



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



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

Propiedades inmunocéuticas del extracto hidrosoluble crudo (F-I) de setas comestibles *Pleurotus spp.* en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética.

**Autor: Lic. Gabriel Llauradó Maury**

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

**Santiago de Cuba  
2008  
Año 50 de la Revolución**

*Dedicado a  
A mi esposa e hija*

### ***Agradecimientos:***

- *En primer lugar quisiera agradecer a mi tutor DrC. Humberto Joaquín Morris Quevedo, por su constante aporte a mi formación profesional, ya sea como profesor e investigador, pero sobre todo, por su incondicionalidad como amigo.*
- *A mi tutora Dra.C. Rosa Catalina Bermúdez Savón. por sus grandes consejos científicos y sus recomendaciones en esta temática.*
- *A las personas que han contribuido con mucha dedicación a la obtención de estos resultados, Migdalia, Nora, Suyén, Isabel, Yaixa, Jane, Miguel, pero especialmente a Yamila y Roberto.*
- *A todos los trabajadores del CEBI, especialmente a los integrantes del grupo de las descargas.*
- *Al claustro de profesores de la Maestría en Biotecnología, especialmente los profesores pertenecientes al CEBI.*
- *A todas las personas que colaboraron en este trabajo, pertenecientes a otras instituciones (TOXIMED, Hospital Oncológico).*

## Resumen

Se evaluaron las propiedades inmunocéuticas de un extracto acuoso (F-I), obtenido de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp, por extracción a bajas temperaturas, en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética (MPE) inducida por restricción dietética. En la composición del extracto se destaca la presencia mayoritaria de carbohidratos y proteínas con valores de 43% y 35%, respectivamente. El tamizaje fitoquímico realizado a F-I evidenció, además, la existencia de diferentes metabolitos con posible actividad biológica. F-I se administró por vía oral en dosis diarias de 100 mg/kg a ratones Balb/c hembras de 8 semanas (18-20 g de peso) durante un período de repleción de 8 días, como suplemento de la dieta convencional para la especie. En las ratones malnutridos tratados con F-I se apreciaron efectos bioestimulantes a nivel del metabolismo proteico hepático y en la recuperación de la integridad y procesos de recambio celular en la mucosa intestinal. La administración oral de F-I conllevó a un incremento en el conteo de leucocitos totales en sangre periférica, en el número de células residentes en la cavidad peritoneal y estimuló además, el sistema monocito-macrófago, reflejado en un aclaramiento más rápido de las partículas de carbón coloidal. Se demostró también una estimulación de la respuesta inmune específica en los ratones que recibieron como suplemento F-I, caracterizada por una adecuada respuesta de anticuerpos frente a antígenos timo-dependiente (eritrocitos de carnero) y timo-independiente (LPS), y la recuperación de la capacidad de respuesta celular. Las propiedades inmunocéuticas de F-I podrían sustentar sus aplicaciones potenciales en sectores relacionados con los alimentos funcionales y/o la nutrición farmacológica.

## **Abstract**

The immunocutical properties of an aqueous extract (F-I), obtained from the fruiting bodies of *Pleurotus spp.* by extraction at low temperatures, were evaluated in an experimental biomodel of protein-energy malnutrition (PEM) induced by dietary restriction. The composition of the extract, for the most part was characterized for the presence of carbohydrates and proteins, with values of the 43% and 35%, respectively. The phytochemical screening of F-I was administered daily by the oral route at doses of 100 mg/kg to female Balb/c mice of 8 weeks (weighing 18-20g) during a repletion period of 8 days, as a supplement of the conventional diet. Malnourished mice treated with F-I showed biostimulating effects at the level of liver protein metabolism and in the restoration of integrity and cell recharge processes in gut mucosa. F-I administration led to an increasing in leukocyte counts in peripheral blood, in the number of peritoneal exudates cells, and also stimulated the monocyte-macrophage system as judged by the increased carbon clearance. An enhancement of specific immune response in mice supplemented with F-I was also observed, in terms of an appropriate t-dependent (sheep red blood cells) and t-independent (LPS) antibody responses, and the restoration of the cellular response. The immunocutical effects F-I would support its potential application in fields related to functional foods and the pharmacological nutrition.

## Índice

- <b>Introducción</b> .....	1
- <b>Capítulo 1. Revisión Bibliográfica</b> .....	3
1.1 Alimentos funcionales, nutracéuticos e inmunocéuticos: Nuevos enfoques en el área de la nutrición humana.....	3
1.2 Aspectos generales sobre los basidiomicetos.....	5
1.2.1 Antecedentes históricos de la utilización de setas comestibles. Producción a escala mundial .....	5
1.3 Género <i>Pleurotus spp.</i> .....	6
1.3.1 Propiedades nutricionales.....	7
1.3.2 Aplicaciones biotecnológicas potenciales.....	7
1.4 Propiedades medicinales de las setas comestibles. ....	8
1.4.1 Efectos inmunomoduladores y antitumorales de polisacáridos extraídos de hongos comestibles.....	8
1.4.2 Otros compuestos inmunomoduladores y antitumorales derivados de las setas comestibles.....	11
1.4.3 Otros efectos terapéuticos.....	12
1.4.4 Preparaciones comerciales derivadas de setas comestibles.....	12
1.5 Fisiopatología de la malnutrición proteico-energética (MPE). Afectaciones en el sistema inmune.....	12
1.5.1 Inmunonutrición con setas comestibles.....	15
- <b>Capítulo 2. Materiales y Métodos</b> .....	16
2.1 Microorganismo utilizado.....	16
2.2 Obtención y caracterización del extracto acuoso de <i>Pleurotus spp.</i> (F-I).....	16
2.2.1 Determinación de los componentes macromoleculares presentes en F-I.....	16
2.2.1.1 Determinación de nucleótidos totales.....	16
2.2.1.2 Determinación de la concentración de proteínas.....	16
2.2.1.3 Determinación de carbohidratos totales.....	16
2.2.2 Tamizaje fitoquímico de F-I.....	17
2.2.3 Evaluación de la actividad enzimática lacasa de F-I.....	17
2.2.4 Determinación de endotoxinas en F-I.....	17
2.3 Animales y dietas .....	17
2.3.1 Diseño experimental.....	17
2.4 Determinación de parámetros hematológicos.....	18
2.5 Concentración de proteínas séricas totales.....	18
2.6 Evaluaciones bioquímicas en sistema digestivo.....	18
2.6.1 Contenido de proteínas totales en hígado.....	18
2.6.2 Determinaciones bioquímicas en intestino delgado.....	18
2.7 Evaluación de la inmunidad innata.....	18
2.7.1 Celularidad en el exudado peritoneal.....	18
2.7.2 Actividad fagocítica de células de Kupffer y macrófagos esplénicos. ....	19
2.7.3 Celularidad del bazo.....	19
2.8 Evaluación de la inmunidad específica.....	19
2.8.1 Evaluación de la inmunidad humoral.....	19

2.8.2 Evaluación de la inmunidad celular.....	20
2.9 Análisis macroscópico de los órganos y determinación del peso relativo.....	21
2.10 Análisis estadístico.....	21
<b>-Capítulo 3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>22</b>
3.1 Caracterización bioquímica del extracto F-I y relación con sus propiedades medicinales potenciales.....	22
3.2 Propiedades inmunocéuticas de F-I en un biomodelo experimental de malnutrición proteico energética.....	25
3.2.1 Evaluaciones bioquímicas en suero y sistema digestivo.....	26
3.2.2 Evaluación de la inmunidad innata y adaptativa.....	28
<b>- Conclusiones.....</b>	<b>34</b>
<b>- Recomendaciones.....</b>	<b>35</b>
<b>- Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>36</b>

## **Leyenda:**

- **A3HA:** Ácido 3-hidroxiantranílico.
- **BRMs:** Modificadores de la respuesta biológica.
- **BSA:** Seroalbúmina bovina.
- **F-I:** Extracto hidrosoluble crudo de *Pleurotus spp.*
- **GALT:** Sistema inmune asociado a mucosas
- **HDPs:** Potenciadores de la respuesta del huésped.
- **HR:** Hipersensibilidad retardada.
- **LPS:** Lipopolisacárido.
- **M:** Grupo malnutrido.
- **M-DC:** Grupo malnutrido + dieta convencional.
- **M-(F-I):** Grupo malnutrido + extracto hidrosoluble crudo.
- **MPE:** Malnutrición proteico-energética.
- **NK:** Natural killer.
- **SSTF:** Solución salina tamponada con fosfato

La ingesta insuficiente de nutrientes indispensables para la salud provoca trastornos al organismo, específicamente el padecimiento de ciertas enfermedades o el deterioro de algunas funciones vitales. En este sentido, se conoce que importantes sistemas del organismo como el endocrino, digestivo y el inmune son severamente afectados en personas que padecen algún tipo de malnutrición.

Un aspecto muy estudiado en las últimas décadas del siglo pasado, fue la relación entre el estado nutricional y el sistema inmune. Tal importancia está motivada por el hecho de que una amplia variedad de nutrientes esenciales para garantizar una adecuada salud, tienen un impacto sobre la inmunocompetencia. Los defectos en uno o más de los componentes del sistema inmunitario pueden provocar enfermedades graves, y a menudo mortales, que se denominan colectivamente *Inmunodeficiencias* (Keusch, 2003).

Las personas inmunocomprometidas por desnutrición suelen ser más susceptibles a infecciones, y por tanto a contraer con mayor facilidad distintas enfermedades. En tal sentido, diferentes estudios postulan un fundamento centrado en el mecanismo de los efectos debilitantes de la malnutrición sobre la inmunidad y los efectos de la infección sobre la malnutrición (Keusch, 2003).

La malnutrición no es un problema restringido solamente a países pobres, sino también se presenta en países desarrollados, especialmente en ancianos, personas con desórdenes alimentarios, individuos alcohólicos, así como resultado de sepsis severas, traumas y en pacientes posquirúrgicos con heridas infectadas, entre otros (Albers *et al*, 2005).

La creciente preocupación 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 o lenguaje entre tejidos, la defensa inmunológica y el mantenimiento de la integridad de los órganos. Se trata de una nueva 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 las diversos procesos del organismo (Serrano *et al*, 2005).

En este novedoso panorama de la alimentación y nutrición, la funcionalidad de los alimentos es un concepto atractivo que invita a investigar la potencialidad de los nutrientes con fines «saludables», e incluso terapéuticos.

Hoy día se conocen numerosas fuentes naturales con elevado valor nutritivo, que también pueden causar efectos fisiológicos modulando los sistemas inmune, nervioso y endocrino, como es el caso de las setas comestibles. Se valora que el número aproximado de setas en el planeta es de 140 000, de los cuales solo el 10 % es conocido. De esta amplia variedad, sólo el 50 % de las setas conocidas se considera comestible, y se estiman alrededor de 700 especies con propiedades farmacológicas (Wasser y Weis, 1999; Reshtnikov *et al*, 2001).

Diferentes estudios científicos han evidenciado la presencia de ciertos componentes en las setas comestibles que exhiben diversos efectos biológicos, particularmente propiedades inmunomoduladoras. Estos componentes bioactivos, presentes también en los extractos, han

sido ensayados en biomodelos de inmunodeficiencias secundarias inducidas por tratamiento con citostáticos, mostrando resultados positivos (Wasser *et al*, 2005).

Entre los géneros más conocidos de setas comestibles se encuentra *Pleurotus spp.*, perteneciente a la clase de hongos Basidiomicetos. La mayor parte de las investigaciones realizadas en este género tienen carácter estrictamente nutricional (no refiriéndose en la literatura consultada hasta la fecha estudios en biomodelos experimentales de malnutrición o restricción dietética), y sólo algunas han estado dirigidas a la evaluación de su capacidad inmunomoduladora. Estos antecedentes nos permitieron formular la siguiente hipótesis de trabajo:

“Si en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética, la hemopoyesis, los eventos de síntesis celular en órganos del sistema digestivo y la respuesta inmunitaria, son estimulados como resultado de la administración oral de un extracto acuoso de setas comestibles *Pleurotus spp.* a diferencia de experimentos controles sin dicho suplemento, siendo ésta la única condición diferente, entonces el extracto tiene propiedades inmunocéuticas capaces de modular las alteraciones asociadas a un estado de malnutrición”.

A partir de esta hipótesis, el trabajo tuvo como objetivo general:

- Evaluar las propiedades inmunocéuticas de un extracto acuoso de *Pleurotus spp* (F-I) en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética.

Para cumplimentar este objetivo general, se trazaron los siguientes objetivos específicos:

- Realizar un tamizaje fitoquímico para identificar las posibles estructuras con actividad biológica presentes en cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.*
- Determinar el efecto de la administración oral de F-I sobre parámetros bioquímicos en suero y sistema digestivo en un biomodelo de malnutrición proteico-energética.
- Evaluar la actividad inmunomoduladora de F-I sobre la inmunidad innata y adaptativa durante la recuperación de la malnutrición, a través de ensayos de estimulación del sistema monocito-macrófago y el estudio de las respuestas de anticuerpos y mediada por células, inducidas con antígeno modelo.

### **1.1- Alimentos funcionales, nutracéuticos e inmunocéuticos: Nuevos enfoques en el área de la nutrición humana.**

La tendencia mundial en el área de la alimentación indica en los últimos años un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además de su valor nutritivo aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano, al ayudar a prevenir enfermedades, o bien al aumentar la resistencia contra ellas (Zaldívar *et al*, 2004). De modo que aunque la relación entre la dieta y la salud fue reconocida por la medicina china hacia el año 1,000 A. de C. y con la frase "deja que los alimentos sean tu medicina y que la medicina sean tus alimentos", propuesta por Hipócrates hace casi 2,500 años, actualmente existe una renovada atención en este campo (Alvídrez *et al*, 2002). Estas variaciones en los patrones de alimentación han generado un área nueva de desarrollo en las ciencias de los alimentos y la nutrición.

Con el desarrollo tecnológico experimentado en las ciencias de los alimentos, muchos tipos de componentes alimenticios novedosos fueron revelados a la luz pública. A partir de este momento la comunidad científica interesada en el área de la salud, empezó a estudiar los efectos fisiológicos de dichos componentes en biomodelos experimentales. Los ingredientes de alimentos o sus derivados que ocasionaron algún efecto fisiológico durante su evaluación, fueron refinados y purificados, y progresivamente fueron convertidos en medicinas (Bowman y Russell, 2003).

La atención se centró en los componentes que demostraron su efectividad, aunque fuera en una pequeña cantidad, sobre enfermedades crónicas como: osteoporosis, anemia, estreñimiento, disfunciones cardiovasculares, y en aquellos capaces de reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. Se reconoció de este modo que la presencia de compuestos bioactivos en los alimentos tenía alguna "funcionalidad" para la salud (Alvídrez *et al*, 2002). Muchos de estos nutrientes son precursores de macromoléculas indispensables para el crecimiento y la proliferación celular, para la señalización o "lenguaje" entre los tejidos, para la defensa inmunológica y para el mantenimiento de la integridad de los órganos (Bello, 2000).

La idea de los *alimentos funcionales* o *nutracéuticos*, atrajo el interés de las industrias alimentaria y farmacéutica, enfocadas en la búsqueda de productos con un valor adicional. El origen de este neologismo inglés que ha disipado la línea de separación entre la alimentación y la medicina, se halla en la contracción de los términos *nutrition* y *pharmaceuticals*. Los alimentos funcionales o nutracéuticos constituyen hoy día el segmento de la industria alimentaria de mayor crecimiento. (Van Binsbergen, 1999).

Por su carácter relativamente reciente, el término de alimentos funcionales no tiene una definición única internacionalmente establecida, de manera que diferentes organizaciones lo definen con ciertas variaciones. Este término fue propuesto por primera vez en Japón, con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU) y referido a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan un papel específico en las funciones del organismo humano, más allá de su contenido nutricional (Alvídrez, *et al* 2002). En México, aunque el término de alimentos funcionales se utiliza familiarmente entre la comunidad científica, hasta la fecha no hay leyes que reglamenten específicamente el uso de estos alimentos (Alvídrez *et al*, 2002).

En sentido general, los nutricionistas definen un alimento funcional como: aquellos que además de nutrir tienen, beneficios fisiológicos adicionales, tales como proteger la salud, estimular funciones físicas o mentales, prevenir algunos síndromes crónicos y contribuir al tratamiento de algunas enfermedades.

En algunos países, como los Estados Unidos, 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 y aceptado por los nutricionistas. Los términos nutraceuticos, nutriceuticos (Wasser y Weis, 1999) y más recientemente *immunocéuticos*, son reconocidos y empleados por la comunidad científica, pero no se encuentran recogidos en ninguna regulación legal (Wasser *et al*, 2004; Petrova *et al*, 2005).

El concepto de nutriceutico 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).

Estas definiciones no establecen restricciones para la naturaleza de aquellos compuestos bioactivos que ejercen los efectos fisiológicos. De ahí que los componentes funcionales de los alimentos puedan ser: macronutrientes (ej. ácidos grasos  $\omega$ -3), micronutrientes esenciales (ej. minerales específicos), compuestos no esenciales con valor nutritivo (ej. oligosacáridos) y compuestos no esenciales que carecen de valor nutritivo (ej. moléculas antioxidantes) (Zaldívar *et al*, 2004).

Japón y los Estados Unidos son los países que encabezan el mercado internacional de los alimentos funcionales y nutriceuticos, con aproximadamente más de 2000 productos disponibles en el mercado mundial (Paul Yamaguchi & Associates, Tarrytown, NY, 2005).

En nuestro país el mercado de los suplementos nutricionales ha sido poco explorado. Entre los productos que se comercializan figuran, los comprimidos de *Spirulina* y Jalea Real, así como el Trofin y el Vimang (Programa Nacional de Desarrollo de Productos Biotecnológicos, Farmacéuticos y de Medicina Verde).

El resurgimiento del interés en los productos naturales para el tratamiento de varios desórdenes fisiológicos ha potenciado el estudio de los hongos comestibles. En este sentido, el reconocimiento de numerosos compuestos modificadores de la respuesta biológica (BRMs, del inglés Biological Response Modifiers) en las setas comestibles, conllevó a que fuese acuñado el término de *setas nutriceuticas* (Chang y Buswell, 1996, 2003; Wasser *et al*, 2004). 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, comprimidos y no como un alimento y poseen un alto valor terapéutico potencial (Wasser *et al*, 2005).

Diferentes tipos de productos (formulados a partir de hongos comestibles-medicinales) se hallan disponibles en el mercado e incluyen, entre otros:

- Polvos y extractos acuosos, hidroalcohólicos y concentrados de cuerpos fructíferos cultivados artificialmente.
- Preparaciones secas y pulverizadas, con mezcla de sustratos sólidos, micelio y primordio.
- Extractos de micelio obtenidos por cultivo sumergido en medio líquido.
- Tabletas y cápsulas de cuerpos fructíferos de hongos crecidos en ambientes naturales (Wasser, *et al*; 2004).

Dentro de estos productos, el uso como suplementos dietéticos de extractos de hongos medicinales, derivados del micelio y los cuerpos fructíferos, ha ganado gran popularidad en el mundo (Chang y Buswell, 2003). Como será abordado en otros acápite, muchos de estos preparados poseen una acción estimuladora del sistema inmune, demostrado en estudios clínicos y en modelos animales, por los que han recibido la denominación de “inmunocéuticos”.

Los cambios que se están produciendo en las concepciones esenciales de la nutrición humana, y particularmente en el campo de la Nutrición Farmacológica constituyen una verdadera revolución científica y conducirán en el futuro al aprovechamiento máximo de las posibilidades terapéuticas existentes en los alimentos. El consumo de setas comestibles forma parte de estilos de vida saludables y necesarios, ya sea en virtud de sus nutrientes convencionales, como de sus compuestos bioactivos. Al respecto, la comprensión científica de cómo los preparados nutricéuticos e inmunocéuticos formulados a partir de setas comestibles, entre los que se destacan los extractos, ejercen efectos fisiológicos específicos apenas está en sus inicios y obviamente, queda mucho aún por estudiar en este campo.

## **1.2 Aspectos generales sobre los basidiomicetos.**

### **1.2.1- Antecedentes históricos de la utilización de setas comestibles. Producción a escala mundial.**

Desde épocas primitivas la humanidad ha considerado las setas comestibles como una clase especial de alimento. En la antigua Grecia se consideraba que las setas proporcionaban fuerza a los guerreros y los romanos las denominaban “el alimento de los dioses”. Durante siglos los chinos atesoraban las setas como un alimento saludable, y los llamaban “el elixir de la vida” (Chang y Buswell, 1996).

Su conocimiento y uso fue muy importante en las culturas prehispánicas, sobre todo en las mesoamericanas y sudamericanas. El texto de Lucía Rojas de Perdomo, "*Cocina prehispánica*" (1994), al comentar la cocina de los Aztecas, Incas y Muisca cita la crónica titulada "*Historia General de las Costas de Nueva España*" del fraile Bernardino Sahagún, quien relata que en el México prehispánico existía gran variedad de hongos comestibles llamados setas o xetas.

Actualmente se valora que el número aproximado de setas en el planeta es de 140 000, de los cuales solo el 10 % (14 000) es conocido. De ellas solo el 50 % se considera comestible, y se estiman alrededor de 700 especies con propiedades farmacológicas (Wasser y Weis, 1999; Reshtnikov *et al*, 2001).

Dentro de las setas comestibles-medicinales ampliamente conocidas y cultivadas, se encuentran los géneros *Lentinus*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Grifola*, *Agaricus*, *Flammulina*, *Volvariella*, entre otros. Diferentes estudios han demostrado los efectos hepatoprotectores, antitumorales, antiagregantes plaquetarios e hipoglicemiantes de ciertos polisacáridos presentes en extractos acuosos, obtenidos del micelio y cuerpos fructíferos de estos hongos (Wasser *et al.*, 2005; Garza *et al.*, 2006).

En el ámbito mundial se han cultivado aproximadamente 22 especies fúngicas, la mayoría procedentes de regiones tropicales, subtropicales y templadas, aunque solo 10 se producen a escala industrial (Martínez-Carrera, 1998).

Según la International Society for Mushroom Science de Inglaterra, en el mundo se consumen alrededor de 3 millones de toneladas de hongos de treinta especies diferentes. El mercado se encuentra segmentado en dos partes: consumo de hongos cultivados (2 millones de toneladas) y el consumo de hongos silvestres (1 millón de toneladas). Estas cifras tenderán a elevarse en la medida en que crezca la preferencia por productos saludables y por vegetales ricos en proteínas (Díaz, 2004).

En la segunda mitad del siglo XX, la tecnología de producción de hongos tuvo un enorme crecimiento. En el 2002, el valor de la producción mundial de hongos comestibles fue estimado cercano a los 20 billones de USD, casi la misma cantidad que la producción de café (Wasser, 2002; Chang y Buswell, 2003; Chang y Miles, 2004). Los principales productores mundiales son China y Estados Unidos, con una contribución de 39% y 13%, respectivamente. El resto de la producción está concentrada en Japón, Alemania, Holanda, Francia, Polonia, España y Canadá principalmente.

En la región de América Central y Latinoamérica, los principales productores son México, Brasil y Colombia; se estima que los volúmenes de producción ascienden a más o menos 47 468 mil toneladas anuales de hongos frescos. México, el mayor productor de Latinoamérica genera alrededor del 58.9% de la producción total de esa región y lo ubica como el 16mo productor a nivel mundial. El monto anual de las operaciones comerciales supera los 200 millones de dólares. Entre los principales hongos comestibles que se cultivan comercialmente en México se encuentran *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Ganoderma* y *Grifola*. (Martínez-Carrera *et al.*, 2005).

### **1.3 Género *Pleurotus* spp.**

La palabra *Pleurotus* procede del griego “pleuro”, que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo (Cardona y Cadavid, 1999).

Taxonómicamente se clasifica de la siguiente forma:

- Reino: *Hongo*
- Clase: *Basidiomycetes*
- Orden: *Agaricales*
- Familia: *Tricholomataceae*
- Género: *Pleurotus*

*Pleurotus spp.* incluye especies comestibles de alto valor económico en muchos países. Entre las numerosas especies existentes, las más conocidas son: *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. tuber regium*, *P. pulmonarius*, y *P. djamour* (Área Metropolitana del Valle de Aburrá, 2000). Además de su valor nutricional, numerosos informes refieren las propiedades medicinales de este género.

### 1.3.1- Propiedades nutricionales

Las propiedades nutritivas de la seta *Pleurotus spp.* han sido reconocidas desde hace mucho tiempo. Sus proteínas constituyen de un 19 a un 35% (base seca), las cuales contienen todos los aminoácidos esenciales en la nutrición humana (Zamora Martínez y Nieto, 1995).

En adición a su valor como alimento rico en proteína, *Pleurotus* contiene otros componentes esenciales en la alimentación, como son los carbohidratos, en particular de tipo polimérico como el glucógeno y la quitina, así como varios compuestos carbonados de bajo peso molecular (glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, entre otros). Es rico en minerales como el potasio, el fósforo y el hierro. Contienen, además una gran variedad de vitaminas, particularmente, tiamina (B1), riboflavina (B2), así como el ácido pantoténico (B3), ácido ascórbico (C) y biotina (Sánchez y Royse, 2002). En cambio los niveles de lípidos son bajos, desde menos de 1 hasta 15% y se considera que un intervalo promedio puede ser de 2-8% (Miles y ShuTing, 1997).

Por otra parte, en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con el efecto de la luz en el contenido de micosterol (precursores de la vitamina D) y la calidad proteica de su biomasa. (Bermúdez *et al*, 2002, 2003).

### 1.3.2- Aplicaciones biotecnológicas potenciales.

La mayoría de los Basidiomicetos son considerados “degradadores de la madera” porque son capaces de crecer sobre la biomasa proveniente de las plantas leñosas. Las especies de *Pleurotus* son consideradas de “pudrición blanca” porque pueden degradar materiales ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa (Sánchez y Royse, 2002).

Los hongos comestibles del género *Pleurotus*, son organismos que utilizan selectivamente la lignina para su crecimiento. Debido a que este compuesto químico actúa como una barrera para la degradación biológica de los residuos lignocelulósicos, éstos se acumulan en grandes cantidades en la naturaleza. Estas setas utilizan su sistema ligninolítico en la bioconversión de residuos agrícolas en valiosos productos para la alimentación animal. (Cohen *et al.*, 2002).

En el campo de la Biotecnología Ambiental, *P. ostreatus* ha sido utilizado en cultivo sumergido en la degradación de compuestos orgánicos como hidrocarburos policíclico aromáticos, y podría ser promisorio para solucionar problemas de derrames petroleros (Soto *et al*, 2000). Esta actividad parece estar relacionada con la producción de enzimas como la manganoso peroxidasa, y la lacasa, que es una polifenol oxidasa capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos y diaminas (Rodríguez *et al*, 2004).

En general el género *Pleurotus* se visualiza 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.

#### **1.4 Propiedades medicinales de las setas comestibles.**

##### **1.4.1- Efectos inmunomoduladores y antitumorales de polisacáridos extraídos de hongos comestibles.**

Hoy día existe una considerable atención focalizada en la efectividad de las hierbas medicinales, por su enorme popularidad como productos auto-medicables. Muchas hierbas y productos naturales, incluidas las setas, están disponibles en el mercado mundial, y aparecen fundamentalmente por tener un alto potencial en el tratamiento de cánceres progresivos.

Preparaciones tradicionales de hongos medicinales utilizadas durante miles de años, apoyan la idea de que extractos acuosos obtenidos a altas temperaturas (proceso conocido como decocción), preservan aún su actividad biológica (Hobbs, 2004). Las preparaciones comerciales derivadas de extractos acuosos obtenidos por decocción, contienen complejos polisacáridos-péptidos que pueden ser concentrados y purificados (Cui y Chisti, 2003).

Los componentes activos que poseen estos preparados se han clasificado recientemente como potenciadores de la defensa del huésped (HDPs, del inglés Human Defense Potentiators), los cuales ejercen efectos estimuladores sobre el sistema inmune (Petrova *et al*, 2005). Entre estas sustancias bioactivas encontramos fundamentalmente proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y glucoproteínas. Aunque estos compuestos son los más estudiados, hay que destacar que otros como los triterpenoides, esteroides, esteroides, enzimas, ácidos nucleicos, derivados de lípidos, etc., exhiben algunas propiedades medicinales, entre las que se encuentran los efectos inmunomoduladores (Smith, 2002; Wasser *et al*, 2005; Garza *et al*, 2006) (Wasser, 2005 (b)).

De los productos estudiados los más importantes desde el punto de vista médico han sido los polisacáridos: el lentinano (de *Lentinus edodes*), esquizofilano (de *Schizophyllum*), PSK y PSP (de *Coriolus versicolor*) y grifolano (de *Grifola frondosa*), los que han sido ensayados clínicamente. Otros se encuentran todavía en fase de estudios preclínicos (Sutherland, 1998). Estos principios activos han demostrado actividad antineoplásica e inmunomoduladora, en asociación con la quimioterapia y radioterapia (Takaku *et al*, 2001; Didukh *et al*, 2003). Muchos de los principios activos fúngicos se relacionan químicamente con la estructura polisacarídica  $\beta$ -D-glucano (es decir, polímeros de D-glucosa con otros monosacáridos) o  $\beta$ -D-glucanos enlazados a proteínas (llamados péptidos-polisacáridos). (Ishurd *et al*, 2004; Kodama *et al*, 2005).

Estos polisacáridos muestran diversas estructuras moleculares, que al compararlas con otros biopolímeros, como las proteínas y ácidos nucleicos, poseen mayor capacidad para transmitir la información biológica, al presentar una gran variabilidad estructural (Kawaguchi, 2005). Esta variabilidad asegura la flexibilidad necesaria para los precisos mecanismos reguladores de las interacciones célula-célula en los organismos superiores.

La mayoría de los  $\beta$ -D-glucanos con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras, presenta un esqueleto compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,3 con ramificaciones  $\beta$ -1,6-glucopiranosidas (Adachi *et al*, 2002; Wasser *et al*, 2005). Estos compuestos forman parte de la pared celular de los basidiomicetos y existen en los extractos en dos formas: solubles y particulados. Su conformación puede ser de triple hélice, simple hélice o de enrollamiento al azar,

y su actividad biológica e inmunofarmacológica depende de su estructura, grado de ramificación, conformación, solubilidad en agua, peso molecular, entre otros factores (Yadomae, 2000).

Numerosos informes han documentado la capacidad de los  $\beta$ -glucanos para estimular componentes celulares y humorales del sistema inmune del hospedero. Esta activación también está condicionada a la unión con receptores específicos (Smith *et al*, 2003; Rowan *et al*, 2003). Los polisacáridos extraídos de estos hongos inmunocéuticos actúan principalmente activando el sistema inmune del hospedero (Figura 1). Este proceso incluye la estimulación de células dendríticas, NK (natural killer), linfocitos CD4+, macrófagos y la producción de citoquinas (Wasser y Weis, 1999; Halpern y Millar, 2002). Estas estructuras activan también la vía alternativa del sistema del complemento (Sutherland, 1998).

Muchos  $\beta$ -glucanos previenen la oncogénesis, al mostrar actividad antitumoral sobre varios tumores singénicos y alogénicos, así como ejercen un efecto antimetastizante, no atacando directamente las células del tumor (Petrova *et al*, 2005).

De todos los hongos inmunomoduladores investigados, *Lentinus edodes* ha sido el más estudiado por sus interesantes efectos biológicos. Es la fuente de dos preparaciones, cuyas acciones farmacológicas han sido bien estudiadas: el extracto de micelio de *Lentinus edodes* (LEM) y el lentinano (Hobbs, 2000).

El Lentinano es capaz de restablecer la actividad suprimida de las células colaboradoras en tumores a su estado normal, conduciendo a la restauración de la respuesta inmune (Ooi y Liu 1999). También acelera la infiltración de eosinófilos, neutrófilos y granulocitos alrededor del tejido afectado, e incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y citoquinas por los macrófagos del peritoneo (Hobbs, 2000). El Lentinano incrementa además la citotoxicidad de los macrófagos peritoneales contra la metástasis del tumor y puede activar las vías clásica y alternativa del sistema complemento y así escindir C3 en C3a y C3b, potenciando la activación de los macrófagos (Hobbs 2000).

Otra seta de gran interés terapéutico aunque no es un hongo comestible es *Trametes versicolor*. Sus extractos acuosos han sido empleados en la medicina oriental por sus efectos medicinales, especialmente en el tratamiento del cáncer. De este hongo han sido extraídos dos compuestos: PSK (Krestin) y PSP (complejo polisacárido proteína) (Wasser, 2002). Ambos han mostrando ser efectivos en estudios preclínicos y clínicos en asociación con la quimioterapia, contra muchos tipos de cáncer (Smith *et al*; 2003). Su actividad biológica se caracteriza por la capacidad de incrementar el número de leucocitos, los niveles de  $\gamma$ -interferón, interlequina-2 (IL-2), y la inducción de la reacción de hipersensibilidad retardada, estimular la apoptosis de las células cancerígenas y disminuir significativamente los efectos adversos de la quimioterapia y radioterapia (Kanazawa *et al*, 2003). PSP También incrementa significativamente la producción de IL-1B y IL-6, mientras

que disminuye sustancialmente la producción de IL-8 en las células HL-60 de leucemia promielocítica en humanos (Hsieh *et al*, 2002).

El esquizofilano, polisacárido derivado del hongo *Schizophyllum commune* del tipo  $\beta$ - (1,3)-D-glucano, ha sido empleado en la terapia antitumoral clínica, junto con el 5-fluorouracilo, incrementando el tiempo de supervivencia de los pacientes (Wasser *et al*, 2005). Otras evidencias resaltan la activación de macrófagos (*in vitro* e *in vivo*), con un posterior aumento en la actividad de las células T (Mizuno, 1996).

Más de 300 informes han sido publicados con relación a los componentes químicos presentes en *Ganoderma lucidum* (Reishi), tanto en micelio como cuerpos fructíferos, entre los que se incluyen polisacáridos, terpenoides (ácido ganodérico) y nucleótidos (Kim y Kim, 1999; Gao *et al*, 2002; Wasser, 2005 (b)).

Numerosos estudios preclínicos han evaluado el efecto antitumoral de extractos de *Ganoderma lucidum* en una amplia variedad de tumores (Wang *et al*, 2002; Zhou *et al*, 2002). Tales extractos inhiben la metástasis e incrementan el tiempo de supervivencia en los biomodelos animales (Zhou *et al*, 2002). El “Ganopoly” (extracto acuoso de *Ganoderma lucidum*) ha mostrado efectos inmunoestimulantes en sistemas *in vitro* mediante la activación de macrófagos, linfocitos T y células NK (Gao y Zhou, 2004). Adicionalmente, Ganopoly ha sido empleado en pacientes con cánceres avanzados (Gao y Zhou, 2004). Dichos efectos inmunomoduladores son atribuidos mayoritariamente a la presencia de polisacáridos  $\beta$ -D-glucanos en el extracto (Wang *et al*, 2002; Wasser, 2005 (b)).

Por otra parte, la administración de un extracto de la seta *Sparassis crispa* vía intraperitoneal a ratones tratados con ciclofosfamida, produjo un incremento en el número de células NK, y linfocitos T en el hígado, bazo y cavidad peritoneal, así como una rápida recuperación del número de monocitos y granulocitos en dicha cavidad (Harada, *et al*, 2002).

*Grifola frondosa* (maitake) es uno de los hongos medicinales más importantes y populares. Los cuerpos fructíferos de este hongo contienen  $\beta$ -(1-3) y  $\beta$ -(1-6)-D-glucanos, en la fracción polisacáridica acuosa (Wasser y Weis, 1999; Stott y Mohammed, 2003).

La fracción polisacáridica identificada como Fracción-D, estimula la acción de los macrófagos y aumenta la citotoxicidad de las células NK y células T-citotóxicas (Tc) que atacan a las células tumorales (Kodama *et al*, 2005). También aumenta la eficiencia de las células inmunocompetentes, incrementando los niveles de interleuquinas 1, 2 y linfoquinas. Las fracciones de maitake ofrecen acciones antitumorales específicas, retardando el crecimiento de tumores de colon, pulmones, estómago, esófago y de otros órganos (Kodama *et al*, 2002).

*Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) es usado ampliamente por más de 500 000 personas para la prevención del cáncer y como adyuvante asociado al uso de fármacos quimio-terapéuticos (Takaku *et al*, 2001). Del cuerpo fructífero de este hongo comestible han sido aislados glucanos  $\beta$ -(1-3) con ramificaciones  $\beta$ -(1-6) y complejos polisacáridos-proteínas, demostrando actividad antitumoral pronunciada contra el sarcoma 180 en modelos animales (Tsuchida *et al*, 2001; Mizuno, 2002).

Una fracción homogénea (Ab-2-2n) de este hongo aislada por extracción acuosa a altas temperaturas, fue estudiada *in vitro*, exhibiendo efectos estimulantes en la proliferación de linfocitos T y B (Tsuchida *et al*, 2001; Dong *et al*, 2002). Un extracto alcohólico del micelio indujo la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y un aumento en los niveles de óxido nítrico en macrófagos (Sorimachi *et al*, 2001). Otras fracciones polisacáridicas de micelio y cuerpo fructíferos, activan la vía alternativa del sistema de complemento (Shimizu *et al*, 2002).

En otro estudio se investigó el efecto del pleurano,  $\beta$ -D glucano aislado del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* por extracción con NaOH, en el estado antioxidante y el desarrollo de lesiones precancerosas en el colon, en ratas Wistar machos. Se empleó una dieta con pleurano o celulosa al 10% y se comparó con una dieta libre de celulosa. La reducción más significativa de las lesiones precancerosas fue obtenida con la dieta del pleurano (Nosálova, 2001).

Sujatha *et al* (2005) evaluaron en modelos *in vitro* la actividad citotóxica, antioxidante y antimicrobiana de un extracto etanólico y otro acuoso de *Pleurotus sajor-caju*, *P. cystidiosus* y *P. hungarian* sobre el carcinoma de piel (KB), cervix (CasKi) y colon (HT29), mostrando que dichos extractos inhibían el crecimiento tumoral.

En un estudio realizado por Morris *et al* (2003), se evaluaron los efectos inmunomoduladores de extractos acuosos del micelio de *Pleurotus spp* en animales tratados con ciclofosfamida, y se evidenció un incremento en la actividad del sistema monocito-macrófago, reflejado en el aumento del número de células en el exudado peritoneal, la fagocitosis *in vivo* de macrófagos peritoneales y la actividad fagocítica de células de Kupffer y macrófagos esplénicos.

#### **1.4.2- Otros compuestos inmunomoduladores y antitumorales derivados de las setas comestibles.**

Si bien los polisacáridos son los compuestos bioactivos mejor conocidos de las setas comestibles, a los que se les atribuyen los principales efectos antitumorales e inmunomoduladores, otras sustancias presentes en el micelio y cuerpos fructíferos, son portadoras también de algunas de estas propiedades.

Entre estos compuestos derivados de hongos comestibles-medicinales figuran algunos metabolitos secundarios de bajo peso molecular como, lactonas, terpenoides, alcaloides, antibióticos y agentes quelantes, los cuales son importantes para la función inmune del organismo, y se utilizan por ser agentes terapéuticos contra el cáncer. (Wasser y Weiss, 1999; Petrova *et al*, 2005) (Tabla 1).

Otros componentes de gran interés terapéutico presentes en los hongos comestibles-medicinales son las enzimas, tal es el caso de la lacasa, superóxido dismutasa, glucosa oxidasa y peroxidasa. Éstas han mostrado que la enzimoterapia podría desempeñar un importante papel en diferentes condiciones clínicas, como es en el tratamiento del cáncer, prevención del estrés oxidativo, desórdenes cardiovasculares e inhibición del crecimiento celular (Osawski y Lopez, 1996; Gubareva, 1998).

### **1.4.3- Otros efectos terapéuticos**

Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales, que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos, hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y sustancias aromáticas (Brizuela, 1998).

Las propiedades antitumorales e inmunomoduladoras de sustancias obtenidas en el micelio y cuerpos fructíferos de estos hongos han sido las más estudiadas hasta la fecha. No obstante, el espectro de propiedades beneficiosas sobre la salud humana de estos compuestos bioactivos, presentes en diferentes géneros de setas comestibles, abarcan otros efectos (Tabla 2).

### **1.4.4- Preparaciones comerciales derivadas de setas comestibles**

Las preparaciones comerciales con fines terapéuticos a base de setas comestibles, se encuentran disponibles actualmente en muchos países. Algunas se presentan en diferentes formas farmacéuticas, aunque otras se expenden como suplementos alimenticios y formas menos convencionales como vinos y té (Tabla 3).

Todavía no se puede hablar de un mercado de productos obtenidos 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, establecer estrategias tecnológicas para la elaboración de la forma farmacéutica en que se administrarán, estudiar los aspectos farmacocinéticos, así como los parámetros de estabilidad y calidad de dichas formulaciones.

## **1.5 Fisiopatología de la malnutrición proteico-energética (MPE). Afectaciones en el sistema inmune.**

La malnutrición proteico-energética o malnutrición proteico-calórica se atribuye principalmente a una dieta deficiente en proteínas y/o energía, incapaz de cubrir las necesidades del propio individuo (Keusch, 2003). La MPE es en general secundaria a diferentes enfermedades y, a menudo, a la falta de rapidez por parte del personal sanitario en realizar el diagnóstico y establecer una nutrición correcta (Farreras *et al*, 2000).

La MPE puede estar causada por un aporte energético o proteico insuficiente, por una mayor pérdida de nutrientes o por el incremento de las necesidades nutricionales. La MPE puede desarrollarse de forma lenta durante una enfermedad crónica o un ayuno parcial o bien de forma rápida ante una enfermedad aguda (Candela *et al*, 2003; Shills *et al*, 2005). La fisiopatología y las consecuencias de estas dos situaciones son distintas (Farreras *et al*, 2000).

Desde un punto de vista metabólico, el paciente malnutrido presenta una reducción corporal proteica más o menos importante en función del grado de desnutrición. El compartimento proteico muscular puede estar reducido hasta un 50%. El recambio proteico se encuentra disminuido, afectándose tanto la síntesis como el catabolismo de las proteínas de síntesis hepática,

como albúmina, transferrina, ceruloplasmina, proteína de enlace ligada al retinol, fibrinógeno y diferentes factores de coagulación (Farreras *et al*, 2000; Manual Merck, 1999).

La MPE *per se*, causa diferentes alteraciones de la función gastrointestinal. A menudo se hallan comprometidas la digestión y la absorción intestinal de nutrientes, lo que dificulta la alimentación por la vía más fisiológica (vía oral). La barrera bactericida gástrica se halla comprometida, observándose atrofia de la mucosa y disminución de la secreción de hidrogeniones. Se produce una disminución de la motilidad intestinal y de las secreciones pancreática y biliar. También se produce una reducción de la secreción de IgA, con aumento de la adherencia bacteriana a la mucosa (*Escherichia coli*), favoreciendo la absorción de endotoxinas (Farreras *et al*, 2000). Todo ello, junto a las alteraciones de la respuesta inmune, hace que los pacientes malnutridos presenten una mayor incidencia de sepsis de origen intestinal y de procesos alérgicos (Manual Merck, 1999).

Puede afirmarse que ningún sistema está exento a las alteraciones causadas por la MPE. El tamaño del hígado suele reducirse, aunque también puede producirse una hepatomegalia secundaria a infiltración de grasa. Las funciones cardíaca, pulmonar y renal suelen también encontrarse afectadas por la propia MPE. (Farreras *et al*, 2000).

Las alteraciones inmunológicas y las complicaciones derivadas, son probablemente las consecuencias más importantes de la MPE. Numerosos estudios han demostrado la gran susceptibilidad de los pacientes malnutridos a la infección, teniendo en cuenta que una amplia variedad de nutrientes esenciales para garantizar una adecuada salud, tienen un impacto sobre la inmunocompetencia del huésped (Chandra, 1997; Lesourd, 2000; Calder y Kew, 2002).

Cualquier análisis de los efectos de las deficiencias nutricionales sobre la respuesta inmune debe ser llevado a cabo en el contexto de dos aspectos fundamentales. En primer lugar, debe tenerse en cuenta la heterogeneidad y complejidad de las células inmunocompetentes, sus subpoblaciones, sus sistemas inductores-reguladores y la necesaria interacción entre todos sus componentes para que la respuesta sea normal. Por otra parte, es necesario considerar que la malnutrición es un síndrome complejo y la afectación del sistema inmune puede ser el resultado de una o más deficiencias nutricionales del individuo (Sánchez, 1999).

La disfunción inmunológica asociada con malnutrición ha sido denominada síndrome de deficiencia inmune adquirida nutricionalmente (SDIAN) (Beisel, 1996), y es muy frecuentes en niños y ancianos.

Los primeros efectos de la malnutrición sobre la función inmunitaria fueron estudiados en niños que sufrían MPE. En estos casos, la integridad epitelial estaba reducida, lo que los tornaba más susceptibles a microorganismos invasores. Otros estudios documentaron una reducción de la actividad de neutrófilos. Con respecto a la inmunidad adquirida, el número de células T y B circulantes era menor, en asociación con una pérdida de la función de las células T y la disminución de las respuestas de anticuerpos (Bowman y Russell, 2003).

Los factores nutricionales inciden en el mantenimiento y desarrollo de la inmunocompetencia mediante múltiples vías y mecanismos. La MPE causa una atrofia generalizada de los tejidos linfoides, fundamentalmente en niños. El timo, el bazo, las amígdalas, las placas de Peyer y los nódulos linfáticos son seriamente afectados, con evidencias histológicas de atrofia significativa en

las áreas de linfocitos T. Por esta razón, la inmunidad celular se encuentra seriamente comprometida (Keusch, 2003). En los tejidos evaluados, las regiones B muestran menos afectación y conservan de forma general, los centros germinales ricos en linfocitos B.

Numerosos experimentos han reconocido que la respuesta inmune mediada por células y la función de los linfocitos T son las más afectadas en procesos de malnutrición proteico-energética (Lesourd, 2004). La inmunidad celular se ha estudiado en estados de MPE mediante pruebas en niños desnutridos, con pérdida de la hipersensibilidad retardada cutánea, asociada con bajos niveles de proteínas séricas totales (Chandra, 1992).

Aunque la inmunidad humoral no se afecta seriamente en la MPE, es importante tener en cuenta que la deficiencia proteica y de aminoácidos esenciales incide negativamente en la síntesis de proteínas vinculadas con los mecanismos inespecíficos y específicos de defensa del huésped (Beisel, 1991, Lesourd, 2000).

También se observó una reducción de los niveles de IgA, lo que sugiere una afectación en la inmunidad de mucosas contribuyendo al incremento de la severidad de las infecciones. Es por esto, que resulta necesario el incremento de los estudios que permitan la manipulación de elementos de la dieta con el objetivo de lograr una inmunidad en las mucosas del tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio superior (Li *et al*, 1998; Rolle *et al*, 2004).

Por otra parte, los mecanismos inespecíficos de protección del huésped incluyen la piel, las membranas mucosas, el interferón, la lisozima, el sistema complemento y la fagocitosis. Estos dos últimos actúan conjuntamente con los mecanismos inmunes específicos y funcionan mediante la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral (Lesourd, 2004).

La MPE se ha asociado con una deficiente actividad total del sistema de complemento con concentraciones reducidas de los componentes C3, C5, el factor B y la actividad hemolítica total. La función del complemento como opsonina esencial, sufre afectaciones al disminuir algunos de sus componentes así como el complemento hemolítico total en pacientes desnutridos (Sánchez, 1999).

El proceso de fagocitosis se ve desfavorecido en la MPE. Las afectaciones de la fagocitosis en la MPE se relacionan con la quimiotaxis, el reconocimiento opsónico y una deficiente capacidad bactericida, aspectos que aparecen descritos en la literatura (Chandra, 1991).

Aunque existe poca información acerca de los mecanismos que constituyen las primeras líneas de defensa del organismo, se han detectado niveles disminuidos de lisozima en plasma, saliva, lágrimas y otras secreciones, como consecuencia de su síntesis reducida y por su elevada excreción urinaria (Chandra, 1992). La deficiencia de cualquiera de los mecanismos de protección del organismo incide negativamente, en primer lugar, en la respuesta inflamatoria, lo que conlleva a un incremento en la frecuencia de infecciones por bacterias, hongos, virus y parásitos (Albers *et al*, 2005)

El tratamiento nutricional podría, mediante el empleo de substratos específicos, mejorar la situación de defensa y, por tanto, intentar disminuir las complicaciones infecciosas y sus consecuencias (disfunción multiorgánica, estancia hospitalaria, mortalidad, etc.). Este concepto es

denominado "**inmunonutrición**" (Chandra, 1991; Ortiz y Celaya, 1998), aunque, dado que su objetivo final es el de mejorar la recuperación global del organismo, podría denominarse con mayor propiedad "nutrición sistema-específica". La base de este concepto anterior estriba en el empleo de diferentes sustratos (inmunonutrientes) que estimulan la respuesta inmunitaria, que ha sido deprimida ante una situación de agresión, como los estados de malnutrición adquiridos como resultantes de sepsis severas y presentes en pacientes traumáticos y posquirúrgicos, entre otros.

Entre los sustratos reconocidos actualmente como inmunonutrientes se encuentran la arginina, glutamina, los aminoácidos de cadena ramificada, los ácidos grasos de la serie omega-3, los nucleótidos, la fibra dietética, así como también algunas vitaminas y minerales (Heys *et al*, 2004). Los aminoácidos como la arginina y glutamina, resultan imprescindibles en situaciones de alto estrés o lesión intestinal grave y de baja respuesta en las defensas del sistema inmunitario. Estamos ya, en un campo-frontera en el que la nutrición pasa el dintel del fármaco y se expone a la denominación de "nutricéutico".

### **1.5.1- Inmunonutrición con setas comestibles**

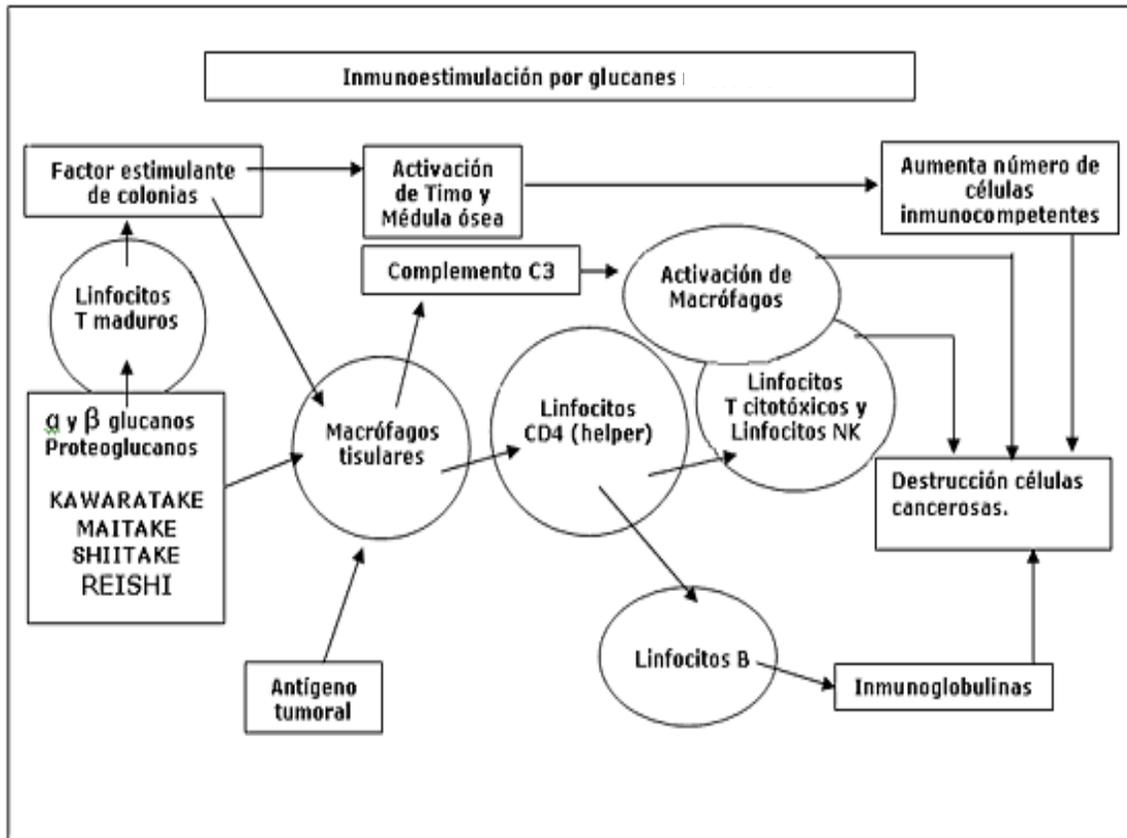
La inmunonutrición con setas comestibles podría representar una opción atractiva, tomando en cuenta la amplia gama de inmunonutrientes que estas contienen (como los ácidos grasos  $\omega$ -3), diferentes vitaminas (C, B1, B2, niacina y ácido fólico), carbohidratos, fibra dietética y proteínas como fuente de aminoácidos. Además, diversos compuestos aislados de estos hongos, como los polisacáridos (específicamente  $\beta$ -D-glucanos) han demostrado ser potentes inmunomoduladores constituyendo una herramienta útil en la terapéutica nutricional "preventiva" contra muchas enfermedades, entre ellas el cáncer (Costa *et al*, 2006).

En Asia, la alimentación con hongos ha sido ampliamente reconocida por traer aparejados beneficios nutricionales, los cuales mejoran también la función inmune del organismo. En Japón, un extracto de *Coriolus versicolor*, se utiliza para reducir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia (Hobbs, 2004).

Por otro lado, diversas investigaciones han evidenciado la actividad biológica de glucanos administrados oralmente a animales de laboratorio, lo que se atribuye a la existencia y actividad de un sistema de inmunidad mucosal, compuesto por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y al resto de los compartimentos mucosales. En estos estudios, los glucanos administrados oralmente incrementaron la supervivencia de los ratones retados con *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. (Rice *et al*, 2005).

El incremento de la producción de hongos comestibles y de los compuestos derivados de ellos, es estimulado por el hecho de que constituyen alimentos saludables, al presentar una combinación única de nutrientes, son una fuente de suplementos dietéticos y modifican la respuesta biológica del hospedero (Didukh *et al*, 2003).

Todo lo analizado, evidencia que el estudio de las afectaciones provocadas por la MPE en la respuesta inmune permitiría la manipulación nutricional de los individuos que la padecen, siendo un mecanismo que disminuiría la susceptibilidad a las infecciones en personas tan vulnerables como los ancianos y niños con bajo peso al nacer y en numerosas enfermedades crónicas.



**Figura 1: Mecanismo de acción de  $\beta$ -glucanos propuesto para los hongos medicinales. (Wasser and Weis, 1999)**

**Leyenda:**

Kawaratake: *Coriolus versicolor*

Maitake: *Grifola frondosa*

Shiitake: *Lentinus edodes*

Reishi: *Ganoderma lucidum*

Tabla 1. Otros compuestos inmunomoduladores y antitumorales derivados de las setas comestibles.

<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>Fuente</b>	<b>Acción Farmacológica</b>	<b>Tipo de tumor</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>
Triterpeno	<i>Inonotus obliquus</i>	Antitumoral	Carcino-sarcoma Walter 265	Shin <i>et al</i> , 2000
Ester del ácido fenetil cafeico (CAPE)	<i>Phellinus linteus</i> <i>Agaricus bisporus</i> <i>Lentinus edodes</i>	Antitumoral Antitumoral Antitumoral	Cáncer de mama MFC-7	Nakamura <i>et al</i> , 2003 Mattila <i>et al</i> , 2001
Ácido linoleico Ácido linolénico	<i>Agaricus bisporus</i>	Antitumoral	Cáncer de mama MFC-7	Shiuan <i>et al</i> , 2006
Ácidos ganodéricos A y C (triterpenos)	<i>Ganoderma lucidum</i>	Antitumoral		Lee <i>et al</i> , 1998

Tabla 2. Otros efectos terapéuticos de compuestos derivados de las setas comestibles.

<b>Acción Farmacológica</b>	<b>Fuente</b>	<b>Producto</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>
Cardiovascular (hipocolesterolémico, hipotensor).	<i>Pleurotus ostreatus</i> - <i>Lentinus edodes</i> - <i>Grifola frondosa</i> - <i>Ganoderma lucidum</i>	Extracto Hidro- alcohólico. Extracto acuoso	Wasser y Weis, 1999 Mizuno, 1995 Fukushima <i>et al</i> , 2001 Wasser, 2005 (b)
Hipoglicemiante	<i>Grifola frondosa</i>		Horio y Ohtsuru, 2001 Manohar <i>et al</i> , 2002

Tabla 3. Preparaciones comerciales derivadas de setas comestibles.

<b>Fuente</b>	<b>Producto comercial</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b>
<i>Coriolus versicolor</i>	Krestin®(Tabletas)	Stamets, 2000
<i>Lentinus edodes</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	Solución, cápsulas, tinturas y tabletas. Extractos, té, siropes, vinos, concentrados.	Stamets, 2000, Wasser, 2005 (a) Hobbs, 2000 McKenna <i>et al</i> , 2002
Combinación de <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Ganoderma lucidu</i> ) y <i>Lentinus edades</i> .	Triton® (Tabletas y cápsulas).	Mycology Research Laboratories Ltd. (MRL) y Gourmet Mushrooms Inc., 2004.
<i>Cordyceps sinensis</i>	Tien-Hsien (Solución)	Sun <i>et al</i> , 2004

Las investigaciones se llevaron a cabo en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.

## **2.1- Microorganismo utilizado.**

Se utilizó la cepa de *Pleurotus spp.* (CCEBI-3024), depositada en la Colección de Cultivos del CEBI. Los cuerpos fructíferos fueron obtenidos por fermentación en estado sólido utilizando como sustrato una mezcla de pulpa de café y fibras de coco, bajo las condiciones de cultivo adecuadas referidas por Bermúdez *et al* (2001).

## **2.2- Obtención y caracterización del extracto acuoso de *Pleurotus spp.* (F-I).**

Para la obtención del extracto acuoso de *Pleurotus spp.* (F-I), se utilizaron 500 g de cuerpos fructíferos, cortados en pequeñas piezas de 1 cm<sup>2</sup> a las que se adicionó 3 mL de agua destilada por cada gramo de biomasa. Se procedió luego a la extracción durante 3 horas a 20 °C con agitación continua a 150 rpm en zaranda (modelo, Mizard. 2001). La suspensión fue filtrada a través de gasa estéril y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos en centrifuga Hitachi Kokico modelo SCR 7B. El extracto resultante (F-I) fue conservado a -20°C hasta el momento de la utilización.

### **2.2.1- Determinación de los componentes macromoleculares presentes en F-I.**

#### **2.2.1.1 Determinación de nucleótidos totales.**

El contenido de nucleótidos totales, fue determinado espectrofotométricamente a través del método de Rut (1973), en función de los valores de absorbancia de los nucleótidos a 270 nm. Las lecturas fueron corregidas restando los valores de  $A_{290\text{ nm}}$ , para eliminar las interferencias causadas presentes en el extracto.

#### **2.2.1.2 Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas fue estimada por el método de Lowry *et al.* (1951). Se utilizó como sustancia patrón, seroalbúmina bovina (BSA) (BDH); se midió la  $A_{650\text{ nm}}$  y el contenido de proteína fue referido a una curva de calibración realizada con una solución de BSA de concentración igual a 1.84 mg/mL. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Ultrospec III, Pharmacia LKB.

#### **2.2.1.3 Determinación de Carbohidratos totales.**

Los carbohidratos totales en el extracto se determinaron por el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al*,1956). Se midió la  $A_{490\text{ nm}}$  y la concentración fue referida a una curva de calibración preparada con una solución de glucosa (100 µg/mL) (Fluka). La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Ultrospec III, Pharmacia LKB.

### 2.2.2- Tamizaje fitoquímico.

Se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso F-I, utilizando los ensayos descritos en la Guía Metodológica para la investigación de las plantas medicinales, empleándose tres réplicas para cada ensayo. (Guía metodológica de Salud Pública.1997).

### 2.2.3- Evaluación de la actividad enzimática lacasa.

La actividad lacasa (enzima fenol-oxidasas) se determinó por el monitoreo de la oxidación del guayacol (orto-metoxifeno) a 470 nm ( $\epsilon_0= 6740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en una mezcla de reacción que contiene 10 mmol/L de guayacol en 0,1 mol/L de tampón fosfato a pH 6, para un volumen final de reacción de 1mL (Marques de Souza y Peralta, 2003).

### 2.2.4- Determinación de endotoxinas.

El contenido de endotoxinas (LPS) en F-I, se estimó por el ensayo colorimétrico LAL (Limulus Test Chromogenix) descrito por la FDA (Food and Drug Administration, 1987), usando LPS de *E.coli*. 0113 : H10K como referencia. Los ensayos fueron realizados en la Unidad de Desarrollo del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana).

## 2.3- Animales y dietas.

En los diferentes experimentos se utilizaron ratones Balb/c, hembras de 8 semanas, con un peso corporal entre 18 y 20 g, libres de patógenos, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX<sup>®</sup>, Santiago de Cuba). En el cuidado de animales se emplearon condiciones sanitarias convencionales, y se mantuvieron a temperatura y humedad ambiental durante todo el experimento. Los animales se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial para ratones (Ratonina, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB, La Habana) con anterioridad a su distribución en los distintos tratamientos.

### 2.3.1- Diseño experimental.

Los animales fueron distribuidos de forma aleatorizada en cuatro grupos experimentales de 10 ratones cada uno. Tres de los grupos se sometieron a un régimen de restricción dietética hasta la pérdida de aproximadamente el 25% de su peso inicial con el objetivo de inducir el estado de malnutrición proteico-energética. Esta condición se alcanzó al transcurrir tres días de depleción alimentaria, se procedió luego al sacrificio de 10 animales por dislocación rápida de la cervical (Grupo Malnutrido, **M**). Los restantes animales fueron asignados de forma aleatoria a los grupos **M-DC** y **M-(F-I)**, que se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial para ratones durante un período de repleción de ocho días. A los animales de la variante **M-(F-I)** se les administró adicionalmente por vía oral, 0.2 mL del extracto acuoso de *Pleurotus spp.*, equivalente aproximadamente a una dosis de 100 mg/kg de peso. Dicha administración se realizó en las mañanas de forma diaria y a la misma hora. El peso de los animales durante la etapa de repleción fue controlado diariamente en una balanza técnica (Owa Labor). Un grupo **control**, fue alimentado con la dieta convencional durante todo el período de experimentación.

## **2.4- Determinación de parámetros hematológicos.**

Al día siguiente de culminar el período experimental, se tomaron muestras de sangre por el plexo retroorbital de cada animal empleando capilares heparinizados. La sangre fue colectada en viales que contenían una gota del anticoagulante.

Para el conteo total de leucocitos se tomaron 20  $\mu$ L de sangre, los que se añadieron en viales que contenían 0.4 mL de ácido acético al 2%. Se homogeneizó y se procedió al conteo en cámara de

Neubauer (Alemania) en microscopio óptico (Zasilacz Mikroskopowy typ TVO, Polonia). El resultado fue expresado en  $10^9$  células/L (Davidsohn y Nelson, 1985).

## **2.5 Concentración de proteínas séricas totales.**

La concentración de proteínas séricas totales se determinó por el método de Biuret (Mc Murray, 1988).

## **2.6- Evaluaciones bioquímicas en sistema digestivo.**

### **2.6.1- Contenido de proteínas totales en hígado.**

Los extractos hepáticos fueron obtenidos por homogeneización de las muestras con tampón fosfato salino 0.01 mol/L pH 7.4 (1:3 m/v) en un baño de hielo. El contenido de proteínas totales en los extractos se determinó según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### **2.6.2- Determinaciones bioquímicas en intestino delgado.**

Se tomaron segmentos de intestino delgado de aproximadamente 10 cm de longitud a partir del ligamento de Treitz o flexura duodenoyeyunal. Los segmentos fueron lavados de forma exhaustiva con tampón fosfato salino 0.01 mol/L pH 6.0 en un baño de hielo. Luego de practicar una incisión longitudinal y limpiar suavemente con gasa, se raspó la mucosa con una lámina de vidrio y se depositó el contenido en viales previamente tarados en una balanza analítica electrónica (ER-182 A, Japón), estimando así la masa de la mucosa yeyunal.

La homogeneización de la mucosa se efectuó en el propio vial con tampón fosfato salino 0.01 mol/L pH 6.0 (1:3 m/v). En los extractos se cuantificaron las concentraciones de proteínas totales por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y ADN, mediante la reacción con la difenilamina según Burton (1956).

## **2.7- Evaluación de la inmunidad innata.**

### **2.7.1- Celularidad en el exudado peritoneal.**

Al término del período de repleción y luego del sacrificio de los ratones, se inyectó por vía intraperitoneal (i.p) 5 mL de solución de Hanks. Se realizó a continuación una incisión y se

colectaron las células de la cavidad con pipeta Pasteur. La celularidad fue estimada en cámara de Neubauer (Alemania) al microscopio óptico (Zasilacz Mikroskopowy typ TVO, Polonia).

### **2.7.2- Actividad fagocítica de células de Kupffer y macrófagos esplénicos.**

Al octavo día se administró a los ratones seleccionados de los grupos M-DC y M-(F-I) por vía endovenosa (a través de la vena de la cola), 0.2 mL de una suspensión de carbón coloidal. Dicha suspensión se compone de: 3 mL de tinta negra Pelikan (Pelikan, AG, Alemania), 4 mL de solución salina y 4 mL de solución de gelatina al 3%. A los 5 minutos de la administración del carbón coloidal se tomó una alícuota de sangre de 50  $\mu$ L por el plexo retroorbital con un capilar de hematocrito heparinizado. La sangre se mezcló en un tubo de ensayo con 4 mL de carbonato de sodio al 0.1% y la concentración del carbón coloidal fue estimada por la absorbancia de la muestra a 675 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Ultrospec III, Pharmacia LKB). El aclaramiento del carbón coloidal se expresó mediante la relación de las absorbancias de los grupos M-DC y M-(F-I) a los 5 minutos de la administración de la solución de carbón coloidal, respecto a la absorbancia del grupo control.

### **2.7.3- Celularidad del bazo.**

La suspensión de células esplénicas se preparó homogeneizando suavemente el bazo con solución de Hanks helada, pasándola luego a través de una gasa antiséptica (Johnson and Johnson Medical, TX, USA). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer (Alemania) en un microscopio óptico (Zasilacz Mikroskopowy typ TVO, Polonia).

## **2.8- Evaluación de la inmunidad específica.**

### **2.8.1- Evaluación de la inmunidad humoral.**

La inmunidad humoral se evaluó mediante dos esquemas de inmunización con antígenos diferentes. El diseño de este experimento se llevó a cabo de la siguiente forma:

➤ *Inmunización con un antígeno timo-dependiente (eritrocitos de carnero).*

Se conformaron tres grupos experimentales de cinco ratones cada uno. Dos grupos experimentales (M-DC y M-(F-I) fueron sometidos a un régimen de restricción dietética hasta la pérdida de aproximadamente el 25% de su peso. Al término de la depleción se le restituyó a ambos grupos la dieta convencional (día 0) y al grupo M-(F-I) se le administró adicionalmente y de forma diaria por vía oral, dosis de 100 mg/kg del extracto F-I durante 14 días.

El día 0 se le inoculó a ambos grupos por vía intraperitoneal el antígeno (0.2 mL de una solución de eritrocitos de carnero al 25%, en solución salina fisiológica, LABEX<sup>®</sup>); el volumen administrado de la suspensión celular equivale aproximadamente a una cantidad de  $2 \times 10^6$  células/ratón. A los siete días se tomaron 50  $\mu$ L de sangre por el plexo retroorbital para la titulación de los anticuerpos anti-eritrocitos de carnero por el método de hemaglutinación directa (Pico *et al*, 1997). Ese mismo día se realizó la segunda inoculación del antígeno. En el día catorce del esquema se extrajo nuevamente sangre para la titulación de los anticuerpos.

El grupo control consumió durante todo el período experimental pienso comercial para para la especie y fue sometido al esquema de inmunización descrito con anterioridad para los grupos M-DC y M-(F-I).

➤ *Inmunización con un antígeno timo-independiente (lipopolisacárido).*

El lipopolisacárido (LPS) fue obtenido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* mediante tratamiento con fenol acuoso caliente (Westphal *et al.*, 1952).

Los grupos de trabajo fueron conformados de forma similar al experimento anterior. El esquema de inmunización fue análogo al desarrollado con el antígeno timo-dependiente, a excepción de la titulación de anticuerpos anti-lipopolisacárido la cual se realizó sólo a los catorce días. Se inoculó vía i.p. 50 µg del antígeno/ratón contenido en un volumen de 0.2 mL de solución salina. El método empleado para la titulación fue hemaglutinación pasiva (Pico *et al.*, 1997), que requiere una previa sensibilización de los eritrocitos de carnero con el lipopolisacárido, como se describe a continuación:

- Lavar los eritrocitos de carnero tres veces con solución salina fisiológica, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Preparar una suspensión de eritrocitos de carnero al 10% con 0.5 mL de la solución de lipopolisacárido.
- Incubar la mezcla 1 h a 37°C.
- Lavar los hematíes recubiertos tres veces con solución salina fisiológica para eliminar el antígeno libre.
- Añadir el volumen de solución salina fisiológica necesario para hacer una suspensión al 2% de los eritrocitos de carnero sensibilizados con el lipopolisacárido.

Se emplearon como controles:

- 50 µL de suspensión al 2% de eritrocitos de carnero sensibilizados + 50µL de solución salina fisiológica.
- 50 µL de suspensión al 2% de eritrocitos de carnero no sensibilizados + 50 µL de solución salina fisiológica.
- 50 µL de suspensión al 2% de eritrocitos de carnero no sensibilizados + 50 µL del suero problema sin diluir.

Para ambos métodos de titulación, se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos con forma de “V” (Nunc, Dinamarca). El título de anticuerpos se definió como el recíproco de la mayor dilución positiva del suero en la reacción de hemaglutinación y fue expresado como el  $\text{Log}_2$  de los valores obtenidos

### **2.8.2- Evaluación de la inmunidad celular.**

La respuesta inmune celular se evaluó mediante el ensayo de hipersensibilidad retardada (HR) según Kim *et al.*, (1998). Las variantes experimentales se conformaron según el experimento de la respuesta inmune humoral y la repleción duró ocho días. El día 0 los ratones fueron sensibilizados

por la inoculación intradérmica (i.d.) en dos sitios del abdomen de 50  $\mu$ l de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) 5 mg/ mL en Adyuvante Completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO). A los ocho días los animales se retaron por vía i.d. en el cojinete de la pata trasera izquierda con 20  $\mu$ 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 se realizó con un micrómetro (Schwyz, Argentina) a las 24 h del reto. La respuesta 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 SSTF.

## **2.9- Análisis macroscópico de los órganos y determinación del peso relativo.**

Después del sacrificio de los animales, se realizó el análisis de las características morfológicas del hígado y bazo, tales como volumen, consistencia, color, distribución anatómica y posibles alteraciones macroscópicas. Los hígados y bazos fueron pesados en balanza analítica electrónica (ER-182 A, Japón) y se determinó luego el peso relativo en función del peso corporal de los animales.

## **2.10- Análisis estadístico.**

Los datos experimentales correspondientes a la evaluación de las propiedades inmunocéticas del extracto F-I en el biomodelo de malnutrición proteico energética se analizaron mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus para Windows 5.1, 2002. Los resultados se procesaron aplicando un análisis de varianza de clasificación simple (diseño completamente aleatorizado) acoplado a la prueba de rangos múltiples de Duncan para establecer entre cuáles de las medias de la variable analizada existían diferencias significativas. (Sigarroa, 1985).

En el experimento relacionado con el aclaramiento de carbón coloidal, la comparación entre los dos grupos considerados (M-DC y M-(F-I)), se realizó a través de la prueba de la *t* de Student para un nivel de significación de  $P < 0.05$  (Sigarroa, 1985).

### 3.1- Caracterización bioquímica del extracto F-I y relación con sus propiedades medicinales potenciales.

Las setas comestibles forman parte de la cultura culinaria en algunos países, y se han empleado durante largo tiempo en la medicina tradicional en numerosas regiones del planeta. De forma particular, se encuentran recogidas en las farmacopeas de la medicina tradicional asiática. De igual manera, los extractos derivados de estas han sido utilizados a nivel comunitario para tratar y prevenir algunos tipos de cáncer en Asia.

Muchos de estos extractos han sido caracterizados desde el punto de vista químico, y en ellos se ha referido la presencia de sustancias bioactivas que exhiben determinadas propiedades terapéuticas. Entre los compuestos aislados de elevado peso molecular, se encuentran mayoritariamente ciertas proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y glucoproteínas (Wasser *et al*, 2005).

En nuestro trabajo, se procedió a la obtención y caracterización bioquímica del extracto hidrosoluble crudo (F-I), a partir de la extracción acuosa de los cuerpos fructíferos a 20°C durante 3 h, con la finalidad de preservar la integridad no sólo de las proteínas, sino de las restantes moléculas termolábiles presentes en la seta. La composición bioquímica del extracto mostró un 43% de carbohidratos totales, un 35% de proteínas y un 0,11 % de nucleótidos.

En una investigación precedente desarrollada por nuestro grupo de trabajo, se caracterizaron parcialmente extractos acuosos del micelio de *Pleurotus spp.*(CCEBI-3024) obtenidos mediante cultivo sumergido y fermentación en estado sólido. Los extractos fueron preparados a alta temperatura (95°C) y mostraron valores de carbohidratos totales de 70.4% y 32,6%, respectivamente. En el caso de las proteínas la concentración fue de un 15 y 28,6%, respectivamente (Beltrán *et al*, 2005).

Por otra parte, Stamets (2000) refirió la composición química de un extracto de cuerpos fructíferos de *Ganoderma 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 *Lentinus edodes* mostró una concentración de carbohidratos totales y proteínas de un 58-60 % y 20-23 % respectivamente (Hobbs, 2000).

La diferencia cualitativa y cuantitativa en la composición bioquímica de los extractos depende de los distintos géneros y especies de setas, de las condiciones de cultivo así como de los procesos de extracción utilizados en su obtención (McKenna *et al*, 2002).

Otros componentes activos de interés terapéutico menos estudiados, comprenden algunas sustancias de bajo peso molecular, derivados de algunos intermediarios del metabolismo primario (Zaidman *et al*, 2005). Estos compuestos que no están involucrados en los procesos metabólicos del organismo, tales como la generación de energía y la formación de membranas celulares, entre otros, se conocen como metabolitos secundarios (Petrova *et al*, 2005). Los triterpenos y sus derivados, flavonoides, esteroides, derivados de lípidos, etc.; son algunos de los metabolitos secundarios que presentan propiedades medicinales, entre las que se destacan los efectos inmunomoduladores (Smith, 2002; Wasser *et al*, 2005; Garza *et al*, 2006) (Wasser, 2005(b)).

Con el objetivo de conocer los principios químicos presentes en F-I con posibles efectos medicinales se realizó un tamizaje fitoquímico (Tabla 4), según la Guía Metodológica para la Investigación de las Plantas Medicinales (1997).

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 de determinado color o precipitado coloreado o no, es indicativo de la presencia de un determinado metabolito. Estos ensayos no brindan un criterio absoluto y confirmativo de la existencia de estos compuestos, pues se pueden producir interferencias en estas reacciones, producto de la presencia en el medio de otras sustancias (metabolitos secundarios o no), capaces de reaccionar en forma similar, provocando reacciones falsas positivas. Sin embargo este procedimiento sí brinda un criterio de la composición química de un extracto de una droga vegetal. (Ochoa *et al*, 2006).

Hasta la fecha se han reportado muy pocos trabajos acerca de la presencia de compuestos de bajo peso molecular en *Pleurotus spp* que posean actividad biológica demostrada. Tal es el caso de un estudio realizado por Yassin *et al* (2003) donde se obtuvieron resultados satisfactorios en la inhibición de la proliferación y diferenciación de la leucemia humana K562, por sustancias de bajo peso molecular aisladas de extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus*. De igual forma, se han identificado ciertos antibióticos como el Pleurotellol y el Pleuromutilin del género *Pleurotus* (Brizuela *et al*, 1999). Por tal motivo, la identificación cualitativa preliminar en nuestro estudio le confiere un aspecto novedoso en la temática.

Entre las sustancias químicas presentes en el extracto F-I se encuentran los alcaloides, los azúcares reductores y las 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  $\beta$ -D-glucanos, compuestos que exhiben propiedades inmunomoduladoras y antitumorales, entre otras (Wasser, 2002). En el caso de las saponinas, éstas se comportan como laxantes cuando se administran por vía oral (Miranda y Cuellar, 2001).

Otros compuestos que resultaron positivos a sus respectivos ensayos son los terpenoides y quinonas. Dichas sustancias poseen una variada actividad biológica, entre las que se destacan sus efectos antitumorales e inmunomoduladores (Miranda y Cuellar, 2001).

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

En un estudio realizado por Kawagishi *et al* (2002), fueron aislados dos compuestos de bajo peso molecular de *Piptoporus betulinus*: una hidroquinona y un triterpeno. Estos principios mostraron actividad inhibidora de la enzima colagenasa, la que degrada el colágeno fibrilar presente en la matriz extracelular y favorece diversos procesos invasivos de angiogénesis y metástasis tumoral (Klein *et al*, 2004).

Se ha demostrado que la ADN polimerasa es una de las molécula dianas más importante de los agentes antitumorales (Miura e Izuta, 2004). La quinona 490, un compuesto natural del hongo *Agaricus bisporus*, inhibe marcadamente la ADN polimerasa en la línea de la leucemia murina LI 210 (Zaidman *et al*, 2005)

El ensayo a la presencia de flavonoides fue positivo en el extracto. Estos componentes en sentido general se han estudiado por sus propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras y antimicrobianas (Miranda y Cuellar, 2001). Además, presentan efectos antiangiogénicos y acción antiproliferativa. Por ejemplo el galato de epigallocatequina, un flavonoide del té verde es un potente inhibidor de la metaloproteinasas de la matriz, mostrando efectos anti-angiogénicos en estudios experimentales (Yang *et al*, 2001).

Otras investigaciones permitieron la identificación de una isoflavona, designada como Genistein encontrada principalmente en legumbres, la soya etc.; y referida recientemente en el hongo comestible *Flammulina velutipes* (Kang *et al*, 2003). Este compuesto inhibe el crecimiento del carcinoma ovárico humano SKOV-3 de manera dosis dependiente (Li y Mi, 2003) y actúa inhibiendo la expresión de la proteína p53, involucrada en la activación del ciclo celular (Chipuk *et al*, 2004).

La presencia de aminoácidos libres es un aspecto de gran importancia desde el punto de vista nutricional. En este sentido, el extracto podría representar una fuente de aminoácidos esenciales involucrados en los procesos metabólicos del organismo. En estudios recientes se han empleado los aminoácidos glutamina y arginina como inmunonutrientes en la estimulación de la respuesta inmunitaria en pacientes bajo estados de malnutrición, adquirida como resultado de sepsis severas, traumas e intervenciones quirúrgicas (Heys *et al*, 2004).

En el extracto F-I se destacan la presencia de taninos y fenoles, compuestos en los que se han demostrado propiedades antimicrobianas y antioxidantes. También participan en la inhibición de enzimas pro-inflamatorias, modifican la actividad de las prostaglandinas e inhiben la agregación plaquetaria (Obukowicz, 2002).

Desde hace algún tiempo, se conoce que la enzimoterapia brinda importantes beneficios en la terapéutica clínica, especialmente en enfermedades cardiovasculares y en el cáncer (Gubareva, 1998). Las setas comestibles son particularmente ricas fuentes de enzimas, las cuales pueden modular el curso de estas patologías, mediante la reducción del estrés oxidativo y la inhibición de la ploriferación celular.

En el trabajo se determinó en F-I la actividad enzimática de la lacasa, enzima benzenediol-oxígeno-oxidoreductasa que cataliza la reducción de dioxígeno a agua, así como la oxidación de un amplio rango de compuestos fenólicos y relacionados. El valor obtenido fue de  $(0,344 \pm 0,052 \text{ U/min})$ . Esta enzima cataliza la oxidación del ácido-3-hidroxiantranílico (A3HA) en ácido cinabarínico (CA), que es de gran interés clínico. El A3HA es producido en grandes cantidades por los fagocitos mononucleares estimulados por el interferón gamma, y se ha demostrado que actúa como un potente secuestrador de especies reactivas del oxígeno (Karmali, 2003).

En sentido general, en los basidiomicetos existe un amplio espectro de compuestos biológicamente activos. Sus aplicaciones prácticas no solo dependerían de sus propiedades, sino de su disponibilidad biotecnológica.

Aunque los polisacáridos son los componentes bioactivos más importantes de las setas comestibles con relación a sus propiedades medicinales, principalmente los efectos inmunomoduladores y antitumorales, la presencia de diferentes metabolitos en el extracto F-I podría conllevar a un sinérgismo en dichas actividades. Se debe, por lo tanto, continuar profundizando en la caracterización química de estos compuestos con potenciales aplicaciones terapéuticas.

### **3.2- Propiedades inmunocéuticas de F-I en un biomodelo experimental de malnutrición proteico energética.**

Con el objetivo de evaluar las propiedades inmunocéuticas de F-I en un biomodelo experimental de malnutrición proteico-energética, se estudió el comportamiento del peso corporal durante los períodos de depleción-repleción, así como de marcadores bioquímicos en suero y sistema digestivo, y particularmente parámetros relacionados con el sistema inmune.

La malnutrición proteico-energética inducida por restricción dietética e inanición severa ocasiona una serie de cambios metabólicos que conducen a la disminución del peso corporal, la depresión de la inmunocompetencia y alteraciones de las funciones del sistema digestivo, principalmente del hígado e intestino delgado. Por estas razones, constituye un síndrome clínico complejo donde coexisten muchas deficiencias simultáneamente (Boza *et al*, 1999).

Aunque se han desarrollado nuevos métodos para la inducción de estados de malnutrición en animales de experimentación, los modelos descritos en la literatura están basados esencialmente en criterios de restricción dietética (Ribeiro *et al*, 1998; Morris *et al*; 2007(a)). Por lo general, en estos estudios reportados en el principio depleción/repleción se han empleado ratas; sin embargo, en el presente trabajo se propone la utilización de ratones de la línea Balb/c para la evaluación del extracto hidrosoluble crudo de *Pleurotus spp*. Este biomodelo ha sido empleado en la caracterización del perfil de acciones inmunonutricionales de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* (Morris, 2007).

La evolución del peso corporal ha sido uno de los indicadores más ampliamente estudiados en la detección de la posible actividad bioestimulante de un preparado biológico, en virtud de las correlaciones significativas observadas entre la ganancia en peso durante la repleción y la regeneración de proteínas de la sangre e hígado, y con diferentes parámetros de la respuesta inmunitaria (Nieman *et al*, 1996).

Los valores del peso corporal de los animales sometidos al régimen de restricción dietética a los tres días de depleción mostraron diferencias significativas con respecto al control ( $P < 0.05$ ) (Tabla 5). La disminución significativa del peso corporal que se registró al concluir el período de restricción dietética refleja el estado de malnutrición proteico-energética inducido en los animales de experimentación y la depleción de las proteínas tisulares. Al concluir el período de repleción nutricional no existieron diferencias significativas entre los animales alimentados con dieta convencional y los suplementados con F-I, con relación a los parámetros asociados al peso, los

que presentaron como signos de recuperación valores muy similares a los controles. Estos resultados pueden estar asociados a la duración relativamente corta del tratamiento y al hecho de que las variaciones en el peso corporal reflejan de forma lenta los cambios nutricionales.

Resulta oportuno señalar, que no existe en la literatura revisada, un consenso en cuanto al tiempo de restricción dietética y el de repleción con la dieta a evaluar; así como tampoco hay un criterio unánime con relación al método de inducción del estado de malnutrición (no solamente por inanición, sino también por dietas bajas en proteínas, calorías, o nutrientes específicos). Ello dificulta la comparación entre los resultados experimentales obtenidos por diferentes grupos de trabajo.

### **3.2.1- Evaluaciones bioquímicas en suero y sistema digestivo.**

Los niveles de proteínas totales en suero, son severamente afectados cuando se establecen regímenes de restricción nutricional. Este parámetro bioquímico en nuestro trabajo mostró una marcada recuperación en los animales alimentados con la dieta convencional y en los que recibieron de manera adicional el extracto F-I. Se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo malnutrido, el que mostró una disminución acentuada en la concentración de proteínas séricas ( $P < 0,05$ ) (Figura 2).

Particularmente, se apreciaron diferencias significativas en cuanto al efecto de F-I en el nivel de proteínas séricas totales en comparación con los animales alimentados sólo con la dieta convencional. Este hecho podría suponer un efecto estimulador de los componentes presentes en el extracto sobre la síntesis proteica hepática.

Para una mejor comprensión de los posibles efectos de F-I, se pueden investigar en futuros trabajos indicadores más sensibles del estado de MPE, como algunas proteínas específicas de transporte, por ejemplo la transferrina, preálbúmina y la proteína de enlace ligada al retinol (Shills *et al*, 2005).

El hígado es el órgano más importante desde el punto de vista metabólico, detoxificante y excretor. En estados de malnutrición y para mantener la homeostasis, el hígado prioriza la pérdida de la masa hepática con cuadros de hipoplasia y atrofia, en vez de alterar su función, lo que conduce a una reducción de su volumen. (Guzmán *et al*, 2004).

El soporte nutricional ha sido propuesto como la intervención terapéutica más recomendable en pacientes con hepatopatías (Mc Clain *et al*, 2003), de ahí que se estudió el posible efecto de F-I a nivel hepático.

Los resultados en el peso relativo del hígado no reflejaron diferencias significativas entre las variantes experimentales. Sin embargo, se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas hepáticas, existiendo una marcada recuperación, en el grupo que recibió el extracto F-I con respecto al grupo malnutrido y al alimentado con dieta convencional ( $P < 0,05$ ). Los valores resultaron también superiores con relación al control (Figura 3).

El incremento de los niveles de proteínas hepáticas en el grupo que fue administrado con F-I, podría suponer una utilización más eficiente del nitrógeno consistente en 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, 2002).

En otro estudio, Walrand (2000) sometieron ratas adultas y mayores de doce semanas a un programa de restricción dietética que indujo similares alteraciones metabólicas y nutricionales. Luego fueron realimentadas durante una semana con una dieta enriquecida en proteínas. En las ratas adultas la dieta restableció el peso corporal y los valores basales del peso relativo del hígado, así como los niveles de proteínas hepáticas respecto al grupo control. El consumo de la dieta fue menos efectivo en las ratas mayores de doce semanas.

Otro indicador sensible a evaluar en el tejido hepático en futuros trabajos es la actividad de la enzima colinesterasa, ya que ésta refleja el estado funcional del hígado y particularmente su disminución expresa trastornos en la síntesis proteica. Cahill-Morasco *et al* (1998) plantearon que la biosíntesis de colinesterasa y seroalbúmina ocurren en el hígado como vías acopladas, y valores bajos de actividad se han asociados a estados de MPE.

El tracto gastrointestinal constituye una importante interfase entre el organismo y el ambiente, al participar en la regulación de la incorporación de los nutrientes ingeridos y en la defensa contra un número extraordinariamente elevado de agentes patógenos (Baum *et al*, 2003). La integridad de la mucosa intestinal está asociada con el estado nutricional (Schaible y Kaufmann, 2007). En la MPE se producen alteraciones en la capa mucosal que la hacen más susceptible y permeable a endotoxinas bacterianas (Faure, 2005). Entre las experiencias realizadas se abordó el estudio del efecto de la administración oral de F-I sobre la recuperación de la integridad y funcionamiento de la mucosa intestinal.

El restablecimiento del régimen alimentario propició el incremento del peso de la mucosa intestinal de los animales alimentados con la dieta convencional, y particularmente de los suplementados con F-I. Este último grupo presentó, en este parámetro, valores superiores al control ( $P < 0.05$ ). Dicho comportamiento está estrechamente relacionado con la concentración de proteínas, ya que la función celular y el recambio normal de la mucosa, precisan de una alta tasa de síntesis proteica (Baum *et al*, 2003) (Figura 4).

Los animales suplementados con F-I se caracterizaron, además, por presentar un contenido superior de ADN en la mucosa yeyunal ( $P < 0.05$ ) (Figura 4), que podría estar relacionado con la estimulación de los procesos de división celular de los enterocitos y su recambio activo (Lipkin, 1987).

Boza *et al*, (1999) evaluaron el efecto que provoca la inanición y la realimentación con una dieta enriquecida con soya en el crecimiento, recuperación nutricional y de la mucosa intestinal en ratas. Luego del período de restricción dietética, se observó un deterioro de la mucosa intestinal, incluida una disminución del contenido de proteínas mucosales, y una permeabilidad incrementada a un gran número de macromoléculas. Posteriormente a la repleción con la dieta durante tres días, se mostró una normalización en estos marcadores metabólicos y funcionales.

Por otra parte, Manhart *et al.*, (2000), evaluaron el impacto de un periodo corto de malnutrición proteica en la producción de IgA y en el número de linfocitos en las placas de Peyer de ratones Balb/c. Los cuatro días de malnutrición causaron una reducción significativa en el número de células en las placas de Sëller de los ratones malnutridos en comparación con las controles ( $13 \times 10^6$  vs  $8,6 \times 10^6$ ). El contenido de IgA en la mucosa intestinal se redujo también significativamente como resultado de la malnutrición proteica.

Estos resultados son de particular interés si tenemos en cuenta la función de barrera de la mucosa intestinal que representa la primera línea de defensa contra la translocación bacteriana o de otros patógenos (Flórez, 1998), Esta función es ya valorada su máxima importancia en relación con los estados de malnutrición en pacientes críticos. Determinados substratos son actualmente considerados la principal herramienta para el mantenimiento de la estructura y función barrera de la mucosa gástrica e intestinal (Shills *et al.*, 2005).

### **3.2.2 Evaluación de la inmunidad innata y adaptativa.**

Es importante señalar que la evaluación de las alteraciones de la respuesta inmune constituye un medio sensible y funcional para la detección temprana de la depleción nutricional y de identificación de la respuesta a una intervención nutricional determinada (Shankar, 2003). Los cinco aspectos de la inmunidad mayormente afectados por la MPE son: la inmunidad mediada por células, la función fagocítica, el sistema de complemento, los anticuerpos secretores y la producción de citoquinas (Roitt *et al.* 1998).

Los componentes de los alimentos no sólo tienen efectos nutricionales en animales y humanos, sino también son la causa de acciones moduladoras sobre el sistema inmune y otros sistemas de órganos (Fraker, 2003).

En la actualidad se desarrollan algunas investigaciones relacionadas con la capacidad inmunomoduladora de extractos de setas comestibles. Sin embargo, los estudios realizados en el género *Pleurotus* presentan un carácter esencialmente nutricional. De ahí, el interés de evaluar la potencial actividad inmunomoduladora de F-I, administrado oralmente en este biomodelo experimental, como parte de su espectro de propiedades inmunocéuticas.

Uno de los parámetros más afectados en estados de malnutrición proteico-energética es el conteo total de leucocitos. En nuestro trabajo, se apreció una recuperación de esta población celular en los animales alimentados con dieta convencional, que alcanzaron valores similares al control. El grupo suplementado con F-I, mostró un incremento estadísticamente significativo con relación al control, pero dentro del intervalo de valores considerados como normales para la especie ( $6-17 \times 10^9/\text{mL}$ ) ( $P < 0.05$ ) (Figura 5).

Este resultado nos permite suponer un efecto modulador de los componentes presentes en F-I en la hemopoyesis, posiblemente a través de la síntesis de factores como las citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis (denominadas colectivamente, factores estimuladores de colonias).

Se conoce que los macrófagos desempeñan un papel central en la regulación de la inmunidad innata e específica (Abbas, 2002). Se evaluó, por lo tanto, la capacidad estimuladora de macrófagos peritoneales, esplénicos y células de Kupffer por el extracto F-I. Los resultados

mostraron un incremento en el número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal, en comparación con los restantes grupos experimentales ( $P < 0.01$ ) (Figura 6). Los conteos de estas células fagocíticas resultaron particularmente afectados en los animales malnutridos. En el caso de los alimentados con dieta convencional luego de la depleción nutricional se recuperaron los valores solo a niveles similares al control.

La actividad *in vivo* de los macrófagos esplénicos y las células de Kupffer se evaluó por medio de la prueba de aclaramiento del carbón coloidal en sangre periférica. Este ensayo es un índice de la actividad fagocítica del hígado y bazo, debido a que las partículas de carbón coloidal administradas por la vena de la cola, son fagocitadas principalmente por los fagocitos de estos órganos (Yoshizawa *et al*, 1993).

Administrado oralmente a una dosis de 100 mg/kg, F-I estimuló la actividad del sistema monocito-macrófago, en comparación con el grupo alimentado con dieta convencional ( $P < 0,01$ ) (Tabla 6). El tiempo de vida media en sangre del carbón coloidal a los 5 min, fue significativamente menor en este grupo que en el de los animales alimentados sólo con la dieta convencional.

La determinación de los niveles de endotoxinas (LPS) mediante el ensayo LAL en el extracto mostró un valor de (10,08  $\eta$ g/mL). Este parámetro se encuentra dentro de los límites presentado por Fraga *et al*, (1999) en productos biológicos obtenidos por técnicas de ADN recombinante. El LPS posee diferentes actividades biológicas, entre ellas la activación de macrófagos; es por ello que su presencia como contaminante es importante en los estudios realizados con sustancias inmunomoduladoras. Sus concentraciones *per se* en el extracto no podrían resultar en una actividad biológica significativa.

Ha sido planteado que las alteraciones en la funcionalidad de los macrófagos representan uno de los factores que contribuye a incrementar la morbi-mortalidad en la MPE (Mc Carter *et al*, 1998). Estos autores refirieron una menor producción del factor de necrosis tumoral alfa ( $\alpha$ -TNF) y de interleuquina-6 (IL-6) por macrófagos peritoneales aislados de ratones con MPE, así como una reducción significativa en los correspondientes niveles de ARNm. Otras afectaciones detectadas se relacionan con los mecanismos de transducción de señales en la célula, como el flujo de iones  $Ca^{+2}$  y la fosforilación dependiente de proteínas con actividad tirosina quinasa.

Por otra parte, Lotfy *et al* (1998) observaron una disminución en la síntesis *in vitro* de IL-1 en cultivos de células mononucleares aisladas de pacientes con MPE y afectaciones en el proceso de fagocitosis. También se afecta la fagocitosis de *Candida albicans* en los macrófagos peritoneales de ratas malnutridas como resultado de una dieta baja en proteínas (Prestes-Carnero, *et al*, 2006).

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado los efectos inmunomoduladores de extractos acuosos obtenidos a partir del micelio de *Pleurotus spp.* en otros biomodelos de inmunodeficiencias secundarias: en animales tratados con ciclofosfamida a una dosis de 10 mg/kg (Morris *et al*. 2003) y sometidos a irradiación de cuerpo completo a una dosis de 0.43 Gy/min (Morris *et al*. 2002). Los resultados evidenciaron un incremento en la actividad del sistema monocito-macrófago, reflejado en el aumento del número de células presentes en el exudado peritoneal, la fagocitosis *in vivo* de macrófagos peritoneales y la actividad fagocítica de células de

Kupffer y macrófagos esplénicos. Otro estudio refleja la activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos por fracciones polisacáridicas (F-I-F-V) de *Pleurotus spp.* en función del mayor consumo de glucosa y el incremento observado en la producción de la enzima fosfatasa ácida lisosomal, con respecto al control (Morris, *et al*, 2007 (b)).

Los autores señalan la posible presencia de compuestos con estructuras del tipo 1,3-β-D-glucanos en el extracto acuoso de micelio de *Pleurotus spp.*, a juzgar por la formación de complejos de inclusión con el rojo congo, el comportamiento dosis-dependiente en la actividad fosfatasa ácida lisosomal en cultivos de macrófagos *in vitro* (presumible interacción ligando-receptor) y estudios preliminares de espectroscopia infrarroja (Ferrera, 2005). Se conoce que estos compuestos exhiben una demostrada actividad inmunofarmacológica, y se ha planteado que poseen receptores en las membranas citoplasmáticas de los macrófagos; tal es el caso del Dectin 1, el cual contribuye a la fagocitosis (Wilment *et al*, 2001; Taylor *et al*, 2002; Poutsika *et al*, 2003).

La recuperación del funcionamiento de la mucosa intestinal, junto con la activación de los macrófagos peritoneales y esplénicos, sugiere que componentes del extracto de *Pleurotus* son absorbidos en el tracto gastrointestinal, llegando a estimular estas poblaciones celulares. Yoshizawa *et al* (1996), compararon la administración a ratones de una fracción polisacáridica del alga marina *Gracilaria verrucosa* por la vía oral e intraperitoneal. Se encontró una estimulación de los macrófagos peritoneales y esplénicos a los 5 días en los experimentos realizados por la vía oral después de la inducción del tejido linfoide asociado a mucosas en el tracto gastrointestinal (GALT). Estos estudios evidencian que la administración oral de un producto que exhibe actividad inmunomoduladora podría activar de forma indirecta el sistema inmune integrando diferentes elementos de la respuesta inmunitaria.

Ha sido demostrado que todos los órganos linfoides disminuyen de tamaño durante la malnutrición proteico energética, y en el caso del bazo, su volumen y coloración varían de acuerdo con la cantidad de sangre que retiene en su interior y la actividad hematopoyética que realiza (Christian y Alejo, 1993). Los resultados no evidenciaron diferencias estadísticas entre los animales suplementados con F-I y los que recibieron solo la dieta convencional con relación al peso del órgano y el número de células. Los resultados evidenciaron la recuperación del peso del órgano con relación al grupo control en los animales suplementados con F-I ( $P < 0.05$ ) (Tabla 7). En ambos parámetros el grupo malnutrido mostró una marcada depleción.

Manhart *et al*, (2000), evaluaron el impacto de un periodo corto de malnutrición proteica en el número de linfocitos en el bazo de ratones Balb/c. Los cuatro días de malnutrición causaron una reducción significativa en el número de células mononucleares en bazo ( $5,6 \times 10^7$  en el grupo control vs  $2,4 \times 10^7$  en el grupo malnutridos  $P < 0,01$ ).

Aunque se conoce que la respuesta inmune mediada por células y la función de los linfocitos T son las más afectadas en estados de MPE, es de mucha importancia la evaluación de la inmunidad humoral. La deficiencia proteica ocasiona una disminución en la síntesis de proteínas vinculadas con los mecanismos de defensa del huésped. Por tal motivo, se evaluó el efecto inmunomodulador de F-I en dos esquemas de inmunización: con un antígeno timo-dependiente (eritrocitos de carnero) y uno timo-independiente (lipopolisacárido).

En el caso de los animales inoculados con el antígeno timo-dependiente por la vía intraperitoneal, no se manifestaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en los títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero a los siete días post-inoculación. Los títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero alcanzados a los catorce días en los animales suplementados con F-I fueron significativamente respecto a los del grupo M-DC, aunque resultaron inferiores con relación al control ( $P < 0.05$ ) (Figura 7). Las respuestas de anticuerpos primarias y secundarias frente a los antígenos timo-dependientes difieren cualitativa y cuantitativamente. Las respuestas primarias son el resultado de la activación de células B previamente no estimuladas, mientras que las respuestas secundarias se deben a la estimulación de clones expandidos de células B de memoria. De ahí que la respuesta secundaria se desarrolle más rápidamente que la respuesta primaria, y que en ellas se produzcan mayores cantidades de anticuerpos. (Abbas, 2002). Nuestras evidencias podrían sugerir un efecto estimulador por parte del extracto en la cooperación entre linfocitos T y B, así como en la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas.

Se conoce que existen receptores para  $\beta$ -glucanos en linfocitos T colaboradores (Cortes *et al.*, 2006). La presencia de estructuras en F-I capaces de estimular las células T, supondría un incremento en los niveles de IL-4, citoquina activadora de los linfocitos B (Abbas, 2002).

Un extracto acuoso obtenido a altas temperaturas de cuerpos fructíferos del *Agaricus brasiliensis*, mostró ser un potente estimulador de los linfocitos T en ratones, al aumentar la síntesis de IL-1, resultando finalmente en un aumento en la producción de anticuerpos contra eritrocitos de carnero (Nakajima *et al.*; 2002)

Los anticuerpos anti-LPS se titularon sólo a los catorce días de la inoculación del antígeno vía intraperitoneal, debido a que la respuesta primaria (7 días) de anticuerpos frente a antígenos timo-independientes está compuesta principalmente por IgM de baja afinidad y algunos anticuerpos IgG, con escasa generación de células de memoria. En este caso, se obtuvo un incremento estadísticamente significativo de los títulos de anticuerpos en los animales que recibieron adicionalmente F-I con relación al grupo alimentado con la dieta convencional ( $P < 0.05$ ) (Figura 8).

El análisis de la literatura especializada en este tema sugiere que la inmunidad humoral no parece afectarse en la MPE, en lo fundamental ante la presencia de antígenos timo-independientes. Esto se asocia al hecho considerado anteriormente de que los estudios morfológicos de tejidos linfoides periféricos de pacientes desnutridos, si bien han mostrado afectaciones severas relacionadas con la ontogenia de los linfocitos T, las regiones B han sido menos afectadas y aunque han mostrado disminuciones de tamaño, mantienen conservados los centros germinales ricos en linfocitos B (Keusch, 1993).

Sin embargo, estudios sobre la estimulación de la respuesta inmunitaria humoral por polisacáridos extraídos del micelio de la seta comestible *Phellinus linteus*, reflejaron que la administración i.p. de 100 mg/kg de la fracción purificada del polisacárido a ratones, estimuló la inmunidad adaptativa humoral, expresado en un incremento de la respuesta primaria frente a antígenos timo-dependientes y timo-independientes (Mook *et al.* 1996). Los autores plantearon además que el polisacárido de *Phellinus linteus* actuó como un activador policlonal de los linfocitos B, por un mecanismo similar al de la interleucina 2 (IL-2).

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. Como se ha planteado anteriormente, la respuesta inmune celular es mayormente afectada en estados de malnutrición proteico-energética (Schaible y Kaufmann, 2007).

Los animales, luego de los tres días de restricción dietética, fueron sensibilizados con BSA por vía i.d en varios sitios del abdomen y a los ocho días se retaron con el antígeno en el cojinete plantar. Los ratones que recibieron como suplemento el extracto F-I mostraron una respuesta de HR superior a la de los grupos Control y M-DC a las primeras 24 horas (Figura 9). Este resultado sugiere un efecto estimulador del extracto de *Pleurotus spp* sobre la respuesta inmune mediada por células T(CD4<sup>+</sup> Th1) en el grupo M-(F-I).

Se ha planteado que las células CD4<sup>+</sup> (Th1) actúan como inductoras de la HR. Estas subpoblaciones de linfocitos Th1 circulantes inducen en el primer contacto con el antígeno y al enfrentarse con él en un segundo contacto se activan y liberan citoquinas promotoras de inflamación como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , potentes activadores de los macrófagos que se encuentran infiltrando los sitios inflamados. (Black, 2000; Abbas, 2002).

Diferentes estudios 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 las NK mediante la secreción de IL-2. Por otro lado, Paulik *et al* (1996) evaluaron el efecto en ratones de dos glucanos extraídos de *Pleurotus 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.

Mantener la integridad del sistema inmunitario resulta fundamental para prevenir la invasión de microorganismos y para la supervivencia de los individuos. Por lo tanto, estudiar los efectos que ocasiona la MPE sobre el sistema inmune permite una manipulación nutricional efectiva, logrando atenuar la susceptibilidad a infecciones oportunistas. Esto es particularmente importante en las personas mayormente expuestas a situaciones de deficiencias nutricionales; como es el caso de ancianos, niños con bajo peso al nacer, en pacientes que padecen enfermedades crónicas y síndromes de malabsorción, entre otros.

En los últimos años se ha producido un gran avance en la investigación de la relación inmunidad-nutrición, pero aún quedan sin respuesta muchas cuestiones. Algunas repercusiones importantes desde un punto de vista práctico son el empleo de pruebas inmunológicas como indicadores funcionales del estado nutricional o la detección de situaciones favorecedoras de una mayor susceptibilidad a las infecciones.

En la malnutrición proteico-energética no sólo existe una disminución del aporte de proteínas y energía, sino que también se acompaña de deficiencias de vitaminas y minerales, lo que incide negativamente en el sistema inmune (Bowman y Russell, 2003). Otro hecho que puede estar relacionado con la recuperación inmunonutricional de los animales suplementados con el extracto hidrosoluble crudo de *Pleurotus spp*. es la posible existencia en su composición de estos micronutrientes a los que se atribuye un importante papel en los mecanismos de defensa celular (Schuftan, 1998; Singla *et al*, 1998).

Es válido destacar el hecho de que el extracto fue bien tolerado por los animales y no se detectaron al término del tratamiento, en el estudio anatomopatológico signos de toxicidad por la administración del mismo a dosis repetidas.

El avance en la comprensión de muchos aspectos metabólicos y funcionales de los extractos de setas comestibles, no solo resolverá controversias sobre su papel en la nutrición, sino que proporcionará las bases para establecer recomendaciones flexibles sobre su utilización terapéutica. Al respecto, el modelo experimental utilizado en el trabajo reproduce los cambios patológicos que acompañan la malnutrición proteico-energética referidos en otras especies y en nuestras condiciones experimentales demostró ser útil en el estudio de las propiedades inmunocéuticas de F-I. Por estas razones podría proporcionar información sobre el modo de acción de productos análogos, particularmente en respuestas rápidas de adaptación y en la potenciación de los mecanismos de defensa ante situaciones que propicie un déficit proteico-energético.

Los conocimientos actuales sobre el papel de *Pleurotus spp.* y sus bioproductos, en la profilaxis y terapéutica de diversas enfermedades se encuentran aún en gran medida a un nivel empírico. Los resultados obtenidos en la evaluación de los efectos inmunocéuticos de F-I en un biomodelo de restricción dietética apuntan a que su consumo podría ser un factor importante en el mantenimiento y/o recuperación de la integridad funcional del organismo. Por ello que consideramos se debe profundizar en su papel a nivel molecular para sustentar así sus aplicaciones potenciales como un alimento funcional, en correspondencia con las tendencias actuales en el área de la nutrición humana.

**Tabla 4.** Tamizaje fitoquímico del extracto hidrosoluble crudo F-I de *Pleurotus spp.* (CCEBI-3024)

<i>Metabolitos</i>	<i>Ensayo</i>	<i>Evidencias</i>	<i>Observaciones</i>
<b>1- Alcaloides</b>	- Dragendorff	(+)	Precipitado
	- Wagner	(+)	
<b>2- Azúcares Reductores</b>	- Benedict	(+)	Color rojizo
	- Fehling	(+)	Precipitado Pardo-rojizo
<b>3- Saponinas</b>	- Formación de espuma	(+)	
<b>4- Quinonas</b>	- Borntrager	(+)	Dos fases
<b>5- Triterpenos</b>	- Solkowski	(+)	Precipitado
	- Lieberman-Burchard	(+)	azul gelatinoso
<b>6- Cumarinas</b>	- Baljet (KOH- MeOH)	(-)	Turbidez con cambio de color
<b>7- Aceites esenciales</b>	- Sudán III	(-)	
<b>8- Aminoácidos libres y Aminas</b>	- Ninhidrina	(+)	Coloración intensa (azul-negro violáceo)
<b>9- Flavonoides</b>	- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc)	(+)	Coloración amarilla- rojiza
<b>10- Mucílagos</b>	- Consistencia gomosa	(-)	
<b>11- Principios amargos y astringentes</b>	- Sabor	(-)	
<b>12- Fenoles y taninos</b>	- Ensayo FeCl <sub>3</sub>	(+)	Desarrollo de coloración rojo-vino

Los ensayos fueron realizados según la Guía Metodológica para la investigación de las plantas medicinales, empleándose tres réplicas para cada ensayo. (Guía metodológica de Salud Pública.1997).

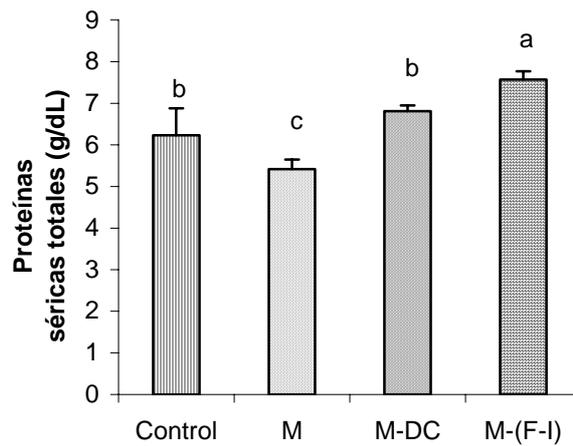
(-): ensayo negativo

(+): ensayo positivo

**Tabla 5:** Variación del peso corporal en los períodos de depleción y repleción dietética de las variantes experimentales.

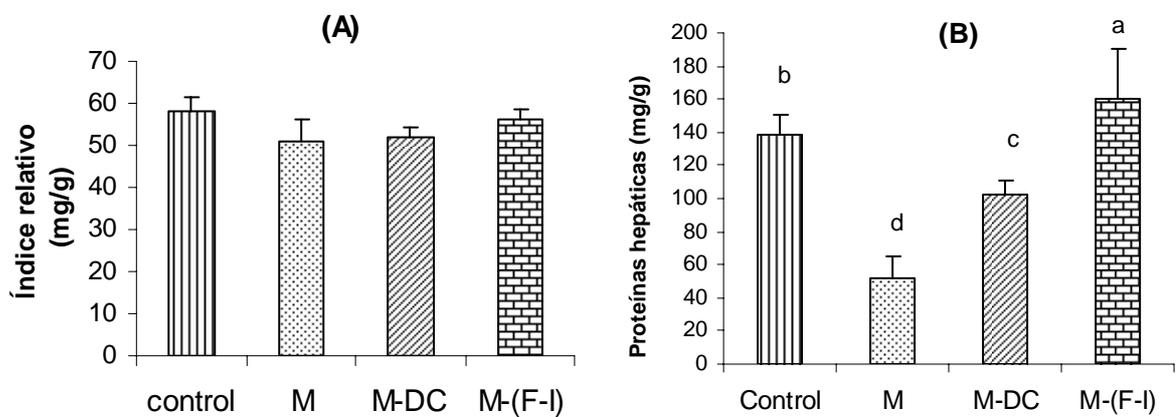
	<b>CONTROL</b>	<b>M</b>	<b>M-DC</b>	<b>M-(F-I)</b>
Peso inicial (g) <sup>ns</sup>	19.5 ± 0,9	19.1 ± 0.9	19.2 ± 1.1	21.6 ± 1.1
Peso al término de la depleción (g) <sup>***</sup>	20.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	14.5 ± 1.2 <sup>b</sup>	14.9 ± 0.8 <sup>b</sup>	16.1 ± 0.7 <sup>b</sup>
Peso al término de la repleción (g) <sup>ns</sup>	19.0 ± 0.6	----	20.6 ± 0.7	19.0 ± 1.3
Incremento en peso durante la repleción (g/24h) <sup>ns</sup>	----	----	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Ganancia en peso durante la repleción (%) <sup>ns</sup>	----	----	15.0 ± 8.0	18.8 ± 7.1

Los valores representan las medias ± la desviación estándar de cada grupo (ns). No hay diferencias significativas; Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan para P<0.001).



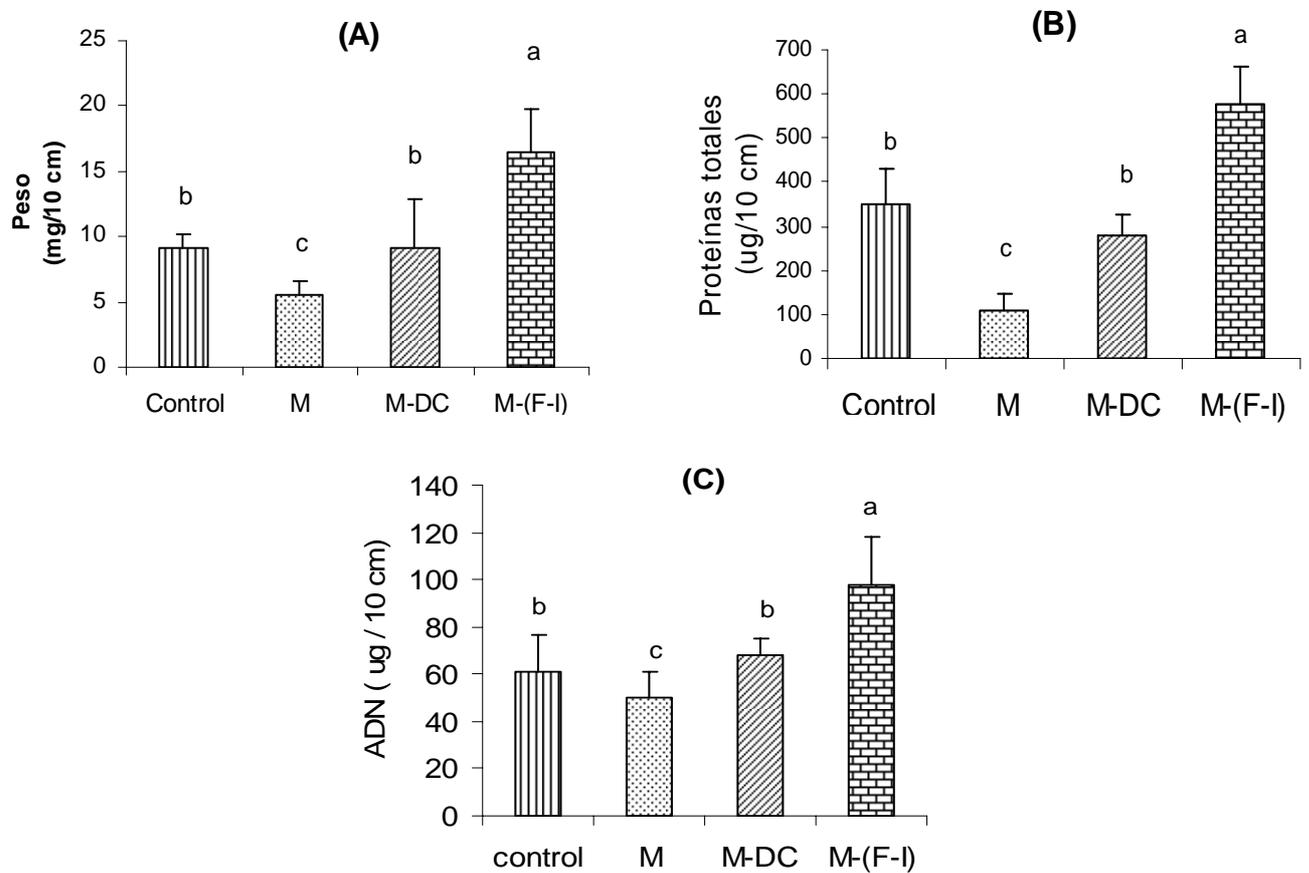
**Figura 2:** Concentración de proteínas séricas totales en las diferentes grupos experimentales.

Se tomaron muestras de sangre por el plexo retroorbital empleando capilares heparinizados. La determinación de la concentración de proteínas séricas totales, expresadas en (g/dL). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P < 0.05$ ).

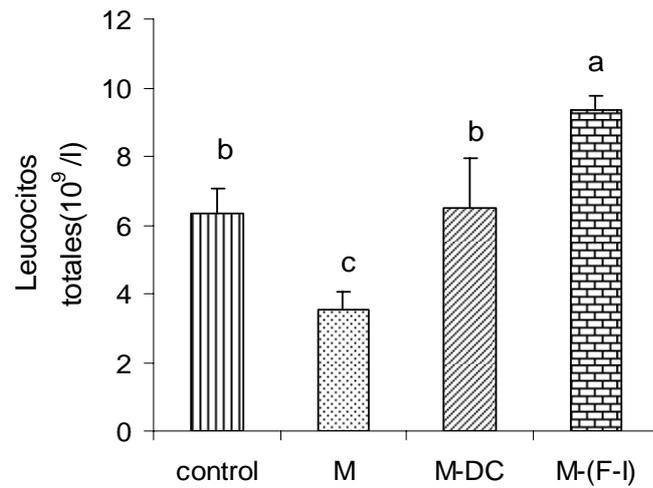


**Figura 3:** Pesos relativos (A) y concentración de proteínas en hígado (B) en los distintos grupos experimentales.

Los extractos hepáticos fueron obtenidos por homogenización de las muestras con tampón fosfato salino 0.01 mol/L pH 7.4 (1:3 m/v) en baño de hielo. El contenido de proteínas totales en los extractos se determinó según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P < 0.05$ ).



**Figura 4:** Peso (A), contenido de proteínas totales (B) y ADN (C) de la mucosa yeyunal de ratones sometidos a distintos tratamientos experimentales. Se tomaron segmentos de intestino delgado de aproximadamente 10 cm de longitud a partir del ligamento de Treitz. Luego de una incisión se raspó la mucosa con una lámina de vidrio y se depositó el contenido en viales. La homogeneización se efectuó en el propio vial con tampón fosfato salino pH 6.0 (1:3 w/v). Se determinó el peso de la mucosa yeyunal (mg/10cm), el contenido de proteínas totales por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y la concentración de ADN según Burton (1956), expresados en ( $\mu\text{g}/10\text{ cm}$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P < 0.05$ ).



**Figura 5:** Conteo de leucocitos totales en las diferentes variantes experimentales.

Se tomaron muestras de sangre por el plexo retroorbital de cada animal empleando capilares heparinizados y colectadas en viales que contenían una gota de anticoagulante (citrato de sodio), Fueron tomados 20  $\mu$ L de sangre añadidos en viales con 0.4 mL de HAC al 2%. Se homogenizó y se contó en cámara de Neubauer. Los leucocitos se expresan en ( $10^9/L$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P < 0.05$ ).

**Tabla 6:** Aclaramiento de las partículas de carbón coloidal en los grupos experimentales alimentados luego de la depleción nutricional con la dieta convencional (M-DC) y suplementados adicionalmente con F-I (M-(F-I)).

	M-DC	M-(F-I)
Relación de A a los 5 min. ( $A_{675}$ grupo experimental / $A_{675}$ grupo control sin administración)	$1.9 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.1^*$

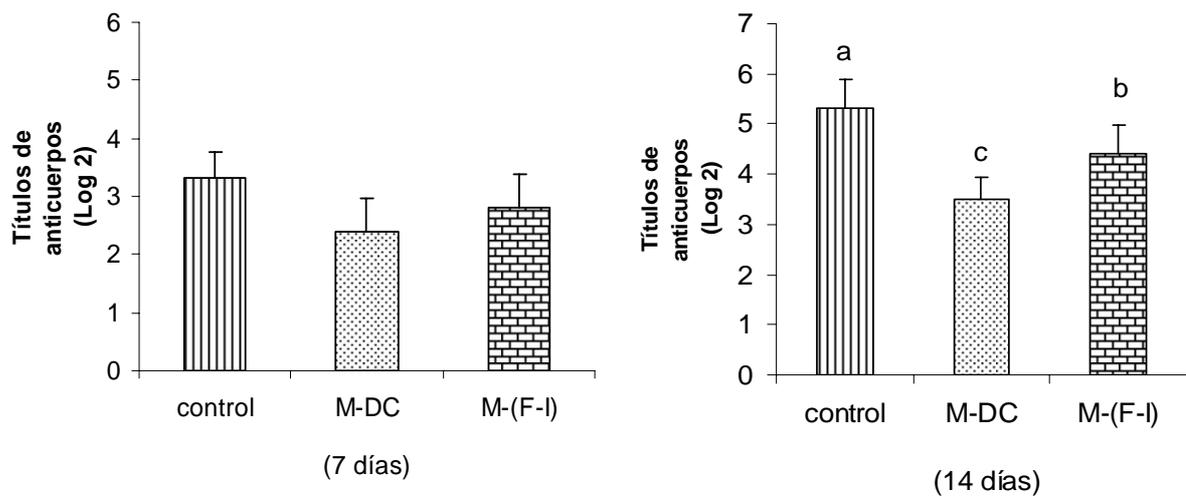
Los valores representan las medias  $\pm$  la desviación estándar de cada grupo. Se administró 0.2 mL de la solución de carbón coloidal por la vena de la cola. Se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de sangre por el plexo retroorbital a los 5 min, se mezcló con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.1% y se determinó la absorbancia a 675 nm en el espectrofotómetro. (\*) Diferencias significativas en la prueba de la t de Student (P < 0.05).

**Tabla 7:** Peso relativo de bazo y celularidad esplénica de ratones sometidos a distintos tratamientos.

	CONTROL	M	M-DC	M-(F-I)
Peso relativo (mg/100g)*	380 ± 0.1 <sup>a</sup>	270 ± 0.1 <sup>b</sup>	430 ± 0.1 <sup>a</sup>	430 ± 0.01 <sup>a</sup>
Celularidad esplénica (x10 <sup>7</sup> /bazo)*	9.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.4 ± 0.1 <sup>a</sup>

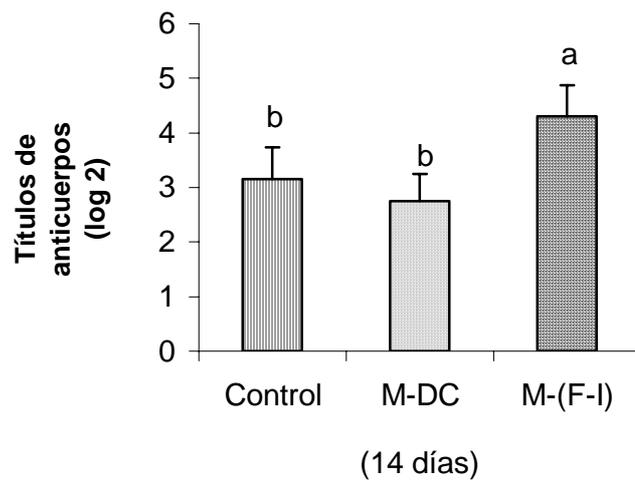
Los valores representan las medias ± la desviación estándar de cada grupo.

El peso se expresa en (mg/100g). La suspensión de células esplénicas se preparó homogenizando suavemente el bazo con solución de Hanks helada. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer en un microscopio óptico y se expresaron (10<sup>7</sup> células/ bazo). (\*) Diferencias significativas (P< 0.05). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan.)



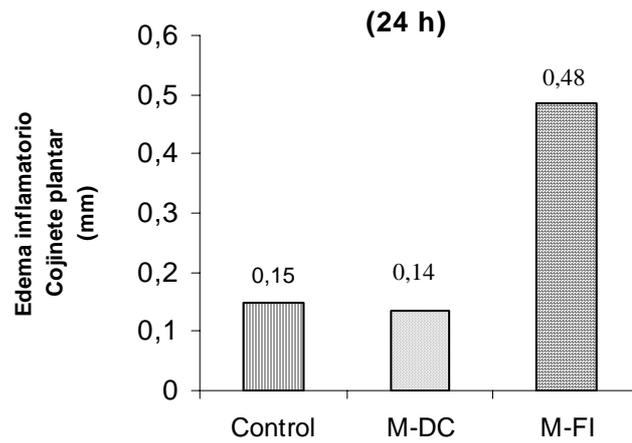
**Figura 7:** Títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero a los 7 y 14 días después de la inmunización.

El día 0 se inoculó por vía intraperitoneal 0.2 mL de una solución de eritrocitos de carnero al 25% en solución salina fisiológica. A los 7 y 14 días se tomaron 50  $\mu$ L de sangre por el plexo retroorbital para la titulación de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero por el método de hemaglutinación directa (Pico *et al*, 1997). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P < 0.05$ ).



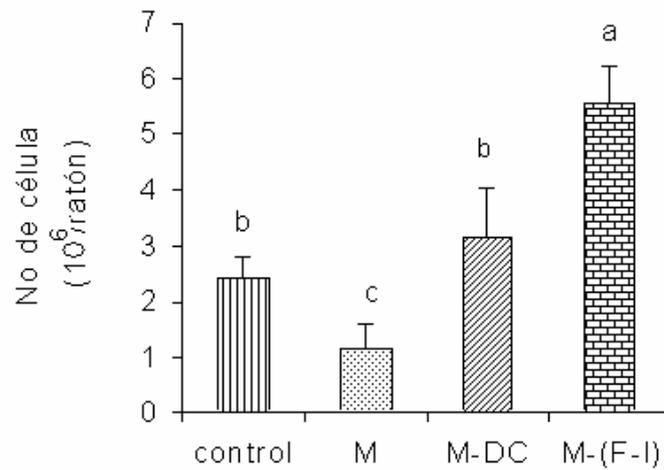
**Figura 8:** Títulos de anticuerpos anti-lipopolisacárido a los 14 días de la inmunización.

El día 0 se le inoculó por vía intraperitoneal 50µg/animal en un volumen de 0.2 mL. A los 14 días se tomaron 50 µL de sangre por el plexo retroorbital para la titulación de anticuerpos anti-LPS por el método de hemaglutinación pasiva (Pico *et al*, 1997). Letras distintas indican diferencias significativa (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P<0.05$ ).



**Figura 9.** Respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) específica a la BSA en ratones Balb/c malnutridos

Al término de la depleción (día 0), los ratones (n=5) fueron sensibilizados por la inoculación intradérmica (i.d) de 50  $\mu$ 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 derecha con 20  $\mu$ L de solución de BSA. En el cojinete de la pata trasera izquierda se inoculó un volumen similar de solución salina tamponada con fosfato (SSTF). La medición de la induración producida se realizó a las 24 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.



**Figura 6:** Celularidad del exudado peritoneal en las diferentes variantes experimentales.

A los ratones sacrificados se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p) 5 mL de solución de Hanks. Luego de realizar una incisión, se colectaron las células de la cavidad. La celularidad fue estimada por conteo en cámara de Neubauer al microscopio óptico. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de los rangos múltiples de Duncan,  $P < 0.01$ ).

1. La extracción acuosa de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.* a bajas temperaturas, permitió la obtención de un extracto hidrosoluble crudo (F-I) en cuya composición se destaca la presencia mayoritaria de carbohidratos y proteínas con valores de 43 % y 35 %, respectivamente. El tamizaje fitoquímico evidenció además, la existencia de diferentes metabolitos con posible actividad biológica.
2. La administración oral de F-I durante la recuperación de ratones malnutridos ejerció efectos bioestimulantes que se manifestaron a nivel de la síntesis de las proteínas séricas en el hígado y favoreció, además la inducción de los procesos de recambio celular en la mucosa intestinal.
3. El extracto acuoso F-I moduló específicamente la recuperación inmunológica de ratones Balb/c malnutridos a través del incremento en el conteo de leucocitos totales en sangre periférica y la potenciación del estado funcional del sistema monocito macrófago. La administración de F-I estimuló además, la respuesta humoral y celular en términos de los títulos de anticuerpos frente a antígenos timo-dependientes y timo-independientes, y la inducción de hipersensibilidad retardada, respectivamente.
4. El biomodelo experimental del ratón malnutrido reproduce las alteraciones patológicas que acompañan a la MPE referida en otras especies, y en nuestras condiciones experimentales resultó útil en la demostración de las propiedades inmunocéticas del extracto F-I de *Pleurotus spp.*

1. Profundizar en el estudio del efecto inmunoestimulante de F-I en otros sistemas experimentales, así como investigar los mecanismos moleculares mediante los cuales ejerce su acción.
2. Evaluar el efecto inmunomodulador de F-I, administrado durante un mayor período de tiempo en este biomodelo experimental.

- Abbas A, Litchman A, Pober J. Inmunología Celular y Molecular. 4<sup>ta</sup> ed. Madrid: Mc Graw Hill; 2002.
- Adachi Y, Suzuki Y, Jinushi T, Yadomae T, Ohno N. TH1-oriented immunomodulating activity of gel-forming fungal (1-3)-Beta-Glucans. *Int J Med Mush* 2002; 4:105-120.
- Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, *et al.* Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr* 2005; 94:452-81.
- Alvidrez A, González BE, Jiménez Z. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales *Rev Salud Pública y Nutr* 2002; 3:3.
- Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Hongos y musgos del Valle de Aburrá. Medellín, Colombia; 2000.
- Baum C, Moxon D, Scott M. Enfermedades gastrointestinales. En: Bowman y Russell A, editores. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 8a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; 2003.p.516-527.
- 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 No 1:166.
- Beisel WR. Nutrition and infection. *Nutritional biochemistry and metabolism*. Ed Linder, M.C., Appleton and Lange; 1991. p. 507-542.
- Beisel WR. Nutrition and immune function: an overview. *J. Nutr* 1996; 126:2611S -2615.
- Bello J. Alimentos con propiedades saludables especiales. En: *Alimentos, composición y propiedades*. 1ª ed Interamericana España: Ed. Mc.Graw-Hill; 2000. p.343-355.
- Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* and agricultural substrates in Cuba. *Micol Aplic Int* 200; 13(1):25-29.
- Bermúdez RC, Donoso C, Martínez 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, Martínez 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.
- Black A. Hipersensibilidad retardada: teorías actuales con una perspectiva histórica. *J Dermatology Online* 1999; 5(1):7-10.
- Bowman B, Russell A. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 8ª ed. Washington. International Life Sciences Institute. *Publicación Científica y Técnica* No 592. Organización Panamericana de la Salud, 2003.
- Boza JJ, Moennoz D, Vuichod J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritschè, Donet A, *et al.* Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr* 1999; 129:1340-1346.
- Brizuela MA, García L, Pérez L, Mansur M.. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:69-74.
- Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *J Biochem* 1956; 62:315-323.
- Cahill-Morasco R, Hoffman RS, Goldfrank LR. The effects of nutrition plasma cholinesterase activity and cocaine toxicity in mice. *J. Toxicol Clin* 1998; 36(7):667-672.

- Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? Br J Nutr, 2002; 88: 165S -177.
- Candela C, *et al.* 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 C, Cadavid J. Evaluación y optimización técnico económica de las instalaciones de un cultivo de hongos (*Pleurotus ostreatus*) utilizando como sustrato pulpa de café. Tesis de grado (Ingeniero Agrícola). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola. 1999.75p.
- Chandra RK. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. Am J Clin Nutr 1991; 53:1087-1091.
- Chandra RK. Nutrition and immunoregulation. Significance for host resistance to tumors and infectious diseases in human and rodents. J Nutr 1992; 122:754-757.
- Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. Am J Clin Nutr 1997; 66(2):4605-4635.
- Chang ST, Buswell JA. Mushroom, Nutraceuticals. World J of Microbiol & Biotechnol 1996;12:473-476.
- Chang ST, Buswell JA. Medicinal Mushrooms a prominent source of nutraceuticals for the 21<sup>st</sup> century. Curr Topics Nutraceut Res 2003; 1:257-280.
- Chang ST, Miles PhG. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effects, and environmental impact. CRC Press. Boca Raton Florida; 2004.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science 2004; 303:1010-1014.
- Christian L, Alejo N. Indicadores inmunológicos en la evaluación del estado nutricional. Rev Cub Aliment y Nutr 1993; 7(1):48-51.
- Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of Wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Apl Microbiol Biotechnol 2002; 58(5):582-594.
- Costa R, Cunha V, Carvalho MR. The immunomodulator role of  $\beta$ -D-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. Rev Bras Nutr Clin 2006; 21(2):163-168.
- Cui J, Chisti Y. Polysaccharopeptides of coriolus vesicolor: Physiological activity, uses, and production. Biotechnol Adv 2003; 21:109-122.
- Davidsohn I, Nelson DA. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Ciudad de La Habana. Editorial Científico Técnica; 1985. p.103-107.
- 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 MYa, Wasser SP, 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.
- Dong Q, Yao J, Yang XT, Fang JN. Structural characterization of water-soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. Carbohydrate Research 2002; 337: 1417-1421.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956; 28:350-356.

- Farrera P. Medicina Interna. 13<sup>ra</sup> ed. Madrid: Ediciones Doyma S.A. y Mosby Doyma Libros S.A; 2000.
- Faure M, Moennoz D, Montigon F, Mettraux C, Breuille D, Ballevre O. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *Nutr* 2005; 135(3):486 - 491.
- Ferrera L. Evaluación preliminar del efecto *in vitro* del extracto F-I de *Pleurotus spp.* sobre el sistema complemento. Trabajo de Diploma en Opción al Título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. 2005.49p.
- Flórez J. Farmacología Humana. 3<sup>ra</sup> ed. Barcelona: Masson, S.A; 1998.
- Fraga GI, Giampaolo BN, Albertengo ME, Chiale CA. Control de endotoxinas bacterianas en productos biológicos obtenidos por técnicas ADN recombinantes. Importancia de la expresión de las unidades. *Rev Asociación Argentina Farmacia-Bioquímica Industrial* 1999; 38(98): 9-17.
- Fraker P. Nutrición e inmunidad: alteración de la linfopoyesis en ratones con deficiencias de Zinc. En: Bowman B y Russell A, editores. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8a ed. Organización Panamericana de la Salud; 2003.
- Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Exp Biol Med* 2001; 226(8):758-765.
- 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.
- Gao Y, Zhou SH, Huang M, Xu A. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllophoromycetidae) a review. *Int J Med Mushr* 2003; 5:235-246
- Gao Y, Zhou SF. Chemopreventive and tumoricidal properties of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr)Lloyd(Aphyllophoromycetidae). Part I. Preclinical and clinical studies (review). *Int J Med Mushr* 2004; 6(2): 95-106.
- 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; Vol. IX (2).
- Gubareva AA. The use of enzymes in treating patients with malignant lymphoma with large tumour mass. *Lik Sprava* 1998; 6:141-143.
- Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales. La Habana, Cuba. MINSAP. 1997.
- Guzmán ME, Rabello A, Miguel V, Teles G. Recovery from malnutrition in rats with or without the addition of dietary food supplements, vitamins and minerals during the growth period. *Rev Nutr* 2004; 17(1).
- Halpern GM, Miller AH. Medicinal Mushrooms. Ancient Remedies for modern ailments. M. Evans and Company, New York; 2002.
- Harada T, Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. Effect of SSG, 1,3- $\beta$ -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? *Nutr Hosp* 2004; XIX (6):325-332.
- Hobbs, Ch. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A literature review. *Int J Med Mush* 2000; 2:287-302.

- Hobbs, Ch. Medicinal value of Turkey tail fungus *Trametes versicolor* (L.: Fr) pilát (Aphyllorphomycetidae). A literature review. *Int J Med Mush* 2004; 6:195-218.
- Horio H, Ohtsuru M. Maitake (*Grifola frondosa*) improve glucose tolerance of experimental diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2001; 47(1):57-63.
- Hsieh TH, Kunicki J, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Effects of Extracts of *Coriolus versicolor* (I'm-Yunity™) on Cell-Cycle Progression and Expression of Interleukins-1 $\beta$ ,-6, and -8 in Promyelocytic HL-60 Leukemic Cells and Mitogenically Stimulated and Nonstimulated Human Lymphocytes. *J Alternative and Compl Med* 2002; 8 (5):591-602
- Ishurd O, Zgheel F, Kermagi A, Flefla M, Elmabruk M. Antitumor Activity of  $\beta$ -D-Glucan from Libyan Dates. *J Med Food* 2004; 7 (2):252-255.
- Karmali, A. The role of mushroom nutrition as a delivery agent for enzyme therapy in cancer care? Chemical and biological properties in mushroom nutrition. *Micology News*, 2003; 1(7).
- Kanazawa M, Mori Y, Yoshihara K, Iwadate M, Suzuki S, Endoh Y *et al.* 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 (Agaricomycetidae). *Int J Med Mush* 2003; 5:391-396.
- Kawagishi H, Hamajima K, Inoue Y. Novel hydroquinone as a matrix metallo-proteinase inhibitor from the mushroom, *Piptoporus betulinis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:2748-2961.
- 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.
- Keusch GT. Malnutrition and the thymus gland. Nutrient modulation of the immune response. New York: Ed. Cunnighan-Rundlles. Marcel Dekker; 1993. p. 283-299.
- Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr* 2003; 133:336-340.
- Kim YS, Maslinski W, Zheng XX, Stevens AC, Li XC, Tesch GH. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/F $\gamma$  2a protein blocks delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1998; 160:5742-5748.
- Kim HW, Kim BK. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetidae). *Int J Med Mush* 1999; 1: 121-138.
- Klein G, Vellenga E, fraaije MW, Kamps WA, De Bonts E. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 50: 87-100.
- Kodama N, Komuta K, Nanba H. Can maitake MD-Fraction aid cancer patients? *Altern Med Rev* 2002; 7:236–239.
- Kodama N, Asakawa A, Inui A. Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Oncol Rep* 2005; 13(3):497-502.
- Lee S, Park S, Oh JW, Yang C. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Med* 1998; 64(4):303-308.
- Lesourd B. Undernutrition: a factor of accelerated ageing in healthy and diseased aged persons. In *Handbook of Nutrition in the Aged Persons*, (RR Watson, editor). New York: CRC Press; 2000. p. 145-158.

- Lesourd B. Nutrition: a major factor influencing immunity in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2004; 8:28-37.
- Li J, King BK, Jann PG, Renegar KB, Kudsk KA. Glicyl-L-glutamine enriched total parenteral nutrition maintains small intestine gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. *Parenter. Ent. Nutr* 1998; 22(1): 31-36.
- Li Y, Mi C. Proliferation inhibition and apoptosis on set in human ovarian carcinoma cell line SKVO3 induced by genistein. *Ai Zheng* 2003; 22:586-591.
- Lipkin M. Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells. *Physiology of the gastrointestinal tract*: ed. Johnson, L.R., Raven, New York, 1987. p. 255-284.
- Lotfy OA, Saleh WA, el-Barbari M. Estudy of some changes of cell-mediated immunity in protein-energy malnutrition. *J Egypt Soc Parasitol* 1998; 28(2): 413-428.
- Lowry HO, Rosebrough A, Farr L, Randall JR. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem*, 1951; 193:265-275.
- Manual MERCK.. 10<sup>ma</sup> ed. Edición del centenario. Ediciones Harcourt, S.A. 1999
- Manhart N, Vierlinger K, Bergmeister H, Boltz-Nitulescu G, Spittler A, Roth E. Influence of short-term protein malnutrition of mice on the phenotype and coestimulatory signals of lymphocyte from spleen and Peyer's patches. *Nutr* 2000; 16(3): 197-201.
- Manohar V, Talpur NA, Echard BW. Effects of a water-soluble extract of maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentrations in KK mice. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4(1):43-48.
- Marques de Souza C, Peralta R. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat solid state medium. *J Basic Microbiol* 2003; 43(4): 278-286.
- Martínez-Carrera. D. La producción de *Pleurotus* en México. En: *Memorias del Primer Simposio Nacional de Hongos Comestibles*. (Pachuca, Hgo. SEP). INIFAP/UAEH; 1998. p.33-38.
- 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.
- Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava JM, Astola J, Vatheristo L *et al*. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food chem* 2001; 49:2343-2348.
- Mc Carter, MD, Naama HA, Shou J. *et al*. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein-calorie malnutrition. *Cell Inmuno* 1998; 183(2):131-133.
- Mc Clain CJ, Hill DB, Kugelmas M, Marsano L. Nutrición y enfermedad hepática. En: Bowman y Russell A, editores. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 8a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; 2003.p.528-542.
- Mc Kenna DJ, Jones K, Hughes K. *Reishi Botanical Medicines*. The desk reference for major Herbal Supplements. 2<sup>nd</sup> Ed.; The Haworth Herbal Press: New York, London, Oxford; 2002. p.825-855.
- Mc Murray, JR. Plasma Proteins. In: *Practical Clinical Biochemistry*. Ed. Gowenbock, A.H., Heinemann, Oxford; 1988. p.401-435.
- Meletis ChD, Barker JE. *Medicinal Mushrooms: A Selective Overview*. *Alternative & Complementary Therapies* 2005; 11(3): 141-145.

- Miles PG, Shu-Ting Ch. *Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales.* Hong Kong. World Scientific; 1997.
- Miranda M, Cuéllar A. *Farmacognosia y productos naturales.* Ed: Ciudad de la Habana. Felix Varela; 2001.
- Miura S, Izuta S. DNA polymerase as targets of anticancer nucleosides. *Curr Drug Targets* 2004; 5:191-195.
- Mizuno T. Bioactive biomolecules of mushrooms-food, function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev Int* 1995; 11:7-21.
- 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.
- Mook H, Bae S, Taeg G, Hee Y, Ho D, Doo N *et al.* Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J of Immunopharmacol* 1996; 18(5):295-303.
- Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Tamayo V. *et al.* Preliminar Characterization and Radioprotective effects of aqueous extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. 17 Conf. Inter. Química. 2002. ISBN: 959-207-0830.
- Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, Garcia N, Bermudez RC. Immunomodulating effects of the hot water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclofosfamide treated mice. *Micol Apl Intern* 2003; 15(1):7-13.
- Morris HJ. Obtención de un hidrolizado proteico de *Chorella vulgaris* 87/1 y evaluación de sus propiedades inmunonutricionales en un biomodelo de malnutrición proteico-energética. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. 2007. 119p.
- Morris HJ, Carrillo O, Almarales A, Bermúdez RC, Lebeque Y, Fontaine R. *et al.* Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microbiol Techn* 2007(a); 40: 456–460.
- Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauradó G, Marcos J. A note on the *in vitro* macrophage –stimulating activity of water-soluble extracts from mycelium of *Pleurotus spp.* *Food Agric Immunol* 2007(b); 18(1):31-37.
- *Mycology Research Laboratories Ltd. (MRL)*. Noticias de Micología. 2004;1(8).
- Nakamura T, Akiyama Y, Matsugo S, Uzuka Y, Shibata K, Kawagishi H. Purification of caffeic acid as an antioxidant from submerged culture mycelia of *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mush* 2003; 5:163-167.
- Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi T, Mazda O, Takeuchi M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunophar* 2002; 2:1205-1211.
- Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SI, Henson DA. Immune response to obesity and moderate weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20:353-360.
- Nosálová V, Bobek P, Cerná S. *et al.* Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol Res* 2001; 50:575-581.
- 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. Rev Cub Química. 2006; XVIII (3):78-83.
- Ooi VEC, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharide. Int J Med Mush 1999; 1:195-206.
- Ortiz C, Celaya S. Nutrición-Inmunidad. En Celaya S (Ed). Tratado de Nutrición Artificial, Zaragoza; 1998. p.83-93.
- Ossowski L, Lopez MR. 1996. Proteolytic enzymes in cancer invasion. Introduction. Enzyme Protein, 49:5-6
- Paul Yamaguchi & Associates. Japan's Nutritional Supplement Tarrytown, NY, Market Report; 2005.
- Paulik S, Svrcec K, Mojzisojva 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
- 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.
- Pico M, Giraldivo I, Otero A. Inmunología experimental. Ciudad de la Habana: Editorial Felix Varela; 1997.
- Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PR, Molitermo RA, Felipe I, Mathias PC. Long-Term Effect of Early Protein Malnutrition on Growth Curve, Hematological Parameters and Macrophage Function of Rats. J Nutr Science and Vitamin 2006; 52 (6):414-420.
- Poutsiaika DD, Mengozzi M, Vannier E, Sinha B, Dinarello CA. Cross linking of the  $\beta$ -Glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. Blood 2003; 82(12):395-700.
- Reshetnikov SV, Wasser SP, Tan KK. Higher Basidiomycetes as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides. Int J Med Mush 2001; 3: 361- 394.
- Ribeiro RPP, De Oliveira LM, Dos Santos JE. Selection of an intact casein or casein hydrolysate diet by rats submitted to protein deprivation and bowel resection. Physiol. Behav 1998; 63(2): 185-189.
- Rice PJ, Adams EL, Ozment-Skelton T, Gonzalez AJ, Goldman MP, Lockhart B E, *et al.* Oral Delivery and Gastrointestinal Absorption of Soluble Glucans Stimulate Increased Resistance to Infectious Challenge. J Pharmacol and Exp Therapeutics 2005; 314:1079-1086.
- Rodríguez E, Nuero O, Guillén F, Martínez AT, Martínez M.J. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase . Soil Biol & Bioch 2004; 36: 909–916
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 5<sup>th</sup> ed. London: Mosby Int limited; 1998.
- Rojas de Perdomo L. Cocina prehispánica. Historia de la cocina. Bogotá: Voluntad;1994.
- Roller M, Rechkemmer G, Watzl B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. J Nutr 2004; 134:153-156.
- 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.

- Rut, M. Kuasny Prumyse 1973; 19: 131. [citado en: Otero, M.A. Unicellular protein for human consumption. Editorial Científico-Técnica, Havana, Cuba1985].
- Sánchez A, Royse B. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Editorial Limusa S.A; 2002.
- Sánchez V. Inmunocompetencia en la malnutrición proteico energética. Rev Cub de Aliment y Nutr 1999; 13(2):129-135.
- Schaible UE, Kaufmann HE. Malnutrition and infection: Complex mechanisms and global impacts. Plos Med 2007; 4(5):115.
- Schuftan C, Ramalingaswani V, Levinson FJ. Micronutrients deficiencies and protein-energy malnutrition. Lancet 1998; 351:1812.
- Serrano Ríos, Manuel *et al.* 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, editores. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; 2003.p.746-761.
- Shills ME, Olsen JA, Shike M, Ross AC, editors. Modern nutrition in health and disease. 10 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
- Shimizu S, Kitadam H, Yokota H, Yamakawa J, Muryama T, Sugiyama K, *et al.* Activation of the alternative complement pathway by *Agaricus blazei* Murrill. Phytomedicine 2002; 9: 536-545.
- Shin Y, Tamai Y, Terazawa M. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil (Aphyllphoromycetidae) III: A new triterpene 3 $\beta$ ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene from sclerotia. Int J Med Mush 2000; 2:201-207.
- Shiuan C, Sei-Ryang O, Sheryl P, Gene H, Jing Y, Sum K, *et al.* Anti-Aromatase Activity of Phytochemicals in White Button Mushrooms (*Agaricus bisporus*) Cancer Research 2006; 66(15): 12026-12034.
- Sigarroa A. Biometría y Diseño Experimental, t1. Ciudad de La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1985.
- Smith JE, Rowan NJ, Tan KK. Functional food science and medicinal mushrooms. Int J Med Mush 2000; 2:277-285.
- Smith JE, Rowan NJ, Sullivan R. Medicinal mushrooms. Their therapeutic properties and current medicinal usage with special emphasis on cancer treatments. A special report Commissioned by Cancer Resarch UK. The University of Strathclyde in Glasgow, Glasgow. 2002.
- 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.
- Singla PN, Chand P, Kumar A, Kachhawaha JS. Serum magnesium levels in protein-energy malnutrition. J Trop Pediatr 1998; 44(2):117-119.
- Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei*, Murrill fractions *in vitro*. Cell Structure and Function 2001; 26:103-108.
- Soto RA, González AE, Villar JC. Aplicación de hongos ligninolíticos al blanqueo de pastas al sulfato. Iberoamerican Congreso on Pulp and Paper Research.. 2000.
- Stamets P. Growging gourmet and medicinal mushrooms. 3<sup>rd</sup> 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.
- Sujatha R, Norhanum AW, Noorlidh A, Nuharyati ZA, Vikineswary S. Medicinal properties selected *Pleurotus spp.* cultivated in Malaysia. World Society for Mushrooms Biology Musroom Products 2005.
- 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
- Sutherland IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends-Biotechnol. 1998; 16(1):41-46
- Taylor P, Brown G, Reid D *et al.* 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.
- Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. J Nutr 2001; 5 :1409-1413.
- Tsuchida H, Mizuno M, Taniguchi Y, Ito H, Kawade M, Akasaka K. Glucomannam separated from *Agaricus blazei* mushroom culture and antitumor agent containing as active ingredient. JP Patent No. 11-080206, publ. 26.03. 2001.
- Van Binsbergen JJ. Nutrition science and disease in the medical history of the 20<sup>th</sup> century. Ned Tijdschr Geneesk 1999; 143(44):2204-2207.
- Walrand S, *et al.* Aging: a barrier to renutrition? Nutritional and immunologic evidence in rats American J Clinical Nutr 2000; 72(3): 816-824.
- Wang W, Waters SJ, Macdonald JR, Roth C, Shentu S, Freeman J *et al.* Irofulven (6-hydroxymethylacylfulvene, MGI 114) induced apoptosis in human pancreatic cancer cells is mediated by ERK and JNK kinases. Anticancer Res 2002; 22:559-564.
- 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 21<sup>st</sup> Century. Int J Med Mush 2004; 6:231-248.
- Wasser SP, Didukh M, Nevo E. Antitumor and immunomodulatory activities of medicinal mushroom polysaccharide and polysaccharide-protein complexes in animals and humans (Review). Myc Balc 2005; 2:221-250.
- Wasser SP. Shiitake (*Lentinus edodes*). Encyclopedia of Dietary Supplements, New York: Ed Marcel Decker; 2005(a). p. 653-664.
- Wasser SP. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). Encyclopedia of Dietary Supplements New York: Ed Marcel Decker; 2005(b).p. 603-622.
- Wilment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta- glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. J Biol Chem 200; 276:43818-43823.
- Wu TS, Shi LS, 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 2000-217543, Publ. 08.08.2000.
- Yang CS, Prabhu S, Landan J. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols. *Drug Metab Rev* 2001; 33:237-253.
- 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.
- Yoshizawa Y, Enomoto A, Todoh H. *et al.* Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae (*Porphyria yezoensis*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 1993; 57(11):1862-1866.
- Yoshizawa Y, Tsunehiro J, Nomura K. *et al.* In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996; 60(10): 667-671.
- Zaidman B, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushrooms modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 67:453-468.
- Zaldívar C. *et al.* *Vegetales y Salud*. Tabloide. Curso universidad para todos. Ciudad de la Habana: Casa Editora Abril; 2004.
- Zamora-Martínez MC, Nieto PP. Natural production of wild edible mushrooms in the southwestern rural territory of Mexico city, Mexico. *Forest Ecology and Management* 1995; 72:13-20.
- Zeisel S. Regulation of "nutraceuticals". *Science* 2000; 285:1853-1855.
- Zhou Sh, Gao Y, Chen G, Dai X, Ye X, Gao H. A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst (Ling Zhi, Reishi mushroom) extract patients with chronic hepatitis B. *Int J Med Mush* 2002; 4:321-328.