en el esclarecimiento de los diferentes compuestos presentes, con actividad sobre la fisiología del organismo. Aunque en este estudio, no se incluyó la determinación de todos los parámetros bromatológicos, la identificación de compuestos mayoritarios como proteínas y carbohidratos resulta relevante, a partir de la implicación que tienen estos componentes en la activación de los mecanismos de la respuesta inmunitaria y en la nutrición.

De igual modo, resulta interesante la confirmación y/o inferencia de la presencia de compuestos de bajo peso molecular, con actividad inmunoestimulante y de minerales esenciales para los procesos fisiológicos del organismo.

En términos generales, los resultados obtenidos con la administración del suplemento nutricional, elaborado a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus* sp., a ratones inmunocompetentes sugieren que se favorece, de modo directo o indirecto, la estimulación de mecanismos humorales y celulares.

En este sentido, se identificó además, una modulación diferencial dependiente del sexo en determinados parámetros, como conteo de linfocitos e inducción de reacción de hipersensibilidad retardada en los machos y niveles de globulinas totales, celularidad peritoneal y conteo de polimorfonucleares en las hembras.

La influencia del sexo en la función inmunitaria y la respuesta diferencial dependiente del sexo ante las infecciones, traumas y sepsis han sido referidas por diversos autores (Bilbo y Nelson, 2001; Albers y col., 2005; Martin y col., 2006). Hoy día se conoce que las hormonas sexuales modulan diversos fenómenos implicados en la respuesta inmune, incluyendo la maduración y selección de timocitos, el tránsito celular, la proliferación de linfocitos, la expresión de moléculas y receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y la producción de citocinas (de León y Morales, 2006).

Todo lo anterior, ha conducido a postular la existencia de un dimorfismo sexual en la respuesta inmune (Bouman y col., 2005; de León y Morales, 2006). Sin embargo, no se ha estudiado la

influencia del sexo en las variaciones de los parámetros inmunológicos como resultado de la administración de productos formulados a partir de setas comestibles-medicinales.

Este aspecto, en consecuencia, debería ser tomado en consideración tanto en las evaluaciones preclínicas, como en la estimación de los marcadores de inmunomodulación en futuras intervenciones nutricionales en humanos, ya que a pesar de los avances, hace falta aún mayor cantidad de estudios sobre la acción de los esteroides sexuales en el sistema inmune *per se*, así como de sus efectos en la modulación de la actividad de modificadores de la respuesta biológica.

De modo general, podemos considerar que el suplemento nutricional de **Pleurotus** posee propiedades inmunomoduladoras, que se reflejaron en la recuperación inmunológica de ratones Balb/c tratados con ciclofosfamida, a partir de la estimulación de la celularidad de la médula ósea, el incremento de los conteos leucocitarios y de los niveles de globulinas y proteínas hepáticas; así como de la inducción de reacción de hipersensibilidad retardada. Se demostró que el efecto inmunoprotector es particularmente importante cuando el producto es administrado en régimen profiláctico.

Numerosos estudios clínicos realizados han demostrado claramente el valor terapéutico de las setas en la prevención y tratamiento del cáncer, en enfermedades virales como la influenza y la poliomielitis, y en la hipercolesterolemia, la trombosis y la hipertensión (Valencia y Garin, 2010).

Los efectos identificados en el presente trabajo, también aportan evidencias que podrían sustentar potenciales aplicaciones en el tratamiento de las inmunodeficiencias, el cáncer y la malnutrición proteico-energética. Por lo tanto, el progreso en la comprensión de muchos aspectos metabólicos y funcionales de los suplementos inmunocéuticos derivados de las setas comestibles-medicinales, resolverá controversias sobre su papel en la inmunonutrición y proporcionará las bases para establecer recomendaciones sobre su utilización terapéutica.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo pudieran sugerir efectos sinérgicos, como resultado de la presencia de los diferentes compuestos bioactivos determinados, en función de las propiedades inmunomoduladoras que se evidenciaron, a través de la activación de los diferentes mecanismos inmunes evaluados y su probable unión a las estructuras de reconocimiento presentes en las células del sistema.

En función de estos antecedentes, se justifica el interés de registrar el producto como suplemento nutricional; así como la importancia de promover el consumo de la seta *Pleurotus* sp., en forma de alimento natural, para aprovechar todas sus potencialidades nutricionales y medicinales de conjunto, a partir de su identificación como un alimento con actividad funcional.

CONCLUSIONES

1. La caracterización de la biomasa seca y pulverizada de *Pleurotus* sp., permitió la determinación de componentes macromoleculares mayoritarios (proteínas 20 % y carbohidratos 55 %) y la cuantificación de estructuras biológicamente activas como los carbohidratos del tipo β -1,3-1,6-glucanos. Su valor resultó potenciado por la presencia de una fracción significativa de metabolitos de bajo peso molecular biológicamente activos.
2. La administración oral de la formulación de *Pleurotus* sp. a ratones Balb/c inmunocompetentes de ambos sexos, ejerció efectos inmunomoestimulantes, que mostraron un comportamiento diferencial en dependencia del sexo de los animales y se manifestaron a nivel de los conteos de linfocitos e inducción de la hipersensibilidad retardada en los machos y en los niveles de globulinas totales, celularidad peritoneal y conteo de polimorfonucleares en las hembras.
3. El suplemento de *Pleurotus* moduló la recuperación inmunológica de ratones Balb/c machos inmunodeprimidos con ciclofosfamida, lo que se reflejó a través de la estimulación de la actividad hematopoyética de la médula ósea, de los conteos leucocitarios y los niveles de proteínas hepáticas, así como de la respuesta humoral y celular, en términos de los niveles de globulinas y la inducción de reacción de hipersensibilidad retardada, respectivamente. El efecto inmunoprotector fue particularmente importante cuando el producto se administró en régimen profiláctico.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el desarrollo tecnológico de una formulación para el suplemento de **Pleurotus** en forma de cápsulas.
2. Profundizar en la caracterización químico-estructural del suplemento nutricional, atendiendo al contenido de β -glucanos totales y la determinación de otros minerales relevantes en la inmunonutrición.
3. Desarrollar futuras evaluaciones relacionadas con los efectos inmunobiológicos del suplemento nutricional de *Pleurotus* sp. en ratones inmunocompetentes e inmunodeprimidos de ambos sexos, en función del comportamiento diferencial observado en el presente trabajo.
4. Trabajar en función del completamiento de la documentación requerida para la solicitud del registro del suplemento en el Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos (INHA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, Lichtman A y Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. 6^{ta} ed. España: Elsevier Saunders. 2008.
- Adachi Y, Ohno N. Contribution of Dectin-1 to the Recognition of fungal cell wall products and the activation of Innate Immune Response. *Jpn. J. Med. Mycol.* 2006; 47(3): 185-194.
- Aida F, Shuhaimia M, Yazidb M y Maaruf A. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Food Science and Technology* 2009; 20: 567-575.
- Arihara, K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science* 2006; 74: 219-229.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
- Akramienė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E. Effects of β-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43 (8): 597-606.
- Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr* 2005; 94: 452-481.
- Alcántara M. Componentes bioactivos y propiedades inmunofarmacológicas de un extracto hidrosoluble crudo del micelio de *Pleurotus spp.* [Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Biotecnología]. Universidad de Oriente. 2010.
- Alemán C, Noa M, Rodeiro I, Menéndez R, Gámez R, Hernández C. Reference data for the principal physiological indicators in the three species of laboratory animals. *Laboratory Animals* 2000; 34: 379-385.
- Álvarez J. Compuestos bioactivos inmunofarmacológicos de extractos hidrosolubles crudos de micelio y cuerpo fructífero de *Pleurotus spp.* Tesis Presentada en Opción al Título de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. 2009.
- Armendáriz B, Mayett Y, Jiménez F, Sobal M, Morales P, Bonilla M, Ramírez-Carrasco, Tello I, Trigos A, Mendoza G, Soriano-Santos, González N, Martínez-Carrera D. Desarrollo de bebidas y alimentos funcionales a partir de recursos genéticos de hongos comestibles y medicinales en México. *En: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P y Mora VM. (Eds.) "Hacia un desarrollo sostenible del Sistema de producción-Consumo de los hongos Comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI".* Puebla: Colegio de Postgraduados; 2010. p. 221-239.
- Barbosa N, Querino M, Guedes O, José M. Characterization of fractions of aqueous soluble constituents of the mushroom *Pleurotus ostreatus-roseus* Sing and its effects on the serum protein profile of mice. *Rev. Bras. Farmacogn* 2002; 12: 36-37.
- Bello J. Alimentos con propiedades saludables especiales. *En: Alimentos, composición y propiedades*. 1^{ra} ed. Interamericana España: Mc.Graw-Hill; 2000. p.343-355.
- Beltrán Y, Morris HJ, Lebeque Y, Llauradó G, Marcos J, Bermúdez RC, García N. Aqueous extracts from mycelium and fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus spp.* *Rev Cub Química* 2005; XVII (1): 166.

Referencias Bibliográficas

- Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* and agricultural substrates in Cuba. *MicolAplicInt* 2001; 13 (1): 25-29.
- Bermúdez RC, Donoso C, Martinez CE, Ramos EI, Morris HJ. Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus* var. Florida. *Rev Cub de Aliment y Nutr* 2002; 16 (1): 13-18.
- Bermúdez RC, Morris HJ, Donoso C, Martinez CE, Ramos EI. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus*, var. florida. *Rev Cub Invest Biomed* 2003; 22 (4): 226-231.
- Bermúdez RC, Traba JA, Verdecía M, Gross P. Producción de *Pleurotus* sp. cfr. Florida sobre los residuales de la agroindustria cafetalera en Cuba. *Micología Neotropical Aplicada* 1994; 7: 47-50.
- Bermúdez RC y García N. Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba. *En: Hacia un desarrollo sostenible del Sistema de producción-Consumo de los hongos Comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P y Mora V.M, eds. Puebla: Colegio de Postgraduados; 2010. p. 488-512.
- Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19: 652-657.
- Bilbo SD, Nelson RJ. Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: 207-213
- Blackwell M, Spatafora JW. Fungi and Their Allies. *En: GM Mueller, GF Bills, MS Foster (Edit.) Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods* 2004. p. 7-21.
- Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ y Gershwin ME. The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med* 2008; 233 (3): 259-276.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 411-423.
- British Pharmacopeia (BP) Her Majesty Stationary Office. London UK. 2010. CD-Rom.
- Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy*. 1998. 53 (suppl. 44).
- Brujin J, Loyola C, Aqueveque P, Cañumir J, Cortéz M, France A. 2. Antioxidant properties of extracts obtained from *Grifola gargar* mushrooms. *Micología Aplicada Internacional* 2009; 1 (1) 11-18.
- Bush JA, Watkin JE. The beneficial effects of mushrooms. A preventative and adjuvant therapeutic strategy against cancer. 2007. *En: <http://www.biomedicallabs.com>*.
- Caglarirmak, N. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the black sea region of Turkey. *Micol. Apl. Inter.* 2002; 14 (1): 1-5.
- Camellini CM, Maraschin M, Matos MM, Zucco C, Ferreira AG, Tavares LA. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters* 2005; 27: 1295-1299.

Referencias Bibliográficas

- Candela Cl. Recomendaciones y protocolos de evaluación y soporte nutricional en el paciente adulto con cáncer. Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada (SENBA) Novartis Consumer Health. 2003.
- Cardona LF. Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Crónica Forestal y del Medio Ambiente. 2001; 16.
- Chang ST, Buswell JA. Medicinal Mushrooms a prominent source of nutraceuticals for the 21st Century. Curr Topics Nutraceut Res 2003; 1: 257-280.
- Chang S, Miles P. La biología de hongos: curso básico y conciso. Evolución. 1997. En: http://www.fs.fed.us/pnw/pubs/pnw_rn546.pdf (Consulta: 1 de julio de 2009).
- Chang ST y Miles PhG. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effects, and environmental impact. CRC Press. Boca Ratón Florida. 2004.
- Chen CS, Jounaidi Y, Su T, Waxman DJ. Enhancement of intratumoral cyclophosphamide pharmacokinetics and antitumor activity in a P450 2B11-based cancer gene therapy model. Cancer Gene Ther. 2007.
- Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1, 3)-(1, 6)-glucans. Mycol Res. 2007; 111: 635–652.
- Cheung LM, Cheung PCK. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. Food Chemistry 2005; 89: 403-409.
- Chi-Fung G, Keung W, Man-Yuen D. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. Journal of Hematology & Oncology. 2009; 2: 25.
- Ching-Feng M, Ming-Ching H, Wei-Hsin H. Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. Carbohydrate Polymers. 2007; 68 (3): 502–510.
- Cimanga, K., Ying, L., De Bruyne, T., Apers, S., Cos, P., Hermans, N. 2001. Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from *Bridelia ferruginea* stem bark. The Journal of Pharmacy and Pharmacology 53:757-761.
- Cohen R, Persky L y Hadar Y. Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Apl. Microbiol. Biotechnol. 2002; 58 (5): 582-594.
- Cortés M, García A, Suárez H. Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2007; 14 (1): 16-24.
- Costa R, Cunha V, Carvalho MR. The immunomodulator role of β -D-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. Rev Bras Nutr Clin. 2006; 21 (2): 163-168.
- Cruese JM, Lewis RE. Atlas of immunology. 2ed. CRC Press LLC 2004.
- Curvetto NR. Biotecnología de hongos comestibles y medicinales. Bahía Blanca, 2^{da} ed. 1999.
- Curvetto NR. Biotecnología en hongos superiores. Posibilidades presentes y futuras. Agro UNS 2004; Año 1 (2): 12-15.
- Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub SH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. Lupus 2004; 13 (9): 635-638.

Referencias Bibliográficas

- da Silva M, Naozuka J, da Luz JMR, de Assunção LS, Oliveira PV, Vanetti MCD, Bazzolli DMS, Kasuya MCM. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. Food Chemistry. 2011.
- De León MA, Morales J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? Rev. Invest. Clín. 2006; 58 (2).
- Deen-Al III, Twaij IIA, Al-Badr AA e Istarabadi TA. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. J Ethnopharmacol 1987; 3: 297-305.
- Descotes J. Methods of evaluating immunotoxicity. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology 2006; 2 (2): 249-259.
- Díaz C. Análisis económico para el establecimiento de un proyecto de producción de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) en la zona de Atenas, Alajuela. Tecnología en Marcha. 2004; 17 (4).
- Didukh MY, Wasser SP y Nevo E. Medicinal value of species of the family Agaricaceae Cohn (higher basidiomycetes) current stage of knowledge and future perspectives. Int J Med Mush 2003; 5: 133-152.
- Doyon M, Labrecque JA. Functional foods: a conceptual definition. British Food Journal, 2008; 110 (11): 1133-1149.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA y Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956; 28: 350-356.
- Dubost NJ, Ou B, Beelman RB. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushroom and correlation to total antioxidant capacity. Food Chemistry 2007; 105: 727-735.
- Falameeva O, Poteryaeva O. Zhanaeva. Macrophage Stimulator β -1,3-D-carboxymethylglucan improves the efficiency of chemotherapy of Lewis lungs carcinoma. Bull. Exp. Biol Med 2001; 132: 787-90.
- Figueroa V, Lama J. Conservación artesanal y natural de Hongos Comestibles en Cuba. La Habana: Proyecto comunitario Conservación de alimentos. 2007.
- Finke J, Bukowski R. Cancer Immunotherapy at the Crossroads. Humana Press. New Jersey, Totowa; 2004. p. 405.
- Firenzuoli F, Gori L y Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmac-Toxicological Problems. eCAM 2008; 5 (1): 3-15.
- Flórez J. Farmacología Humana. 3^{ra} ed. Barcelona (España): Masson, S.A. 1998.
- Fu B, Xue J, Li Z, Shi X, Jiang BH, Fang J. Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 α through reducing hypoxia-inducible factor-1 α stability and inhibiting its protein synthesis. Molecular Cancer Therapeutics 2007; 6: 220-226.
- Ganeshpurkar A, Rai G, Jain AP. Medicinal mushrooms: Towards a new horizon. Pharmacogn Rev 2010; 4 (8): 127-135.
- Gao Y, Zhou SF, Chen G, Dai X, Ye J. A Phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* extract (Ganopoly) in patients with advanced cancer. Int J Med Mushr 2002; 4: 207-214.

Referencias Bibliográficas

- Gao Y, Zhou SF. Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr) Lloyd (Aphyllophoromycetideae). Part I. Preclinical and clinical studies (review). *Int J Med Mushr* 2004; 6 (2): 95-106.
- García N. Producción de Setas Comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos del café y del cacao. [Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Biotecnología]. Universidad de Oriente. 1999.
- García N, Bermúdez RC, Gross P, Hernandez M. Cultivo de setas de *Pleurotus* sp. sobre pulpa de café. *Revista Mexicana de Micología* 2006; 23:99-101.
- García N. Producción de Setas Comestibles y Enzimas Lacasas por Fermentación en Estado Sólido de la Pulpa de Café con *Pleurotus* spp. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. 2008.
- Garza L, Ramírez X, Garza F, Salinas M, Waksman N, Alcaraz Y, Torres O. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencia UANL* 2006; IX (2).
- Gibson JE, Taylor DA. Can claims, misleading information, and manufacturing issues regarding Dietary Supplements be improved in the United States? Perspectives in Pharmacology in *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 314 (3): 939-944.
- Gregori A, Vagel M, Pohleven J. Cultivation of *Pleurotus* spp, *Food Technol. Biotechnol* 2007; 45 (3): 238-249.
- Guía Metodológica para la Investigación en Plantas Medicinales. La Habana, Cuba. MINSAP. 1997.
- Gunde-Cimerman N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *Int. J. Med. Mush.* 1999; 1: 69-80.
- Guzmán G, Mata G, Salmones D, Soto-Velazco C, Guzmán L. El Cultivo de los Hongos Comestibles. Veracruz: Instituto Politécnico Nacional. 1993.
- Haase H, Rink L. The immune system and the impact of zinc during aging. *Immunity and Ageing*. 2009; 6: 9.
- Harada T, Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. Effect of SSG, 1,3- β -glucan from *Sparassis crispa* on hematopoietic response in cyclophosphamide induce leukopenic mice. *Biol Pharm Bull* 2002; 25 (7): 931-939.
- Heys SD, Schofield AC, Wahle KW. Immunonutrition in clinical practice: what is the current evidence? *NutrHosp* 2004; XIX (6): 325-332.
- Hirofumi M, Toru W, Masashi A, Noriyuki K. An alternative medicine *Agaricus blazei*, may have induced severe hepatic dys function in cancer patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2006; 36 (12): 808-810.
- Hobbs Ch. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). A literature review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2000; 2: 287-302.
- Hobbs Ch. Medicinal value of Turkey tail fungus *Trametes versicolor* (L.: Fr) pilát (Aphyllophoromycetideae). A literature review. *Int J Med Mush* 2004; 6: 195-218.

Referencias Bibliográficas

- Hobbs Ch. The Chemistry, Nutritional Value, Immunopharmacology, and Safety of the Traditional Food of Medicinal Split-Gill Fungus *Schizophyllum commune* Fr. (Schizophyllaceae). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2005; 7: 127-139.
- Hsieh TH, Kunicki J, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Effects of Extracts of *Coriolus versicolor* (T'm-Yunity) on Cell-Cycle Progression and Expression of Interleukins-1 in Promyelocytic HL-60 Leukemic Cells and Mitogenically Stimulated and Non stimulated Human Lymphocytes. J Alternative and Compl Med 2002; 8 (5): 591-602.
- ICSH. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobin cyanide reference preparation. 4th ed. J Clin Pathol 1996; 49: 271-274.
- Infante JF, Sifontes S, Muñoz E, González M, Pérez V, Baldor C, Fariñas M. Prueba Toxicológica en ratones de una sola dosis inicial y segura de la vacuna cubana antileptospirosis Vax-SPIRAL. Biotecnología Aplicada 2001; 18: 20-23.
- Ikekawa T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2001. 3: 291-298.
- Ishurd O, Zgheel F, Kermagi A, Flefla M, Elmabruk M. Antitumor Activity of β -D-Glucan from Libyan Dates. J Med Food 2004; 7 (2): 252-255.
- Iwalokun BA, Usen UA, Otunba AA, Olukoya DK. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. African Journal of Biotechnology 2007; 6(15): 1732-1739.
- Janardhanan K, George V. Ethnopharmacology and alternative medicine. Current Science, 2006; 90 (10-11): 1460-1461.
- Janardhanan K, Jose N. Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. Curr. Sci 2000; 79: 941-943.
- Janeway CA, Travers P, Walpert M, Shlomchik M. Immunobiology. 6thed. London: Garland Publishing. 2005.
- Jayakuma, T, Thomas PA, Geraldine P. *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009; 102: 28-234.
- Jose N, Ajith TA, Jananrdhanan KK. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. (Agaricomycetideae). Int. J. Med. Mush 2002; 4: 59-66.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response. Review: Immunology 2008; 123: 326-338.
- Kanazawa M, Mori Y, Yoshihara K, Iwadata M, Suzuki S, Endoh Y. Effect of DC therapy combined with chemotherapy in advanced cancer cases. Cancer Chemother 2003; 30: 1655-1660.
- Kang J, Wang HQ, Chen RY. Studies of constituents of the mycelia produced from fermented culture of *Flammulina velutipes* (W. Curt: Fr) Singer (Agaricomycetideae). Int J Med Mush 2003; 5: 391-396.

Referencias Bibliográficas

- Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Current Drug Targets: Cardiovascular and Haematological disorders* 2005; 5: 39-64.
- Kidd PM. The use of mushroom glucanos and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev* 2000; 5 (1): 4-27.
- Kikkert R, Bulder I, de Groot ER, Aarden LA, Finkelman MA. Potentiation of Toll-like receptor-induced cytokine production by (1,3)- β -D-glucans: implications for the monocyte activation test. *Journal of Endotoxin Research* 2007; 13 (3): 140-149.
- Kim YS, Maslinski W, Zheng XX, Stevens AC, Li XC, Tesch GH. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc γ 2a protein blocks delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1998; 160: 5742-5748.
- Kim HS, Hong JH, Kim Y, Han SB. Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. *IMMUNE NETWORK* 2011; 11 (4): 361-763.
- Klein SL, Nelson RJ. Sex and species differences in cell-mediated immune responses in voles. *Can. J. Zool.* 1998; 76 (7): 1394-1398.
- Kodama N, Asakawa A e Inui A. Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Oncol Rep* 2005; 13 (3): 497-502.
- Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, Konishi M, Isobe T, Murata Y. Antioxidant Activity of β -Glucan. *Pharm* 2012; 12: 58-64.
- Kues U, Liu Y. Fruiting body production in basidiomycetes. *Application Microbiology and Biotechnology* 2000; 54, 141-152.
- Kumari M, Survase SA y Singhal RS. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. *Bioresour Technol* 2008; 99: 1036-1043.
- Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara S. Green tea consumption and cognitive function: across-sectional study from the Tsurugaya Project. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 83: 355-361.
- Lagrange, P. 1991. Enhanced natural resistance against severe disseminated *Candida albicans* infection in mice treated with betafectin. *Int. J. Exp. Clin. Chemoter*, 4: 48-45.
- Lakhanpal TN, Rana M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources: characterization and utilization* 2005; 3 (2): 288-303.
- Landrault N, Pouchet P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre P. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (7): 3341-3348.
- Lazarová M, Lábaj J, Eckl P, Bogan G, Slameňová D. Effects of Dietary Intake of a Fungal β -D-Glucan Derivative on the Level of DNA Damage Induced in Primary Rat Hepatocytes by Various Carcinogens. *Nutrition and Cancer* 2006; 56 (1): 113-122.
- Lechner B, Wright JE, Albertó E. Cultivo de especies silvestres de *Pleurotus* en desechos lignocelulósicos. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica y XV Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 2003; (38): 268.
- Lesourd B. Nutrition: a major factor influencing immunity in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2004; 8:28-37.

Referencias Bibliográficas

- Li Y, Mi C. Zheng A. Proliferation inhibition and apoptosis on set in human ovarian carcinoma cell line SKVO3 induced by geniste. 2003; 22: 586-591.
- Li L, Ng TB, Song M, Yuan F, Liu ZK, Wang CL. The antioxidant effects of a polysaccharide-peptide complex (F22) from mushroom (*Pleurotus abalonus*)-fruiting bodies were studied. Applied Microbiology and Biotechnology 2007; 75 (4): 863-869.
- Liberman A. Mecanismos moleculares de acción de algunas drogas inmunosupresoras. MEDICINA (Buenos Aires) 2008; 68: 455-464.
- Liebertman H y Lachman L. Pharmaceutical Dosage Forms, Tablets. Marcel dekker : New York. USA, 1981 (2).
- Liu X, Zhou B, Lin R, Jia L, Deng P, Fan k, Wang G, Wang L, Zhang J. Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. Mycelium. Int J BiolMacrom 2010; 47: 116-119.
- Llauradó G. Propiedades inmunocéuticas del extracto hidrosoluble crudo (F-I) de setas comestibles *Pleurotus spp.* en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética. [Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Biotecnología Mención Industrial]. Universidad de Oriente. 2008.
- Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Marcos J, Beltrán y García N. Acerca de la funcionalidad de setas comestibles *Pleurotus*spp.: propiedades bioestimulantes de un extracto acuoso. Revista Cubana de Química 2005; 17: 102-107.
- Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Gutiérrez A, Fontaine R, Bermúdez RC, Perraud-Gaime I. Phytochemical screening and effects on cell-mediated immune response of *Pleurotus* fruiting bodies powder. Food and Agricultural Immunology 2012; 1-10. (<http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2012.686988>).
- Lorenzana R. Determinación de la Actividad Inmunomoduladora de dos Extractos del Hongo *Grifola frondosa* (Dicks.:FR.) S.F. Gray, Mediante Ensayos *IN VITRO*. Revista Científica, Edición Especial. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala 2009; 5 (1): 8-16.
- Lowry HO, Rosebrough A, Farr L, Randall JR. Protein measurement with the folin phenol reagent. J BiolChem1951; 193: 265-275.
- Lull C, Wichers H, Savelkoul H. Antiinflammatory and Immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators of Inflammation 2005; 2: 63-80.
- Marcos J. Aspectos regulatorios, del control y aseguramiento de la calidad de *Pleurotus*spp. como fuente de suplementos dietéticos. [Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Biotecnología]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, 2009.
- Martin KA, Markus CF, Irshad HC. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis– potential therapeutic approaches. Clinics. 2006; 61 (5).
- Martínez-Carrera D, Nava D, Sobal M, Bonilla M, Mayett Y. Marketing channels for wild and cultivated edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico. Micol Apl Int 2005; 17: 9-20.
- Mau JL, Chao GR, Wu KT. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001; 49: 5461 -5467.

Referencias Bibliográficas

- Mau J, Lin HC, Chen CC. Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. J. Agric. Food. Chem. 2002; 50: 6072-6077.
- McKenna D, K. Jones, Hughes K. Reishi Botanical Medicines. The desk reference for major Herbal Supplements. 2nd Ed. The Haworth Herbal Press: New York, London, Oxford, 2002; p.825-855
- Mc Murray JR. Plasma Proteins. En: Gowenlock AH, editor. Practical Clinical Biochemistry. Oxford: Heinemann. 1988; p. 401-35.
- Meerovich IG, Yang M, Jiang P, Hoffman RM, Gerasimenya VP, Orlov AE, Savitsky AP, Popov VO. Study of action of cyclophosphamide and extract of mycelium of *Pleurotus ostreatus* in vivo on mice, bearing melanoma B16-F0-GFP. Proceedings of the SPIE 2005; 5704: 214-221.
- Meletis ChD, Barker JE. Medicinal Mushrooms: A Selective Overview. Alternative and Complementary Therapies 2005; 11 (3): 141-145.
- Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. XVII. España: Díaz de Santos, SA. 1992.
- Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y productos naturales. Felix Varela. Ciudad de la Habana. 2001.
- Miura S, Izuta S. DNA polymerase as targets of anticancer nucleosides. Curr Drug Targets 2004; 5: 191-195.
- Miyake T, Shibamoto T. Antioxidative activities of natural compounds found in plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1997; 45: 1819-1822.
- Mizuno T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Foods and Food Ingredients. J of Japan 1996; 167: 69-85.
- Mizuno, T. Medicinal properties and clinical effects of *Agaricus blazei* Murr. (Review). Int J Med Mush 2002; 4: 299-312.
- Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). International Immunopharmacology 2007; 7: 701-24.
- Morales P, Sobal M, Bonilla M, Martínez W, Ramírez P, Tello I, Spezzia T, Lira N, De Lima R, Villa S, Montiel E, Martínez-Carrera D. Los hongos comestibles en México: recursos genéticos, biotecnología, innovación y desarrollo del sistema de producción-consumo. En: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P y Mora VM. (Eds.) "Hacia un desarrollo sostenible del Sistema de producción-Consumo de los hongos Comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI". Puebla: Colegio de Postgraduados; 2010. p. 91-108.
- Morton DB, Jennings M, Buckwel A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoye R, Westal L, Wilso AB. Refining pr Refining procedures for the administration of substances. Laboratory Animals 2001; 35: 1-41.
- Morris HJ, Marcos J, Llauro G, Lebeque Y, Fontaine R, Tamayo V. Preliminar Characterization and Radioprotective effects of aqueous extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. 17 Conf Inter Química 2002. ISBN: 959-207-0830.

Referencias Bibliográficas

- Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, Garcia N y Bermudez RC. Immunomodulating effects of the hot water extract from *Pleurotu sostreatus* mycelium on cyclofosfamide treated mice. *Micol Apl Intern* 2003; 15 (1): 7-13.
- Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauradó G y Marcos J. A note on the *in vitro* macrophage–stimulating activity of water-soluble extracts from mycelium of *Pleurotus spp.* *Food Agric Immunol* 2007; 18 (1): 31-37.
- Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC y Rodríguez S. 2011. Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus spp.* Certificado No. 23717 (Resolución 1754/2011) Ref: 2011/1337.
- Morris HJ, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, García N, Gutiérrez A. Productos inmunocéuticos derivados del hongo comestible-medicinal *Pleurotus sp.* cultivado sobre pulpa de café en Cuba. *En: Sánchez JE, Mata G. (Eds.) "Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural": El Colegio de la Frontera Sur, Instituto de Ecología, Tapachula Chiapas. ISBN 978-607-7637-73-8. (On line first). <http://200.23.34.14/sibe/#getbook:52225>. 2013a.*
- Morris HJ, Carrillo OV, Llauradó G y Bermúdez RC. Taking advantage of malnourished mice: An animal model for evaluating the immunostimulatory potential of mushroom-derived food and pharmacological products. *Micología Aplicada Internacional* 2013; 25 (1): 1-2.
- Murcia A, Martínez-Tome M, Jimenez AM, Vera AM, Honrubia M y Parras P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Prot* 2002; 65 (10): 1614-1622.
- Mycology Research Laboratories Ltd. (MRL). Noticias de Micología. 2004; 1(8).
- National Research Council. Guía para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio. 2da Ed. México, D.F: Academia Nacional de Medicina. 2002.
- Nitschke J, Modick H, Busch E, Wantoch von Rekowski R, Altenbach H-J, Mölleken H. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 2011; 127: 791-796.
- Nöthlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Vegetable Intake and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* 2007; 165 (2): 138-147.
- Nosálová V, Bobek P, Cerná S. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol Res* 2001; 50: 575-581.
- Novak M, Vervicai V. Beta-glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of immunotoxicology* 2008; 51 (1): 47-57.
- Obukowicz MG, Hummert SL. Selective COX-2 inhibition from edible plant extracts. Patente: WO0056348 (A1); 2002-06-24.
- Ochoa A, Marín J, Fernández D, Vinet Y, García Y. Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracto blando de las hojas de *Petiveria alliacea* L. *RevCub Química* 2006; XVIII (3): 78-83.

Referencias Bibliográficas

- Olufemi AE, Terry A, Kola O. Anti-leukemic and immunomodulatory effects of fungal metabolites of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus* on benzene-induced leukemia in Wistar rats. Korean J Hematol. 2012; 47 (1): 67-73.
- Ooi VEC, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharide. Int J Med Mush 1999; 1: 195-206.
- Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, Casciano F, Bagalá C. The Immune Response to Tumors as a Tool toward Immunotherapy. Clinical and Developmental Immunology 2011; 1-12.
- Patel S y Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. Biotech. 2012; 2: 1-15.
- Partos L. Mushrooms beat wheatgerm to top antioxidant slot. Publicado el 5 de sep de 2005. <http://www.decisionnewsmedia.com>. (Consulta: 7 de agosto de 2008).
- Patrabansh S y Madan M. Mineral Content of the Fruiting Bodies of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) SINGER Cultivated on Different Kinds of Biomass. Acta Biotechnol. 1999; 19 (2): 101-109.
- Paulik S, Svrcek K, Mojzisova J, Durove A, Benisek Z, Huska M. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leukocytes in mice. J Med Vet Biol 1996; 43: 129-135.
- Peláez O. El dilema de los productos naturales. La Habana, 26 de octubre de 2006. www.granma.cubaweb.cu/secciones/ciencia/ciencia353.htm - 9k (Consulta: 17 de octubre de 2008).
- Pérez L. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 2006; XL (3): 20-28.
- Petrova R, Wasser SP, Mahajna JA, Denchev CM, Nevo E. Potential Role of Medicinal Mushrooms in Breast Cancer Treatment: Current Knowledge and Future Perspectives. Int J Med Mush 2005; 7: 141-155.
- Pillet S, D'Elia M, Bernier J, Bouquegneau JM, Fournier M, Daniel G. Immunomodulatory Effects of Estradiol and Cadmium in Adult Female Rats. Toxicological Sciences 2006; 92 (2): 423-32.
- Rajarathnam S, Bano Z. Biological utilization of edible fruiting fungi. En: Arora D, Mukerji K y Math E. Ed. Handbooks of Applied Mycology. Foods and feeds 1991; 3: 241-292.
- Ren Z, Guo Z, Meydani SN, Wu D. White Button Mushroom enhances maturation of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells and their Antigen presenting function in mice. Int J Nutr 2008; 138: 544-550.
- Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. Higher Basidiomycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. Int J Med Mush 2001; 3: 361- 394.
- Ribeiro FS. Caracterización Estructural de algunos Polisacáridos presentes en la seta *Pleurotus pulmonarius* y sus Aplicaciones. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Federal Paraná, Curitiba, Brasil. 2008. p. 66.
- Rodríguez N, Jaramillo C. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Boletín Técnico No. 27. Gerencia Técnica Programa de Investigación Científica. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). Chinchiná. Caldas. Colombia 2005.

Referencias Bibliográficas

- Rodríguez S. Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus* spp. Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. 2006.
- Rout D, Mondal S, Chakraborty I, Pramanik M, Islam SS. Chemical analysis of a new (1 → 3), (1 → 6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. Carbohydr Res 2005; 340: 2533–2539.
- Rowan NJ, Smith JE, Sullivan R. Immunomodulatory activities of mushrooms glucans and polysaccharide protein complexes in animals and humans (review). Int J Med Mush 2003; 2: 95-110.
- Russell WMS and Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. Londres: Methuen.1959.
- Sales-Campos C, Ferreira A, Almeida MT, Nogueira MC. Mineral Composition of raw material, substrate and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in culture. Interciencia 2009; 34 (6): 432-36.
- Sanchez C. Mini-review: modern aspects of mushroom culture technology. Applied Microbiology and Biotechnology 2004; 64: 756-762.
- Sánchez A y Royse B. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Editorial Limusa S.A. 2002.
- Santos-Neves JC, Pereira MI, Carbonero ER, Gracher AH, Gorin AJ, Sassaki G, Iacomini M. A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. Carbohydrate Research. 2008; 343: 1456-62.
- Schaible UE, Kaufmann HE. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. Plos Med 2007; 4 (5): 115.
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. J Agric Food Chem 2003; 51: 2837-2853.
- Serrano RM. Tendencias en alimentación funcional: temas seleccionados. España. Editorial: Elsevier. 2005.
- Shankar AH. Modulacion nutricional de la función inmunitaria y de la enfermedad infecciosa. En: Bowman y Russell A. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8va ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud. 2003. p.746-761.
- Shimizu S, Kitadam H, Yokota H, Yamakawa J, Muryama T, Sugiyama K. Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* Murrill. Phytomedicine 2002; 9: 536-545.
- Sietsma J, Wessels JGH. Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. Biochimica and Biophysica Acta 1977; 496: 225-239.
- Sigarroa A. Biometría y Diseño Experimental, t1. Ciudad de La Habana: Editorial Pueblo y Educación. 1985.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual method. Am J EnolVitic1977; 28:49-55.
- Smith JE, Sullivan R, Rowan NJ. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs. Current perspectives (review). Int J Med Mush 2003; 5: 217-234.

Referencias Bibliográficas

- Sobal M, Martínez-Carreras M, Morales P, Roussos S. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of México. *Micología Aplicada Internacional* 2007; 19 (1): 15-23.
- Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3rd ed. Berkeley, CA: Ten Speed Press; 2000.
- Stott K, Mohammed C. Cultivation of the edibles and medicinal mushroom *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) S.F. Gray (Maitake)-relevance of literature to production in Australia (Review). *Int J Med Mush* 2003; 5: 199-216.
- Sullivan R. Extraction, development and chemistry of anti-cancer compounds from medicinal mushrooms. 2006; 5: 80-105.
- Sun A, Chia JS, Wang WB, Chian CP. Immunomodulating Effects of “Tien-Hsien Liquid” on Peripheral Blood Mononuclear Cells and T-Lymphocytes from Patients with Recurrent Aphthous Ulcerations. *The American J of Chinese Med* 2004; 32 (2): 221-234.
- Synytsya A, Mickova K, Jablonsky I, Slukova M y Copikova J. Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Sciences* 2008; 26 (6): 441–446.
- Synytsya A, Mickova K, Synytsya A, Jablonsky I, Spevacek J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 2009; 76: 548-556.
- Tormo R. Los hongos: generalidades (en línea). Lecciones hipertextuales de botánica, España. 1996. (Consultado 14 abril. 2007). En: <http://www.unex.es/polen/LHB/hongos/hongos0.htm>
- Takachi R, Manami I, Junko I, Norie K, Motoki I, Shizuka S. Fruit and Vegetable Intake and Risk of Total Cancer and Cardiovascular Disease- Japan Public Health Center-based Prospective Study. *American Journal of Epidemiology* 2007.
- Taylor P, Brown G, Reid D. The beta-glucan receptor, Dectin-1 is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol* 2002; 169: 3876-3882.
- Tong H, Xia F, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, Jiang R, Tian D, Sun X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology* 2009; 100: 1682-86.
- Torello C, de Souza J, Oliveira SC, Queiroz MLS. Immunohematopoietic modulation by oral β -1,3-glucan in mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* 2010; 10: 1573-79.
- Trigos A y Suárez-Medellín J. Los Hongos como alimentos funcionales y complementos alimenticios. En: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, Morales P, Mora VM (Eds.) “Hacia un desarrollo sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los hongos Comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI”. Puebla: Colegio de Postgraduados; 2010. p. 59-76.
- Trnovec T, Hrmová M. Immunomodulator polysaccharide: chemistry disposition and metabolism? *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 1993; 14: 187-198.
- Tzianabos A. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and

biologic function? Clinical Microbiological Reviews 2000; 13: 523-533.

- United States Pharmacopeia. The official compendia of estándar. Version 1.0 for Windows. Arabbs well USA. 2007. CD-Rom.
- Vacek A, Rotkyská y Bartonícková. Radioprotection of Hematopoyesis Conferred by Aqueous Extract from Clorococcal Algae (Ivastimul) Administered to Mice before Irradiation. Exp. Hematol 1990; 18: 234-237.
- Valencia G, Garín M. Propiedades Medicinales de los Hongos Comestibles. En: Resúmenes del Taller Iberoamericano de Hongos Comestibles. San Cristóbal de las Casas, Chiapas. 2010. p. 21-23.
- Vamanu E. Biological Activities of the Polysaccharides Produced in Submerged Culture of Two Edible *Pleurotus ostreatus* Mushrooms. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012; 1-8.
- Velasco V. Experiencia profesional generada en el Sistema de Producción Integral de Traspato del Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco, Ed. De México. México. 2004.
- Verkaik-Kloosterman J, McCann M, Hoekstra J, Verhagen H. Vitamins and minerals: issues associated with too low and too high population intakes. Food and Nutrition Research 2012; 56: 57-28.
- Wagnerova J, Liskova A, Navarova J. The effects of two glucan carboximetil derivatives with various substitution degrees on cyclophosphamide immunosuppression in mice. Immunopharmacol. Immunotoxicol, 1993; 15: 227-242.
- Wales J, Andreacos E, Feldmann M, Foxwell B. Target ing intracellular media tors of pattern-recognition receptor signall ing to adjuvant vaccination. Biochemical Society Transactions 2007; 35 (6).
- Wang W, Waters SJ, Macdonald JR, Roth C, Shentu S, Freeman J. Irofulven (6-hydroxymethylacylfulvene, MGI 114) induced apoptosis in human pancreatin cancer cells is mediated by ERK and JNK kinases. Anticancer Res 2002; 22: 559-64.
- Wang JC, Hu SH, Liang ZC, Yeh CJ. Optimization for the production of watersoluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 67: 775-776.
- Wang J, Wang HX. Ng T.B. A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*. Peptides 2007; 28: 560-565.
- Wang L, Ha Ch, Cheng T, Cheng S, Lian T, Wu M. Oral administration of submerged cultivated *Grifola frondosa* enhances phagocytic activity in normal mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2008; 60 (2): 237-243.
- Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms 1999; 1: 31-62.
- Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbial Biotechnol 2002; 60: 258-274.
- Wasser SP, Didukh M, Nevo E. Dietary supplements from culinary-medicinal mushrooms: A variety of regulations and safety concerns for the 21st Century. Int J Med Mush 2004; 6: 231-

248.

- Wasser SP. Shiitake (*Lentinus edodes*). Encyclopedia of Dietary Supplements, New York: Ed Marcel Decker; 2005(a). p. 653-664.
- Wasser SP. Ling Zhi. Reishi or (*Ganoderma lucidum*). Encyclopedia of Dietary Supplements New York: Ed Marcel Decker; 2005(b). p. 603-622.
- Wasser SP, Didukh M, Nevo E. Antitumor and immunomodulatory activities of medicinal mushroom polysaccharide and polysaccharide-protein complexes in animals and humans (Review). MycBalc 2005; 2: 221-250.
- Wasser SP. Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. International Journal of Medicinal Mushrooms 2010; 12: 1-16.
- Wichers H. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? Anal Bioanal Chem 2009; 395: 37-45.
- Wilment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. J BiolChem 2001; 276: 43818-43823.
- Wu TS, Shi LS y Kuo SC. Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* Triterpenes. J Nat Prod 2001; 64 (8): 1121-1122.
- Yadomae T, Ohno N. *Sparassis crispa* Fr. extract. Jp Patent No. 217543; Publ. 08.08.2000.
- Yassin M, Mahajna JA, Wasser SP. Submerged cultured mycelium extracts of higher Basidiomycetes mushrooms selectively inhibit proliferation and induce differentiation of K562 human chronic myelogenous leukemia cells. Int J Med Mush 2003; 5: 261-276.
- Yoona T, Kima T, Leea H, Shind K, Yunc Y, Moone W, Kime D, Lee K. Antitumor metastatic activity of β -glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. Int Immunoph 2008; 8: 36-42.
- Zaidman B, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushrooms modulators of molecular targets as cancer therapeutics. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 67: 453-468.
- Zeisel S. Regulation of "nutraceuticals". Science 2000; 285: 1853-1855.
- Zhang M, Cheung PC, Ooi VE, Zhang L. Evaluation of sulfated fungal beta-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. Carbohydr 2004; 339: 2297-2301.
- Zhang M, Cuia SW, Cheung PCK, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Food Science & Technology 2007; 18: 4-19.

Sitios Visitados:

- Iowa State University of Science and Technology. Normal Values-Mice En: http://www.lar.iastate.edu/index.php?option=com_content&view=artic... (Consultado 25 de Junio de 2008).

ANEXO 1



Figura. Algunos Hongos medicinales con propiedades antitumorales (Patel y Goyal, 2012).

ANEXO 2

Tabla. Listado de hongos comestibles cultivados comercialmente.

<i>Agaricus bisporus*</i>	<i>Pholiota nameko</i>
<i>Agaricus bitorquis*</i>	<i>Pleurotus citrinoplileatus</i>
<i>Agaricus blazei</i>	<i>Pleurotus cornucopiae</i>
<i>Auricularia auricula</i>	<i>Pleurotus cystidiosus</i>
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	<i>Pleurotus djamor</i>
<i>Auricularia polytricha</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>
<i>Coprimus comatus</i>	<i>Pleurotus florida</i>
<i>Dictyophora duplicata</i>	<i>Pleurotus ostreatus*</i>
<i>Dictyophora indusiata</i>	<i>Pleurotus sajur-caju</i>
<i>Flammulina velutides*</i>	<i>Stropharia rugoso-annulata</i>
<i>Grifola frondosa</i>	<i>Tremella aurantia</i>
<i>Hericium erinaceus</i>	<i>Tremella fuciformis</i>
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	<i>Volvariella displasia</i>
<i>Lentinula edodes*</i>	<i>Volvariella esculenda</i>
<i>Lyophyllum ulmarium</i>	<i>Volvariella volvacea*</i>

(*) indica producción industrial (Chang y Miles, 1997).

ANEXO 3

Tabla. Algunos productos comerciales derivados de setas comestibles.

Fuente	Productos Comerciales	Referencias Bibliográficas.
<i>Coriolus versicolor</i>	PSK ó Krestin® (Tabletas)	Stamets, 2000 Wang y col., 2008
<i>Lentinula edodes</i>	Solución, cápsulas, tinturas y tabletas.	Stamets, 2000, Wasser, 2005 (a)
Combinación de <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Lentinula edodes</i> .	Triton® (Tabletas y cápsulas).	Mycology Research Laboratories Ltd., 2004 Hirofumi y col., 2006
<i>Cordyceps sinensis</i>	Tien-Hsien (Solución)	Sun y col., 2004
<i>Grifola frondosa</i>	Maitake® (Cápsulas)	Wang y col., 2008
<i>Ganoderma lucidum</i>	Extractos, té, siropes, vinos, concentrados	Hobbs, 2000 McKenna y col., 2002
<i>Schizophyllum commune</i>	Esquisofilano®	Wasser, 2005 (a) Wang y col., 2008

ANEXO 4

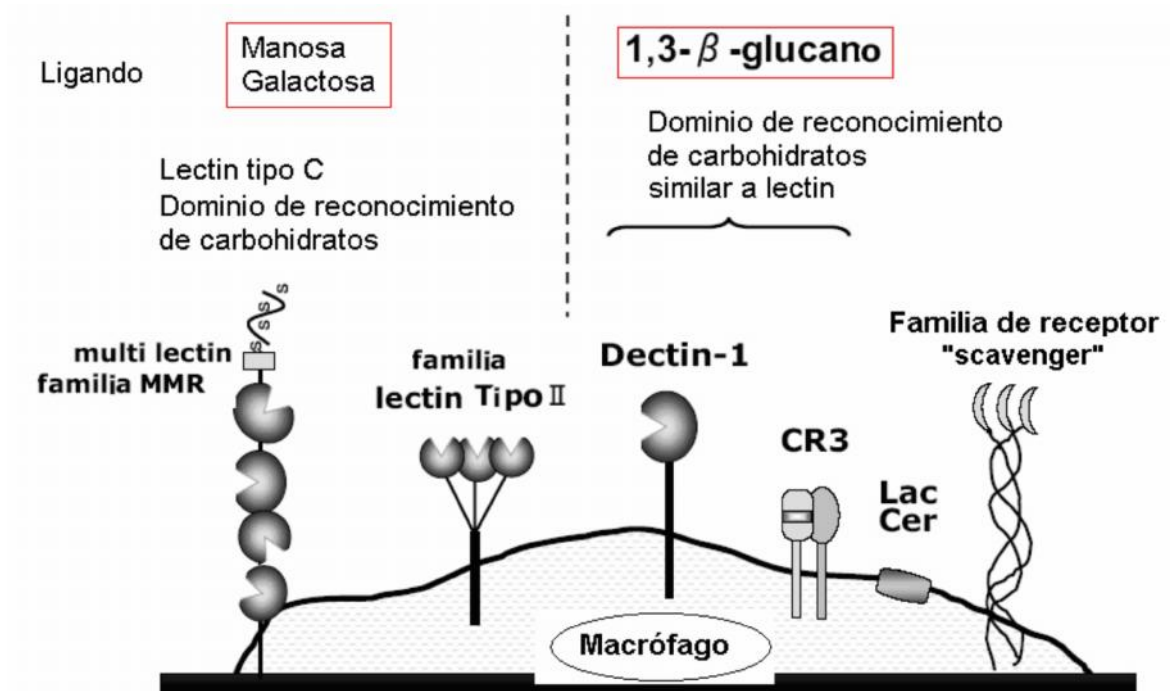


Figura. Receptores de reconocimiento de patrones en fagocitos para carbohidratos provenientes de hongos (modificado de Adachi y Ohno, 2006).

ANEXO 5

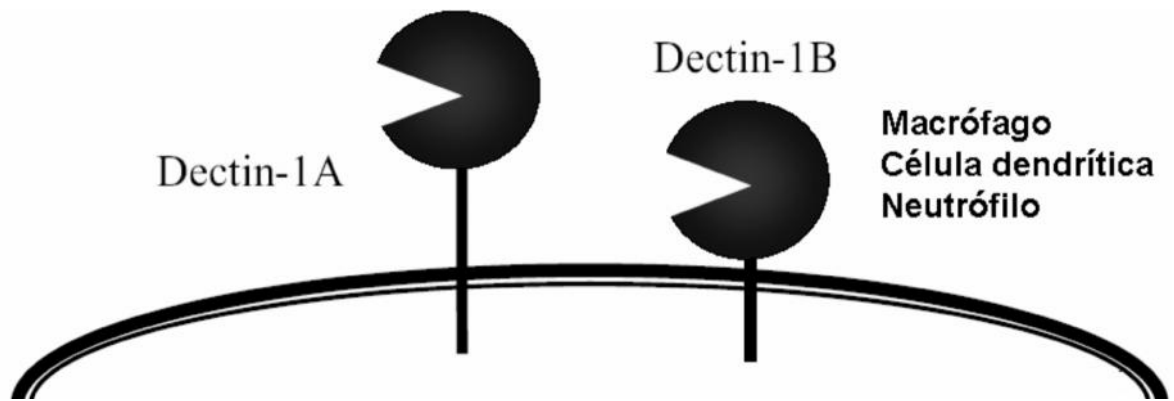
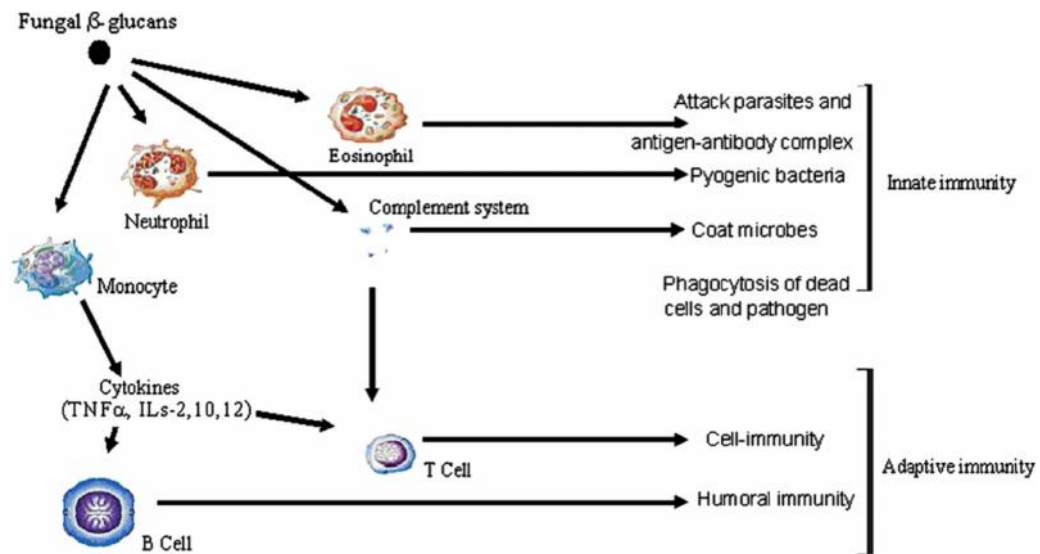


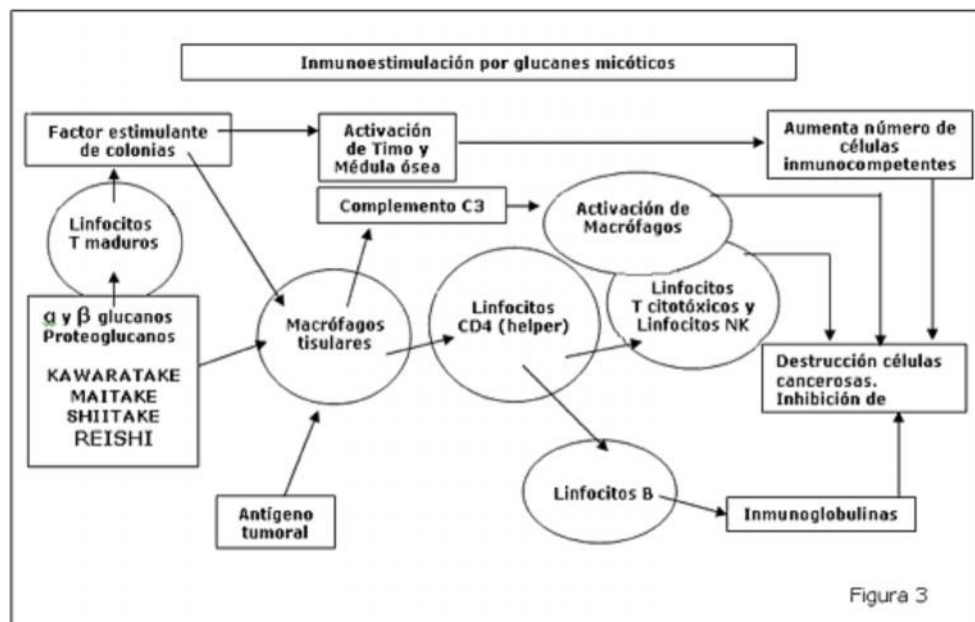
Figura. Receptor Dectin-1 (modificado de Willment y col., 2001).

ANEXO 6



Esquema. Inmunostimulación por B-glucanos fúngicos (Chen y Serviour, 2007).

ANEXO 7



Esquema: Mecanismo de acción de β -glucanos propuesto para los hongos medicinales (Wasser y Weis, 1999).

Leyenda:

Kawaratake: *Coriolus versicolor*
 Maitake: *Grifola frondosa*
 Shiitake: *Lentinula edodes*
 Reishi: *Ganoderma lucidum*

ANEXO 88



Figuras. Diferentes suplementos dietéticos inmunocéuticos elaborados, fundamentalmente, con β -glucanos de setas comestibles-medicinales.

ANEXO 9



a- Laboratorio TOXIMED.



b- Laboratorio de Inmunología CEBI.



c- Planta de investigación-producción de setas comestibles CEBI.



d- Laboratorio de Microbiología CEBI.

Fotos: Áreas donde se desarrolló el Trabajo Experimental.

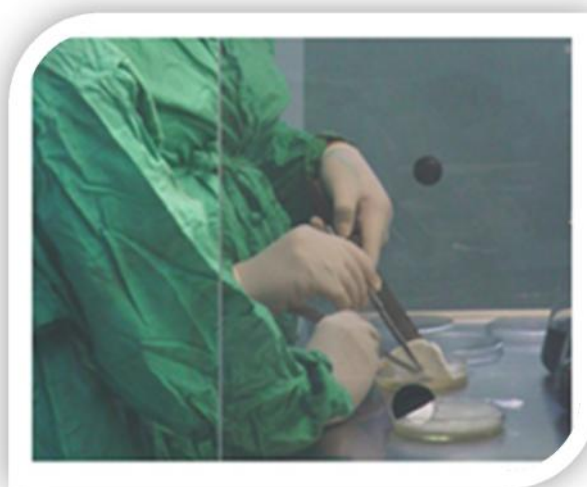
ANEXO 10



A: Micelio crecido en placas Petri.



B: Separación del micelio adherido al medio.



C: Recuperación del micelio.

Fotos. Etapas de obtención del micelio para elaborar los inóculos usados en la producción de *Pleurotus* sp. (CCEBI). 3024), por FES.

ANEXO

Tabla. Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEBI para la obtención de la materia prima (cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.), del suplemento nutricional.

No.	Procedimiento Normalizado de Trabajo	Código	No. Págs.
1	Inoculación de la cepa de <i>Pleurotus</i> sp. (CCEBI-3024) en placas Petri.	CEBI/PT/01/03	4
2	Inoculación de la cepa en tubos de ensayo.	CEBI/HC/PT/01	8
3	Reglas de Bioseguridad en el proceso de cultivo de <i>Pleurotus</i> sp.	CEBI/HC/PT/02	7
4	Obtención de Inóculos.	CEBI/HC/PT/03	7
5	Selección del Sustrato.	CEBI/HC/PT/04	4
6	Tratamiento del Sustrato.	CEBI/HC/PT/05	5
7	Siembra del Sustrato Seleccionado.	CEBI/HC/PT/06	5
8	Incubación del Sustrato.	CEBI/HC/PT/07	5
9	Fructificación de las Setas.	CEBI/HC/PT/08	5
10	Cosecha.	CEBI/HC/PT/09	5

ANEXO 12



a- Fragmentación de las setas



b- Secado o deshidratación



c- Setas secas



d- Polvo de Pleurotus

Fotos. Proceso de obtención de la biomasa seca y pulverizada de *Pleurotus* sp..

ANEXO 13



Fotos. Suplemento Nutricional de *Pleurotus* sp. (Tabletas 500 mg)