



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL



**Biotecnología
Industrial**

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

Algunos efectos inmunomoduladores de un extracto micelial de *Pleurotus spp.*
en biomodelos *in vivo* e *in vitro*.

Autor: Lic. Yaixa Beltrán Delgado.

Tutor: Dr C. Humberto Joaquín Morris Quevedo.
Dra C. Olimpia Victoria Carrillo Farnés.

Santiago de Cuba

2008

“Año 50 de la Revolución”

Agradecimientos

Le agradezco en primer lugar a la vida, por darme esta oportunidad.

A mi tutor y amigo Humberto J. Morris Quevedo, por su sabiduría y apoyo incondicional en todo momento.

A mi compañero de vida, por estar a mi lado, apoyándome y comprendiéndome sobre todas las cosas.

A mis profesores de la maestría y de mi especialidad por haberme formado durante todo este tiempo.

A mis compañeros de trabajo del Departamento de Biología.

A mis eternas profesoras, amigas y madres Lilia Bravo Redondo y Ana María Pardo.

A los compañeros del CEBI, que tanto han contribuido a esta tesis, por su disposición a ayudar y su interés por cada detalle del trabajo, en especial: Yamila Lebeque, Miladys, Roberto, Gabriel Llauradó y Migdalia.

A Nelsa Soria, Gustavo, Alejandro Chacón y Yoan Roberto Espinosa, por su ayuda incondicional. Gracias una y otra vez.

A mi amigo incondicional Frank Suárez Vaillant, por estar siempre a mi lado de todas las formas posibles.

A mi familia en general.

A todos aquellos que intervinieron de alguna manera en la realización de esta tesis.

Dedicatoria

Vida...

Ya perdoné errores casi imperdonables, traté de sustituir personas insustituibles y olvidar personas inolvidables.

Ya hice cosas por impulso, ya me decepcioné con personas

Cuando nunca pensé decepcionarme, más también decepcioné a alguien.

Ya abracé para proteger, ya me reí cuando no podía, ya hice amigos eternos, ya amé y fui amado, pero también fui rechazado, ya fui amado y no supe amar.

Ya grité y salté de tanta felicidad, ya viví de amor e hice juramentos eternos pero también "me rompí el corazón "muchas veces.

Ya lloré escuchando música y viendo fotos, ya llamé sólo para escuchar una voz, ya me enamoré por una sonrisa, ya pensé que iba a morir de tanta nostalgia y...

...tuve miedo de perder a alguien especial (y terminé perdiéndolo) pero sobreviví!

Y todavía vivo!

No paso por la vida...

Y tu tampoco deberías pasar... vive!!!

Bueno es ir a la lucha con determinación, abrazar la vida y vivir con pasión, perder con clase y vencer con osadía, porque el mundo pertenece a quien se atreve.

y...

la vida es mucho

para ser insignificante!

Charles Chaplin.

Resumen

En el presente trabajo, fueron obtenidos, mediante procedimientos de tratamiento térmico, extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.* La flexibilidad en las condiciones de extracción favoreció el predominio de los carbohidratos y/o proteínas. Fue seleccionado el extracto micelial para las evaluaciones inmunológicas, en función del contenido mayoritario de carbohidratos (70.4 %) y las condiciones controladas con que se desarrolló este cultivo. La administración, a dosis única (100 mg/kg), del extracto micelial a ratones Balb/c inmunocompetentes estimuló la actividad funcional del sistema monocito-macrófago e incrementó la permeabilidad vascular. El extracto micelial moduló la recuperación inmunológica de ratones Balb/c irradiados, estimulando la actividad hematopoyética de la médula ósea y el bazo, así como el incremento en el conteo de linfocitos y neutrófilos en sangre periférica y la activación del sistema monocito- macrófago. El extracto ejerció diferentes efectos inmunomoduladores *in vitro*, como la estimulación de la actividad enzimática de macrófagos peritoneales murinos y la activación del sistema autolítico microbiano y de la vía alternativa del sistema complemento. Atendiendo a los marcadores estudiados, el extracto evaluado puede ser considerado como un biopreparado inmunomodulador, lo que podría sustentar sus aplicaciones futuras en el campo de la inmunoterapia.

Abstract

In this work, aqueous extracts from mycelium and fruiting bodies of *Pleurotus* spp. were obtained by means of procedures of thermal treatment. The flexibility of the extraction conditions lead to the prevalence of the carbohydrates and/or proteins. For the immunologic evaluations, the mycelial extract was selected taking into account its higher content of carbohydrates (70.4%) and the controlled conditions in which the culture was developed. The administration as a single dose (100 mg/kg), of the mycelial extract to immunocompetent Balb/c mice stimulated the functional activity of the monocyte-macrophage system and increased the vascular permeability. The mycelial extract modulated the immunological recovery of irradiated Balb/c mice, stimulating the haematopoietic activity of the bone marrow and the spleen, as well as increasing in peripheral blood in the lymphocyte and neutrophils counts it also activated of the monocyte-macrophage system. The extract exerted different *in vitro* immunomodulating effects like the stimulation of the enzymatic activity of murine peritoneal macrophages, the activation of the autolytic microbial system and of the alternative pathway of the complement system. Accordingly to the studied markers, the extract would be considered as an immunomodulating biopreparation, which could sustain its future applications in the field of the immunotherapy.

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Consideraciones generales sobre la biología y cultivo de *Pleurotus spp.*

1.1.1 Caracterización general de *Pleurotus spp.*

1.1.2 Sustratos y condiciones de cultivo

1.2 Propiedades nutricionales y medicinales de *Pleurotus spp.*

1.2.1 Propiedades nutricionales

1.2.2 Propiedades medicinales

1.3 Polisacáridos con propiedades inmunomoduladoras: β - glucanos

1.4 Evidencias experimentales y clínicas de la actividad inmunomoduladora de glucanos aislados de hongos superiores

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de extractos acuosos de *Pleurotus spp.*

2.1.1 Cepa utilizada

2.1.2 Cultivo sumergido de *Pleurotus spp.*

2.1.3 Fermentación en estado sólido (FES)

2.1.4 Extracción de la biomasa de *Pleurotus spp.*

2.1.4.1 Extracto del micelio obtenido mediante cultivo sumergido

2.1.4.2 Extractos de cuerpos fructíferos obtenidos por fermentación en estado sólido (FES).

2.2 Caracterización preliminar de los extractos

2.2.1 Determinación del contenido de materia seca

2.2.2 Determinación de la concentración de proteínas

2.2.3 Determinación de la concentración de carbohidratos

2.2.4 Determinación de la concentración de ácidos urónicos

2.3 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vivo*.

2.3.1 Efecto de la administración endovenosa a dosis única sobre el sistema monocito-macrófago en ratones Balb/c inmunocompetentes.

2.3.2 Estimulación de la permeabilidad vascular

2.3.3 Efectos radioprotectores en ratones Balb/c

2.4. Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vitro*.

2.4.1 Evaluación de la capacidad de activación del sistema autolítico microbiano.

2.4.2 Activación de la vía alternativa del complemento (APC).

2.4.3 Activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos.

2.5 Análisis estadístico

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención y caracterización de los extractos de *Pleurotus spp.*

3.1.1 Cultivo sumergido

3.1.2 Fermentación en estado sólido.

3.2 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vivo*.

3.2.1 Efecto de la administración a dosis única sobre el sistema monocito-macrófago en ratones Balb/c inmunocompetentes.

3.2.2 Estimulación de la permeabilidad vascular

3.2.3. Efectos radioprotectores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en ratones Balb/c

3.3 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vitro*.

3.3.1 Evaluación de la capacidad de activación del sistema autolítico microbiano.

3.3.2 Activación de la vía alternativa del complemento.

3.3.3 Activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

Introducción

Las investigaciones acerca de las enfermedades que afectan al sistema inmune, son de gran interés en la actualidad, por las implicaciones que estas ocasionan al humano. De ahí que se realicen innumerables esfuerzos en la búsqueda de nuevos agentes inmunoterapéuticos, desprovistos de reacciones adversas. En este sentido, en los últimos años, se ha retomado el interés en la incorporación al acervo de la inmunoterapia de sustancias de variadas fuentes biológicas (levaduras, algas, bacterias, líquenes, plantas superiores y especialmente, hongos), con capacidad de estimular a las células del sistema inmunitario, como macrófagos, células “natural killer” (NK), linfocitos, e inducir la síntesis de citoquinas (Werner y Jolles, 1996).

Las aplicaciones biotecnológicas de los Basidiomicetos han contribuido a un mejor conocimiento del tema. Esto se debe a la facilidad con que se pueden cultivar y obtener extractos ricos en sustancias biológicamente activas, como los polisacáridos, a partir del medio de cultivo, micelio y cuerpos fructíferos.

Se plantea que las principales biomoléculas responsables de la acción inmunomoduladora y antitumoral son carbohidratos poliméricos 1, 3- β -D-glucanos, pertenecientes al grupo de los modificadores de la respuesta biológica (BRMs), los cuales son capaces de modular la respuesta inmunitaria del huésped sin ejercer una acción citotóxica directa sobre la célula (Kim y col., 1996).

En la medicina oriental el objetivo principal en la obtención de bioproductos a partir de hongos superiores, es regular la homeostasia del organismo y restaurar el estado de salud en los individuos enfermos (Chihara y col., 1992).

A pesar de la amplia información sobre las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de bioproductos obtenidos de hongos superiores, las investigaciones efectuadas en *Pleurotus spp.* han tenido un carácter limitado y, por otra parte, existen pocas evidencias experimentales con relación a posibles mecanismos de acción.

En el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), el área de Biotecnología Industrial desarrolla un proyecto que aborda la evaluación de las propiedades farmacológicas de extractos acuosos de *Pleurotus spp.* En este contexto, la presente tesis aportaría nuevas evidencias experimentales al conocimiento de las potencialidades inmunomoduladoras de este género, particularmente en la obtención y evaluación de la actividad biológica de un extracto micelial.

Tomando en consideración estos antecedentes, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis

Si existen evidencias experimentales y clínicas relacionadas con las propiedades inmunomoduladoras de bioproductos aislados de Basidiomicetos, entonces es posible que un extracto micelial de *Pleurotus spp.* posea un efecto estimulador sobre el sistema inmunitario al ser evaluado en biomodelos *in vivo* e *in vitro*.

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

Evaluar algunos efectos inmunomoduladores de un extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vivo* e *in vitro*.

Para su cumplimiento, se derivaron los siguientes objetivos específicos:

- Obtener, mediante procedimientos de tratamiento térmico, extractos acuosos de micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.* y determinar su composición macromolecular fundamental.

- Evaluar los efectos moduladores de un extracto micelial de *Pleurotus spp.* sobre diferentes mecanismos inmunológicos en ratones Balb/c inmunocompetentes y en el biomodelo de ratones irradiados.

- Evaluar la actividad *in vitro* del extracto micelial de *Pleurotus spp.* sobre el sistema autolítico microbiano, la vía alternativa del complemento y la activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos.

Capítulo 1. Revisión bibliográfica.

1.1 Consideraciones generales sobre la biología y cultivo de *Pleurotus spp.*

Los hongos comestibles tuvieron gran importancia en la forma de vida y en el desarrollo de las sociedades recolectoras-cazadoras del período preneolítico. En la literatura etnográfica mundial se encuentran evidencias sobre el consumo de hongos comestibles en la América prehispánica, plasmadas en códices indígenas y en las descripciones de misioneros y soldados españoles del siglo XVI (Villareal y Pérez, 1989).

En la antigua Grecia, las setas se consideraban como “el alimento de los dioses”, ya que proporcionaban fuerza a los guerreros y romanos. En China, por su parte, eran valorados como un alimento saludable y lo denominaban “el elixir de la vida” (Chang y Buswell, 1996).

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

En la región de América Central y Latinoamérica, los principales productores son México, Brasil y Colombia, siendo México el mayor productor de Latinoamérica, generando alrededor del 58 % de la producción total de la región (Martínez-Carrera, 2005).

Los principales productores mundiales son China y Estados Unidos con una contribución de 39 % y 13 % respectivamente. El resto de la producción se concentra en Japón, Alemania, Holanda, Francia, Polonia, España y Canadá principalmente (Chang y Miles, 2004).

Según Zadrazil, 1978, *Pleurotus ostreatus* se cultivó en varias regiones de Europa desde 1900 como una de las "seis grandes" setas cultivadas, conjuntamente con *Agaricus*, *Lentinula*, *Auricularia*, *Volvariella*, *Flammulina*. La producción total de *Pleurotus spp* en la última década del siglo XX superó las 25 000 toneladas (Miles y ShuTing, 1997).

1.1.1 Caracterización general de *Pleurotus spp*

Es un género de hongos superiores que crece, de forma natural, sobre troncos y restos de vegetales. Pertenece al grupo de las setas comestibles y es muy apreciado por el olor y sabor agradables de los cuerpos fructíferos. Recibe la denominación de hongo oreja por su morfología.

Clasificación Taxonómica

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

Es un grupo cosmopolita, fácil de cultivar, en comparación con otros grupos comerciales. Dentro de las especies más conocidas por los cultivadores predomina *Pleurotus ostreatus*, debido a la gran variedad de sustratos sobre los cuales puede crecer gracias a la elevada plasticidad fenotípica y genética que posee.

1.1.2 Sustratos y condiciones de cultivo

En general, *Pleurotus spp.* se cultiva en materiales lignocelulósicos, los cuales constituyen los sustratos orgánicos más abundantes del planeta, producidos fundamentalmente por las plantas (Sánchez y Royse, 2002).

En un estudio realizado por Muller (1998) con varios hongos de la degradación primaria, *Pleurotus spp.* se mostró como la especie más adecuada para la utilización de los desechos agrícolas, los cuales se pueden pretratar mediante fermentación semi-anaeróbica, para luego aprovecharlos en la producción de alimento humano y forraje. Esta característica del hongo puede ser potencialmente importante para el manejo de los desechos de café, ya que el 60% del fruto de café está constituido por la pulpa y el mucílago, materiales de la zona cafetalera (Rodríguez y Jaramillo, 2005).

Diwkar y col. (1989), refieren para el cultivo de *Pleurotus spp.* la utilización de hollejos de semillas de maní, garbanzo, tamos de maíz, bagazo de caña, residuos de algodón y desechos de papel. Kerem y col. (1992), encontraron que *Pleurotus spp.*, creciendo sobre cascarilla de algodón, ejerce una fuerte acción selectiva por la lignina y presenta actividad de la enzima lacasa en el extracto acuoso.

Para establecer los rendimientos en el cultivo de hongos comestibles se ha utilizado el concepto de producción de carpóforos por metro cuadrado, por siembra o ciclo, que, en el caso de los champiñones, puede variar de 16 a 30 kg/m², equivalente a 100-110 kg de porcentaje del peso fresco de hongos cosechados en función del peso seco del sustrato (Vedder, 1986). La eficiencia biológica de *Pleurotus spp.* en un sustrato determinado depende de las condiciones de cultivo y aún de las cepas utilizadas (Gaitán y Salmones, 1996). Se han encontrado eficiencias biológicas hasta de 186 % en el tamo de maíz, 50% en tusas de la misma planta y 15,7 % para el bagazo de caña de azúcar, cuyo valor está relacionado con el poco contenido de nitrógeno del sustrato (Acosta y col., 1988). Los bajos rendimientos de algunos sustratos se pueden mejorar mediante compostaje (Martínez-Carrera y col., 1990), o utilizando diferentes mezclas de lignocelulósicos (Mourlot, 2007) y aún con aditivos minerales u orgánicos (Gross, 2004).

Las condiciones apropiadas del ambiente y del sustrato al momento de la siembra de *P. ostreatus* son las siguientes: humedad relativa de 82 a 86 %; temperatura del sustrato entre 27,7 y 30°C y concentración de CO₂ del sustrato 2000 ppm. En estas condiciones, la incubación se lleva a cabo entre 10 y 14 días (Flegg y col., 1985). La humedad del sustrato en el momento de la pasterización debe ser de 70-75 % (Steineck, 1987) y el pH de 6,0 a 6,5 (Hincapié, 1993), el cual es considerado por Vedder, 1986 como ideal. La temperatura durante la fase de incubación es de 28° C (García, 1987) y en la de fructificación de 10-15 °C. Las diferentes especies se comportan de manera distinta cuando son influidas por diferentes niveles de temperatura (Zervakis y Balis, 1992).

En Cuba, específicamente en el CEBI, la producción de *Pleurotus spp* sobre sustratos de la agroindustria cafetalera fue introducido por Bermúdez y colaboradores, los cuales establecieron las condiciones óptimas para la preparación del inóculo y del sustrato (Bermúdez, 1994).

En las investigaciones relacionadas con la temática de obtención de sustancias farmacológicamente activas, se evidencia el empleo del cultivo sumergido para aislar productos fiables, consistentes y seguros. Existen trabajos que refieren la utilización de este método con diferentes medios de cultivo; tal es el caso del estudio realizado por Song y col. (1995) en la especie *Phellinus linteus*, en medio YPG. Por otra parte, la escasa información acerca del cultivo sumergido de *Pleurotus spp* evidencia la necesidad de estudiar, con más profundidad, su cultivo en estas condiciones controladas, orientado a la obtención de sustancias biológicamente activas a partir de su micelio.

1.2. Propiedades nutricionales y medicinales de *Pleurotus spp.*

1.2.1 Propiedades nutricionales.

El valor nutritivo de *Pleurotus spp.* ha sido reconocido desde hace mucho tiempo. Sus proteínas, en base seca, constituyen de un 19 a un 35%, y contienen todos los aminoácidos esenciales. Su valor nutritivo es más alto que el de las proteínas de plantas, con una calidad muy cercana a la de la proteína animal (Zamora Martínez y Nieto, 1995).

En adición a su valor como alimento rico en proteínas, los hongos contienen carbohidratos, en particular, carbohidratos poliméricos, como el glucógeno y la quitina, y varios compuestos carbonados de bajo peso molecular, como la glucosa, fructosa, galactosa, trehalosa, entre otros. Son ricos en minerales, como el potasio, el fósforo y el hierro. Contienen 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 de 1 hasta 15 % (Miles y Shuting, 1997).

Por otra parte, en el CEBI se han llevado a cabo investigaciones sobre la seta comestible *Pleurotus spp.* relacionadas, en particular, con el contenido de micosteroides,

precursores de la vitamina D, la calidad proteica de su biomasa y la influencia de factores ambientales, como la luz en dichos parámetros (Bemúdez y col., 2002,2003).

1.2.2 Propiedades medicinales.

Pleurotus ostreatus se encuentra en la lista de 37 especies de hongos descritas por Guzmán (1994), utilizadas en la medicina tradicional de Mesoamérica y México. Se describe como uno de los hongos que producen retardo en el crecimiento de tumores, posiblemente por la acción de un compuesto polisacárido que actúa como potenciador de la defensa del huésped. Su ventaja sobre las sustancias convencionales que destruyen las células tumorales radica en que no presenta efectos colaterales. Los compuestos quimioterapéuticos usados contra el cáncer suprimen las defensas del huésped contra las células tumorales y algunos agentes infecciosos (Miles y ShuTing, 1997).

Okuda y col. (1972) refirieron el aislamiento de polisacáridos antitumorales, tanto de *Flammulina velutipes* como de *P. ostreatus*. En éste último, el componente antitumoral activo de un extracto hidrosoluble consistió en un polímero formado por un esqueleto de 1,3 β -glucano, probablemente con ramificaciones de residuos de galactosa y manosa. Posteriormente, Yoshioka y col. (1975) aislaron componentes polisacáridos ácidos.

Se ha demostrado experimentalmente que la adición de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* a la dieta de ratas Wistar hembras tanto normo –como hipercolesterolémicas disminuye también el nivel de ácidos grasos en ambos grupos de ratas, comparados con el control. Reduce también los niveles de colesterol en el hígado. Un aumento significativo de la relación fosfolípido/colesterol en las aortas de ambos grupos de ratas sugiere un efecto antiaterogénico favorable (Bobek y col., 1990; Opetal y col., 1997).

Por otra parte, los hongos de la pudrición blanca, entre los que se encuentra *P. ostreatus*, poseen en su micelio sustancias con propiedades antioxidantes, por lo que pueden constituir una fuente potencial de bioantioxidantes o de preparaciones complejas con dichas propiedades (Kapich y Shishkina, 1992).

El pleurano, aislado a partir de *Pleurotus ostreatus*, muestra efectos inmunomoduladores, especialmente incrementando la actividad fagocítica (Paulik y col., 1996). Esta sustancia ha sido utilizada en el tratamiento experimental en ratas Wistar de la colitis ulcerativa inducida con ácido acético. El pleurano fue administrado oralmente al 10 % como parte de la dieta y resultó efectivo en la reducción del daño mucosal (Nosalova y col., 2001).

1.3 Polisacáridos con propiedades inmunomoduladoras: β -Glucanos

Los polisacáridos son un grupo estructuralmente diverso de macromoléculas biológicas de una extendida ocurrencia en la naturaleza. Se caracterizan por presentar rasgos estructurales repetitivos y son polímeros de residuos de monosacáridos, unidos entre sí por enlaces glucosídicos. De este modo, difieren estructuralmente de otras biomoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos. Los aminoácidos en las

proteínas y los nucleótidos en los ácidos nucleicos se enlazan de una sola manera, mientras que las unidades de los monosacáridos en los oligosacáridos y polisacáridos pueden hacerlo en varios puntos para formar una variedad amplia de ramificaciones o estructuras lineales. Esta enorme variabilidad potencial en la estructura de los polisacáridos proporciona la flexibilidad necesaria para los precisos mecanismos reguladores de las interacciones célula-célula en los organismos superiores (Kawaguchi, 2005).

Existen, además, polisacáridos inmunomoduladores derivados de una gran variedad de géneros microbianos, los cuales incluyen el ácido hialurónico de *Streptococcus spp.*, el polisacárido UN de *Bacteriodes fragilis*, el manano de *Candida albicans* y *Sacharomyces cereviciae*, cuya aplicación ha arrojado resultados significativos en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Granero y col., 1990). Los efectos antitumorales representan otra prometedora actividad biofarmacológica de los polisacáridos derivados de estas fuentes.

Los β -glucanos son polisacáridos formados por glucosa o sus derivados, unidos por enlaces de tipo β y tienen generalmente una función estructural. La conformación de los β -glucanos solubles ha sido clasificada en tres grupos: triple hélice, simple hélice y en arrollamiento al azar (Wasser y col., 2005).

Los β -glucanos fúngicos exhiben una variada actividad biológica e inmunofarmacológica y el significado de estas acciones depende de la estructura, solubilidad en agua, peso molecular, grado de ramificación y de la conformación (Yadomae, 2000). Existen reportes de que los polímeros (β -glucanos) tienen la capacidad de estimular diferentes tipos de células inmunes en animales y humanos mediante su unión a receptores específicos de membrana (Smith y col., 2003, Rowan y col., 2003).

Las investigaciones de hongos medicinales han centrado el interés en el descubrimiento de compuestos que puedan modular la respuesta biológica de células del sistema inmune (modificadores de la respuesta biológica, BRMs). La mayoría de los modificadores disponibles hoy día actúan mejorando la respuesta del organismo frente a los tumores; no obstante, van surgiendo sustancias capaces de interferir directamente en la regulación del crecimiento del tumor o de influir sobre el proceso de diferenciación (Wasser, 2002).

Especialmente, tienen aplicación en el tratamiento de inmunodeficiencias en combinación con antibióticos y también como adyuvantes vacunales (Jong y Birmingham, 1992). Se ha demostrado que estos compuestos potencian la respuesta inmunitaria innata y específica, lo cual es importante en el mantenimiento de la homeostasia del organismo.

Los β -glucanos son modificadores de la respuesta biológica con un potente efecto sobre el sistema inmunitario. Estas respuestas están mediadas por receptores de β -glucanos, como la Dectina1 murina. El receptor humano de β -glucanos es transmembranoso (tipo II), con un dominio simple de reconocimiento extracelular que contiene carbohidratos, el cual se expresa y funciona como un receptor de

reconocimiento de patrones. Las células que poseen el receptor pueden reconocer una variedad de β (1-3) o β (1-6) glucanos y también levaduras intactas. En contraste con el murino, el ARN m es empalmado alternativamente, resultando dos principales isoformas (A y B) y seis menores. Las isoformas principales difieren por la presencia de una región de unión separada del dominio de reconocimiento desde la zona transmembranosa y son las únicas isoformas funcionales para la unión del β - glucano. Además, el receptor humano, presente también en el linfocito T, en un sitio distinto del sitio de unión del β - glucano, induce el reconocimiento de ligandos endógenos y exógenos (Willment y col., 2001).

La activación del sistema complemento (vías clásica y alternativa) por β (1-3) - D glucanos que presentan diferentes ultraestructuras y grado de ramificación, aislados de la pared celular de hongos, se ha demostrado con el empleo de suero y plasma humanos (Susuki y col., 1992).

Muchas de las actividades inducidas por β - D glucanos, como la síntesis de óxido nítrico en macrófagos y la activación del factor G, dependen de la conformación. Otras, en cambio, son independientes, como la síntesis del interferón gamma (IFN- γ) y los factores estimulantes de colonias (CSFs). Estas actividades resultan farmacológicamente útiles, mientras algunas se relacionan con la alergia y reacciones inflamatorias adversas (Yadomae, 2000).

Los β -glucanos, cuando se administran, permanecen en el organismo, principalmente en el hígado y el bazo, por un largo período de tiempo (más de un mes), sin cambios en la estructura principal, al no ser ésta una vía específica del metabolismo. Sin embargo, actividades biológicas como el efecto antitumoral son reducidas más rápidamente (Miura y col., 1998).

Se ha investigado el efecto de β -glucanos derivados de *Sclerotinia sclerotiorum* en el crecimiento de *Micobacterium tuberculosis* H37RU en cultivos de macrófagos peritoneales, aislados de ratones Balb/c. Los resultados indicaron que los β -glucanos inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* en las células del hospedante *in vitro*, probablemente asociado a la estimulación celular o inhibición competitiva de la maquinaria de las bacterias por vía del CR3/CD11 b/18 (Hetland y Sandven, 2002).

En otro estudio previo realizado por Estrada y col. (1997) se demostró también que los β -glucanos, extraídos a partir de levaduras u hongos, son responsables de potenciar el sistema inmunitario. La actividad inmunomoduladora de β (1,3 - 1,4) - D- glucanos derivados de la cebada (OBG) fue investigada por su capacidad de estimular la producción de IL-1 y TNF-alfa a partir de macrófagos peritoneales murinos en la línea celular P338D1. Se refiere, además, su capacidad de aumentar la resistencia no específica para infecciones bacterianas en ratones.

Los polisacáridos de setas previenen la oncogénesis, y muestran actividad antitumoral directa contra varios tumores alogénicos y singénicos, así como en la metástasis tumoral. No atacan directamente las células cancerígenas, pero producen sus efectos antitumorales por diferentes mecanismos de activación de la respuesta inmune en el

hospedante. La acción antitumoral de estos polisacáridos requiere de las células T y por lo tanto, su actividad está mediada por mecanismos inmunes timo dependientes (Wasser, 2002).

1.4 Evidencias experimentales y clínicas de la actividad inmunomoduladora de glucanos aislados de hongos superiores.

Durante los últimos treinta años, se han venido estudiando las características bioquímicas y farmacológicas de polisacáridos activos con efectos inmunomoduladores, que en general, han sido purificados a partir del micelio, cuerpos fructíferos o del medio de cultivo de hongos superiores. En su mayoría constituyen β (1-3) - D glucanos, con ramificaciones β (1-6)-D glucopiranosidas como cadena lateral; otros polisacáridos han sido identificados como complejos polisacárido-proteína (Lee y col., 1996).

La investigación de los hongos medicinales se ha enfocado en la búsqueda de sustancias capaces de estimular la respuesta inmunitaria humana para ser empleadas en el tratamiento del cáncer y las inmunodeficiencias. Varias clases de compuestos, como proteínas, péptidos, lipopolisacáridos, glicoproteínas y derivados de lípidos, han sido considerados como moléculas que tienen efectos potentes en el sistema inmunitario (Tzianabos, 2000).

Dentro del grupo de las setas comestibles, pertenecientes a la clase Basidiomycetes, figuran varias especies, las cuales han sido investigadas con relación al aislamiento de fracciones polisacáridicas y su efecto antitumoral e inmunomodulador, como son: *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune*, *Phellinus igniarius*, *Grifola frondosa*, *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, *Trametes dickinsii*, *Phytophthora parasitica*, *Flammulina velutipes* y *Armillariella tabescens*. Muchos de los extractos o glucanos purificados han sido objeto de estudios preclínicos y algunos han alcanzado la fase de ensayos clínicos (Kim y col., 1996).

Wasser (2002) listó 651 especies y 7 taxa de 182 géneros de Basidiomicetos que presentan polisacáridos activos derivados de los cuerpos fructíferos, micelios y caldos de cultivos.

Los primeros glucanos inmunoestimulantes fueron descubiertos en Japón y nombrados: esquizofilano (polisacárido extraído del filtrado de cultivos del *Schizophyllum commune*) y lentinano (un glucano obtenido de la pared celular de *Lentinus edodes*), los cuales presentan una interesante conformación de triple hélice (Chihara, 1992). El esquizofilano (peso molecular de 450 KDa) se utiliza junto con el 5-fluoracilo en la terapia antitumoral clínica incrementando la sobrevida de los pacientes (Wasser y col., 2005). El lentinano, por su parte, 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).

En Japón, el esquizofilano (o Sonifilan, Sizofiran, Sizofilan) ha sido aceptado para el uso clínico. Los primeros ensayos clínicos con el esquizofilano en combinación con quimioterapéuticos convencionales (tegafur o mitomicina c y 5- fluorouracilo)

consistieron en un estudio aleatorizado desarrollado con 367 pacientes con cáncer gástrico recurrente e inoperable y en el cual se observó un aumento significativo en la sobrevida (Fugimoto y col., 1984). Más recientemente, el tratamiento con esquizofilano también ha conllevado a un aumento de la sobrevida global de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Kimura y col., 1994).

En las primeras investigaciones se llevó a cabo el fraccionamiento del lentinano para comprobar el efecto antitumoral, en líneas como el sarcoma 180. Algunas fracciones no presentaron dicho efecto y otras inhibieron el crecimiento tumoral pero a dosis superiores. Ciertas fracciones mostraron una máxima absorción con el Rojo Congo, lo que evidenció la contribución de polisacáridos con estructura β (1-3)-D glucanos en la cadena principal a la actividad antitumoral (Sasaki y col., 1985).

Más de 100 tipos de polisacáridos se han aislado a partir de *Ganoderma lucidum* y se destacan los β - glucanos por su actividad biológica (Gao, 2000). Algunos estudios han sugerido que la acción antitumoral de los polisacáridos podría ser el resultado de su efecto como modificador de la respuesta biológica (Chang, 1996).

El ganopolio, extracto acuoso de *G. lucidum*, ha demostrado poseer efectos inmunomoduladores a través de la activación de macrófagos, linfocitos T y las células NK. Se refiere que el extracto de *G. lucidum* puede incrementar significativamente la proliferación de linfocitos del ratón *in vitro* (Mojadadi y col., 2006).

Se ha demostrado también que polisacáridos de *G. lucidum* modulan la respuesta inmune, tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo el efecto inmunomodulador extensivo a células presentadoras de antígenos, sistema monocito-macrófago, la inmunidad humoral y celular y los mecanismos moleculares en ellos implicados (Zhi-Binlin, 2006; Rabel y col., 2008).

Polisacáridos del hongo *Trametes (Coriolus versicolor)* han mostrado actividad antitumoral, inmunomoduladora, analgésica y hepatoprotectora. Estos polisacáridos son capaces de inhibir las enzimas reverso transcriptasa y proteasas del VIH- tipo I, de gran importancia en el ciclo de vida del VIH, convirtiéndolo en un candidato para la terapia del SIDA (Ng y col., 2006).

El grifolano, un β (1,3) –D glucano purificado a partir de *Grifola frondosa*, induce varias citoquinas a partir de macrófagos, en estudios *in vitro*. Su solubilidad y peso molecular tienen efecto en la producción de TNF-alfa (Ishibashi y col., 2001). Se ha identificado una fracción polisacáridica en esta seta, denominada como fracción D, que estimula la acción de los macrófagos y aumenta la citotoxicidad de las células T-citotóxicas que atacan las células tumorales (Kodama y col., 2005).

Recientemente, se investigó el efecto del pleurano β (1-3)- D glucano, aislado a partir del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*, en el estado antioxidante del organismo y en el desarrollo de lesiones precancerosas en el colon, en ratas machos Wistar. Se empleó una dieta que contenía pleurano o celulosa al 10% y se comparó con una dieta libre de celulosa. Aunque las lesiones precancerosas se redujeron con la dieta de

celulosa, la reducción más significativa estadísticamente (50%) fue obtenida con la dieta del pleurano (Bobek y Galbaudy, 2001).

En un estudio realizado en el CEBI por Morris y col. (2003) se analizaron los efectos de un extracto hidrosoluble del micelio de *Pleurotus ostreatus* en ratones Balb/c tratados con ciclofosfamida. El extracto fue administrado intraperitonealmente en una dosis de 100 mg/kg durante siete días y la ciclofosfamida, a razón de 10 mg/kg, fue administrada el quinto día. Los ratones tratados con el extracto mostraron una inmunosupresión menos pronunciada, así como una recuperación hematopoyética más rápida que el grupo control (solución salina fisiológica). No se observaron signos de toxicidad, como hepatoesplenomegalia, en los ratones tratados el extracto de *Pleurotus*.

Por otra parte, se demostró en estudios *in vitro*, con cultivos de macrófagos peritoneales murinos, la capacidad de diferentes fracciones hidrosolubles obtenidas del micelio de *Pleurotus spp.*, de estimular el consumo de glucosa y la actividad fosfatas ácida lisosomal de estas células (Morris y col., 2007).

Los trabajos publicados acerca de las propiedades inmunoestimulantes de bioproductos aislados de hongos superiores y por otra parte, el carácter limitado de las evidencias experimentales y clínicas referidas para el género *Pleurotus*, así como su enfoque esencialmente nutricional, motivan la realización de estudios orientados a la evaluación de las potencialidades de sus extractos como agentes inmunomoduladores.

Capítulo 2. Materiales y métodos.

2.1 Obtención de extractos acuosos de *Pleurotus spp.*

Los experimentos fueron realizados en el CEBI (Universidad de Oriente), en la planta de Investigación-Producción de Setas Comestibles y en el laboratorio de Inmunología Aplicada.

2.1.1 Cepa utilizada.

Para este estudio, se utilizó la cepa de *Pleurotus spp* CCEBI-3024, depositada en la Colección de Cultivos del CEBI.

2.1.2 Cultivo sumergido de *Pleurotus spp.*

Se propagó la cepa en medio YPG de composición: glucosa (2%); peptona (0.5%); extracto de levadura (0.5%); KH_2PO_4 (0.1%); $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1%) pH=5 (Horitsu y col., 1992), suplementado con agar al 2 %. Se realizó la siembra en 5 placas Petri, que fueron incubadas a 37°C hasta lograr un crecimiento micelial total.

El medio YPG líquido fue dispensado en 10 matraces erlenmeyer de 50 mL de volumen. La siembra se realizó a partir del crecimiento obtenido en las placas, el cual fue raspado con una espátula estéril y diseminado en un erlenmeyer con 50 mL de salina fisiológica (0.9%), agitando vigorosamente. Fueron inoculados 5 mL de la suspensión a cada matraz e incubados a 37°C con agitación constante (100 r.p.m) en zaranda modelo Mizard. 2001, durante 15 días.

2.1.3 Fermentación en estado sólido (FES).

Para la fermentación en estado sólido (FES), se empleó, como sustratos, pulpa de café y fibras de coco, bajo las condiciones de cultivo requeridas para ello, que incluyen parámetros definidos, temperatura, luminosidad, ventilación, humedad relativa y riego, entre otros (Bermúdez, 2001).

2.1.4 Extracción de la biomasa de *Pleurotus spp*

2.1.4.1 Extracto del micelio obtenido mediante cultivo sumergido.

Una vez obtenida la biomasa, ésta fue filtrada, separando así el medio de cultivo que constituye la fracción denominada por nuestro grupo como F-0. El micelio fue lavado con agua destilada y pesado en balanza técnica Owa Labor. Se le añadió 5 mL de agua destilada por gramo de micelio, y se procedió al tratamiento térmico durante 10 horas con agua hirviendo a 95 °C. Posteriormente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos en centrifuga Hitachi Kokico modelo SCR 7B y fue concentrada hasta la tercera parte de su volumen.

2.1.4.2 Extractos de cuerpos fructíferos obtenidos por FES.

➤ Extracto caliente.

Para obtener el extracto caliente se pesaron 500 gramos de cuerpos fructíferos, los cuales fueron cortados en pequeñas piezas de 1 cm² aproximadamente y se les adicionó 3 mL de agua destilada por gramo. Posteriormente, se procedió a la extracción por tratamiento térmico durante 10 horas con agua hirviendo a 95 °C. El extracto fue centrifugado a 3000 r.p.m durante 10 minutos en centrífuga Hitachi Kokico modelo SCR 7B, se filtró y conservó a 4°C hasta su utilización.

➤ Extracto frío.

En este caso, se empleó la misma masa de cuerpos fructíferos (500 gramos), cortados en piezas de 1cm² y con una proporción de agua similar a la mencionada en el procedimiento anterior. Posteriormente, se procedió a la extracción durante 3 horas a 20 °C, con agitación constante, a 150 r.p.m. en zaranda modelo Mizard 2001. Luego, se centrifugó a 3000 r.p.m., durante 10 minutos, en centrífuga Hitachi Kokico modelo SCR 7B, se filtró y conservó a 4 ° C hasta su utilización.

2.2 Caracterización preliminar de los extractos.

2.2.1 Determinación del contenido de materia seca.

Para la determinación del contenido de materia seca se utilizaron 5 mL de cada extracto y se depositaron en cápsulas de porcelana, pesadas con anterioridad, para ser concentrados a sequedad. Se colocaron las cápsulas en estufa a 105 °C durante tres horas. Con los pesos iniciales y finales de las cápsulas, se determinó la concentración de materia seca en los extractos. A partir del contenido de materia seca en los extractos, se estimó el volumen a administrar a los ratones para la evaluación preliminar de su actividad inmunomoduladora:

$$\% \text{ materia seca} = \frac{\text{Peso final de la cápsula} - \text{Peso inicial cápsula (g)}}{\text{Volumen de muestra (mL)}} \times 100 \%$$

2.2.2 Determinación de la concentración de proteínas.

Para la determinación de la concentración de proteínas presentes en los extractos acuosos, tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.*, se procedió a la realización de la técnica de Lowry (Lowry y col., 1951). Con esta finalidad, se confeccionó una curva de calibración con una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (BDH) de concentración 0.184 mg/mL, corregida en un espectrofotómetro LKB-Ultrospec III a 280 nm, a partir de su coeficiente de extinción de 0.68. Se trabajó con diluciones 1:5 y 1: 10 para los extractos de micelio y cuerpos fructíferos. La lectura de la reacción colorimétrica se realizó a 650 nm.

2.2.3 Determinación de la concentración de carbohidratos.

La concentración de carbohidratos fue determinada por la técnica del fenolsulfúrico descrita por Dubois y col. (1956). Se confeccionó una curva de calibración a partir de una solución patrón de glucosa de concentración 100 µg/mL. Se realizaron diluciones 1: 50 y 1: 25 del extracto de micelio y, en el caso de los cuerpos fructíferos, 1: 5-1: 10 para el extracto frío y 1: 25- 1: 50 para el caliente. Las lecturas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro LKB-Ultrospec III a 490 nm.

2.2.4 Determinación de la concentración de ácidos urónicos.

La concentración de ácidos urónicos totales se valoró por la técnica del m-hidroxibifenilo (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973). La curva de calibración se preparó a partir de una solución patrón de ácido galacturónico (Sigma) de concentración 100 µg/mL. Se realizaron diluciones 1: 5 y 1: 10 del extracto de micelio y de los cuerpos fructíferos en frío y, para el extracto caliente, de 1: 50- 1: 25. Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 520 nm en el espectrofotómetro LKB-Ultrospec III.

2.3 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vivo*.

2.3.1 Efecto de la administración endovenosa a dosis única sobre el sistema monocito-macrófago en ratones Balb/c inmunocompetentes.

Animales y grupos experimentales.

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 18-20 g de peso y seis semanas de edad, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX®/CIM) de Santiago de Cuba. Los ratones se alimentaron con el pienso comercial correspondiente a esta especie, el cual fue suministrado por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana) con su correspondiente certificado de calidad. El agua y el alimento se suministraron de forma controlada, pero en cantidades suficientes para permitir su ingestión *ad libitum* durante todo el período experimental. Se emplearon condiciones sanitarias convencionales. Se conformaron dos grupos experimentales de 10 animales cada uno; la distribución de los ratones en dichos grupos se realizó aleatoriamente.

- Grupo I: Administración de 0.2 mL del extracto por la vía endovenosa (vena de la cola), día 0, equivalente a una dosis de 100 mg/Kg.
- Grupo II: Administración de 0.2 mL de solución salina fisiológica (QUIMEFA, Cuba) por vía endovenosa, día 0.

Actividad del sistema monocito-macrófago.

A las 48 h de la administración del extracto micelial y la solución salina fisiológica a los grupos experimentales, se inoculó por vía endovenosa, a través de la vena de la cola,

0.2 mL de una solución de carbón coloidal, consistente en 3 mL de tinta negra Pelikan (Pelikan, AG, Alemania), 4 mL de solución salina y 4 mL de solución de gelatina al 3%. Se procedió luego a tomar muestras de sangre cada 5 minutos, de la administración del carbón coloidal. Se colectaron alícuotas de 50 μ L de sangre por el plexo retroorbital con capilares heparinizados y se adicionaron 4 mL de Na₂CO₃ al 0.1 %. La concentración de carbón coloidal en las muestras fue estimada a través de la absorbancia a 675 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Ultrospec III, Pharmacia- LKB). Se determinó, además el tiempo de vida media del carbón coloidal en sangre (tiempo medio de vida, en minutos, $t_{1/2}$) y el índice fagocítico a través de las ecuaciones:

$$t_{1/2} = 0.693/k \quad k = \ln 2 (t_2 - t_1) / \ln (A_1 - A_2) \text{ (índice fagocítico),}$$

donde A_1 y A_2 son las absorbancias de las muestras (grupo experimental y grupo control con solución salina fisiológica) a los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente.

2.3.2 Estimulación de la permeabilidad vascular.

Para el estudio, se utilizaron 15 ratones Balb/c hembras de 18-20 g de peso y seis semanas de edad, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX[®]/CIM).

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

Se conformaron dos grupos experimentales, de 10 y 5 animales respectivamente, con una distribución aleatoria.

Grupo I. Compuesto por 10 ratones Balb/c. Se le administró (i.p) 0.5 mL del extracto acuoso del micelio de *Pleurotus spp.* a una dosis de 100 mg/kg. Transcurridos 60 minutos, se inocularon 0.5 mL por vía (i.p) de azul de Evans (Sigma) 10 mg/mL en salina fisiológica.

Grupo II. Compuesto por 5 ratones Balb/c. Se le administró (i.p) 0.5 mL de salina fisiológica (QUIMEFA, Cuba). De manera similar al grupo I, al cabo de los 60 minutos se inyectaron 0.5 mL por vía (i.p) de azul de Evans (Sigma) 10 mg/mL en salina fisiológica.

En ambos grupos, a los 60 minutos de la administración del azul de Evans, se procedió a la extracción de sangre por el plexo retroorbital, empleando capilares heparinizados. La sangre se colectó en viales citratados y se tomaron 50 μ L de la misma, a los que se le adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 0.1%. La mezcla fue homogeneizada, para la lectura de las absorbancias, a 630 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 uv (Thermospectronic Rochester, NY, USA).

Los ratones se sacrificaron por dislocación de la cervical y se colectó el exudado peritoneal, lavando con 4 mL de salina fisiológica. Seguidamente, se centrifugó a 1500 r.p.m, durante 20 minutos, en una centrifuga (Clay Adams Co. Inc., New York) para la precipitación de las células. La concentración de azul de Evans en la cavidad peritoneal fue estimada a 630 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 uv (Thermospectronic Rochester, NY, USA), realizando diluciones 1:4 de las muestras.

2.3.3 Efectos radioprotectores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en ratones Balb/c.

Se emplearon 20 ratones machos Balb/c, de 20 a 25 g de peso, libres de patógenos, procedentes del LABEX[®]/CIM (Santiago de Cuba). Fueron alimentados con dieta normal y agua *ad libitum* y distribuidos en dos grupos experimentales. Para irradiar a los animales, se utilizó un dispositivo Theraton Phoenix (fuente ⁶⁰CO) perteneciente al Hospital Oncológico Provincial “Conrado Benítez” de Santiago de Cuba a una dosis de 0.43 Gy/min.

Al grupo experimental (10 ratones) se les administró 0.2 mL por vía (i.p) del extracto micelial, a una dosis de 100 mg/kg, en dos períodos continuados de dosificación: el primero, desde el décimo hasta el sexto día antes de la irradiación y, el segundo, desde los dos días antes de la irradiación (día 1 del esquema) hasta el día posterior. Al control se le administró solución fisiológica en lugar del extracto. El sacrificio de los animales se realizó 24 horas después de la última administración del extracto acuoso del micelio de *Pleurotus spp.* mediante dislocación cervical.

Luego del sacrificio, a los animales se les realizaron diferentes pruebas, las que, a continuación, se detallan:

Celularidad de la médula ósea.

Una vez sacrificados los animales, a los ratones seleccionados se les retiró el fémur de la pata trasera derecha y se les extrajo la médula ósea, con 1.5 mL de solución de Hanks. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer (Alemania), con ayuda de un microscopio óptico (Zasilacz Mi kroskopowy typ TVO, Polonia).

Parámetros hematológicos.

Se tomó la muestra de sangre por el plexo retroorbital de cada animal empleando capilares heparinizados, la que fue colectada en viales con anticoagulante. Se determinó el contenido de hemoglobina en sangre y se realizó el conteo total y diferencial de leucocitos.

Para el conteo total de leucocitos, se tomaron 20 μ L de sangre, los que se añadieron en viales que contenían 0.4 mL de ácido acético al 2%. Una vez homogeneizada la mezcla, se procedió al conteo en cámara de Neubauer, con la ayuda del microscopio óptico

Zasilacz Mi kroskopowy typ TVO, Polonia. El resultado fue expresado en 10^9 células/mL.

El conteo diferencial de leucocitos se efectuó mediante el frotis de una gota de sangre fresca. Como agente deshidratante, se utilizó alcohol metílico durante 5 minutos. Luego se realizó la tinción con Giemsa (MINSAP). El conteo se realizó sobre la base de 100 células, empleando el microscopio óptico Zasilacz Mi kroskopowy typ TVO, (Polonia), para diferenciar sus características morfológicas que permiten su clasificación como granulocitos neutrófilos y linfocitos.

Celularidad del bazo.

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

Autopsia y medición del peso de los órganos.

Una vez sacrificados los animales, se realizó la disección y se observaron las características morfológicas del hígado, bazo y timo, tales como: tamaño, volumen, coloración y textura. Los hígados y bazos fueron pesados en una balanza analítica electrónica ER-182 A, Japón y se determinó luego el peso relativo.

Sistema monocito-macrófago.

Al octavo día, se administró a los ratones por la vena de la cola, 0.2 mL de una solución de carbón coloidal. Como se describió en el acápite 2.3.1. el aclaramiento del carbón coloidal se expresó mediante la relación de absorbancias de los grupos administrados con el extracto y la solución salina a los cinco minutos de la inoculación del carbón coloidal, respecto a la absorbancia de un grupo control sin irradiar.

Evaluaciones histológicas

Se tomaron muestras de timo, hígado y bazo de los animales tratados con el extracto de *Pleurotus* y del grupo control, las que fueron fijadas con formalina tamponada con fosfato al 10 % (v/v) e incluidas posteriormente en parafina. Se practicaron cortes de 5 μ m con un micrótopo y se procedió a la tinción de las preparaciones con hematoxilina y eosina.

2.4 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vitro*.

2.4.1 Evaluación de la capacidad de activación del sistema autolítico microbiano.

Para la determinación de la capacidad de activación del sistema autolítico microbiano por el extracto micelial de *Pleurotus*, se utilizaron cinco cepas de bacterias: *Staphylococcus aureus* (25953), *Pseudomonas aeruginosa* (1071), *Escherichia coli* (1069), *Bacillus cereus* (1008) y *Bacillus subtilis*(1032) y cuatro de hongos: *Saccharomyces cerevisiae* (2010), *Saccharomyces fermentii* (2008), *Candida intermedia* (2034) y *Candida sp* (2002), depositadas en la Colección de Cultivos microbianos del CEBI.

Se preparó 1mL de una suspensión de las células microbianas con agua destilada, para una absorbancia de 1.0 a la longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 uv (Thermospectronic Rochester, NY, USA). A la suspensión, previamente ajustada a la longitud de onda requerida, se le adicionó 1 mL del extracto micelial. Se utilizaron tres réplicas y un control sin el extracto por cada cepa. Posteriormente, se midió la absorbancia a 520 nm a muestras y controles a tiempo cero (D0) y se incubaron durante 60 minutos a 37⁰C. Trascurrido este tiempo se midió nuevamente la absorbancia de las suspensiones. Se calculó el porcentaje de autólisis (I), para el control (Ic) y la muestra (Is), utilizando la siguiente ecuación (Biziulevicius y col., 2006):

$$I = \frac{D_o - D_{60}}{D_o} \times 100$$

Con los valores de I se determinó, para cada cepa, el índice de activación autolítica (K_A):

$$K_A = \frac{I_s}{I_c}, \text{ si } I_c > 0$$

$$K_A = I_s, \text{ si } I_c = 0.$$

2.4.2 Activación de la vía alternativa del complemento (APC).

Este experimento se desarrolló con una modificación del método empleado por Suzuki y col., 1992. Se evaluaron diferentes concentraciones del extracto [8 mg/mL (s/d), 4 mg/mL (1/2), 1.6 mg/mL (1/5), 0.8 mg/mL (1/10) y 0.4 mg/mL (1/20)]. La técnica se desarrolló en tubos de ensayos, a diferencia del método original que emplea placas de ELISA. Se tomaron 385 µL de suero humano normal (Banco de Sangre Provincial Renato Guitart, Santiago de Cuba) y se le añadieron 77 µL de solución salina tamponada con Veronal y suplementada con cloruro de magnesio. Luego de incubar 10 min a 37°C, se adicionaron 769 µL de cada una de las diluciones del extracto y se volvió a incubar a la misma temperatura durante 30 min. Se añadieron 769 µL de una

suspensión de eritrocitos de conejo (LABEX[®]/CIM), Santiago de Cuba), ajustada en cámara de Neubauer a una concentración de 7.5×10^8 células/mL) y se dejó reposar a 25°C. La turbidez de la suspensión de eritrocitos se midió en un espectrofotómetro CECIL 7200, Inglaterra, a 630 nm, cada 15 min, durante 120 min. Se utilizaron como controles:

- Control positivo: 385 µL de suero humano + 846 µL de buffer + 769 µL de eritrocitos.
- Control negativo: 1230 µL de buffer + 769 µL de eritrocitos.

Se determinó el tiempo requerido para la lisis del 50% de la suspensión de eritrocitos en el control positivo y en las diferentes diluciones del extracto micelial.

2.4.3 Activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos.

Se emplaron tres ratones machos Balb/c, de 20 a 25 g de peso, libres de patógenos, procedentes del LABEX[®]/CIM, Santiago de Cuba). A los mismos se les inyectó, por vía intraperitoneal, 5 mL de solución de Hanks en la cavidad peritoneal. Luego, se realizó una incisión y se colectaron las células de la cavidad con una pipeta Pasteur.

Las células adherentes (macrófagos) fueron incubadas en medio RPMI-1640 en placas Nunc Inc., Dinamarca, a una densidad de 1×10^5 células por pozo, junto con el extracto a concentraciones de 5, 10, 20, 50, 80 y 100 µg/pozo. La placa fue incubada durante 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂. Se solubilizó, a continuación, la monocapa celular con 0.1 mL de Tritón X-100 al 0.1 % y las células en suspensión fueron colectadas en tubos de ensayos. Se adicionaron 5 mL de p-nitrofenil fosfato como sustrato y 0.4 mL de tampón acetato 0.2 mol/L. La mezcla se incubó 1 hora a 37°C, se adicionaron 0.5 mL de tampón borato pH 9.8 (Kiho y col., 1992). Se determinaron las absorbancias a 405 nm y la actividad fosfatasa ácida fue expresada en porcentaje respecto a los valores de un control sin extracto.

2.5 Análisis estadístico.

Los resultados experimentales se presentan en función de las medias y desviaciones estándar de las variables analizadas.

La significación estadística de las diferencias entre las medias de dos muestras se determinó mediante la prueba t de Student. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de clasificación simple, según diseño completamente aleatorizado, acoplado a la prueba de rangos múltiples de Duncan, a los datos correspondientes al experimento de activación de la vía alternativa del complemento (Sigarroa, 1985).

Capítulo 3. Resultados y discusión.

3.1. Obtención y caracterización de los extractos de *Pleurotus spp.*

3.1.1 Cultivo sumergido.

En este trabajo, a partir del cultivo de la cepa CCEBI-3024 de *Pleurotus spp.* en medio YPG sólido, se obtuvo crecimiento micelial total al cabo de los diez días. Por su parte, la propagación en medio líquido se mantuvo por un tiempo de 15 días, hasta obtener una biomasa fresca de 67.5 g aproximadamente, en el volumen de medio utilizado. El valor de materia seca resultó 2.4 g/L.

Los valores correspondientes al contenido de carbohidratos, proteínas y ácidos urónicos presentes en los extractos de micelio obtenido por cultivo sumergido se muestran en la figura 1. La concentración en función de la materia seca de carbohidratos, proteínas y ácidos urónicos presentes fue de 70.4 %, 15.0 % y 3.3 %, respectivamente. El porcentaje más elevado correspondió a los carbohidratos totales (aproximadamente cinco veces superior respecto a las proteínas).

3.1.2 Fermentación en estado sólido.

Las diferencias en la composición macromolecular fundamental resultaron menores en los extractos de cuerpos fructíferos obtenidos por tratamiento térmico a bajas y altas temperaturas, en comparación con el extracto de micelio. Los mayores rendimientos en términos de materia seca se alcanzaron en el extracto caliente (5.2 g/L), mientras que a bajas temperaturas este parámetro mostró un valor de 1.5 g/L.

El porcentaje de proteínas (45.2 vs 28.6 %) en el extracto frío fue más elevado que en el extracto caliente (figura 1). Con la extracción a bajas temperaturas (20 ° C) se favorece además preservar la estructura y función de las proteínas. En el extracto caliente se produce la agregación y precipitación de estas biomoléculas, fundamentalmente como resultado de las interacciones hidrofóbicas (Chávez y col. (1990); luego, ocurre una pérdida durante las etapas de filtración y de centrifugación. Ello favorecerá el aislamiento y posterior purificación de sustancias estables al calor, como glucanos.

Como resultado, en los extractos de cuerpo fructífero el porcentaje más elevado de carbohidratos (32.6 %), se obtuvo en el extracto con agua caliente, pues las altas temperaturas provocan una extracción preferencial de los carbohidratos. Este es un método empleado convencionalmente en la obtención de extractos y en el aislamiento de glucanos (Hobbs, 2000; Mckenna y col. 2002; Wasser, 2002; He y col. 2004).

El 5-6 % de la materia seca estuvo representada por ácidos urónicos, componentes frecuentes de la estructura de glucanos aislados de hongos superiores, como los ácidos glucurónico y galacturónico.

Como se puede apreciar, la flexibilidad en las condiciones de extracción favorece el predominio de las proteínas y/o carbohidratos en los extractos. Estas condiciones deben ser optimizadas en el futuro con vistas a la obtención de mayores rendimientos.

En nuestro trabajo, para la evaluación de algunos de los efectos inmunomoduladores de

extractos acuosos de *Pleurotus spp.*, en biomodelos *in vivo* e *in vitro*, utilizamos el extracto micelial.

Esta decisión está basada en lo referido en la literatura, considerando la gran variabilidad en la composición del cuerpo fructífero de las setas comestibles. Esta es la razón por la que el procedimiento de extracción de polisacáridos a partir del cuerpo fructífero no se considera comercialmente factible, porque las propiedades fisicoquímicas de los productos resultantes a partir de estos procesos no están regulados (Wasser, 2002).

Por otra parte, el cultivo de setas para la producción de cuerpos fructíferos es un proceso largo, que necesita de uno a varios meses hasta que aparezcan los primeros cuerpos fructíferos, en dependencia de la especie y el sustrato. En contraste, el crecimiento controlado en condiciones de cultivo sumergido permite acelerar la velocidad de crecimiento, optimiza el medio de cultivo y garantiza un rendimiento superior de biomasa y sustancias específicas (Wasser, 2002). De modo que el cultivo sumergido del micelio de hongos se perfila como un método promisorio para aplicaciones biotecnológicas novedosas, relacionadas con la obtención de compuestos de interés farmacológico con actividad antitumoral, inmunomoduladora, antiviral y anti-aterosclerótica (bisko y col., 2002; Lomberh y col., 2002).

3.2 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vivo*.

3.2.1 Efecto de la administración endovenosa a dosis única sobre el sistema monocito-macrófago en ratones Balb/c inmunocompetentes.

La actividad del sistema monocito-macrófago a las 48 horas, fue potenciada por la administración endovenosa del extracto, lo que se reflejó en la disminución experimentada en el tiempo de vida media del carbón coloidal en el grupo tratado con el extracto, ($10,11 \pm 1,35$) minutos, con respecto al grupo control ($18,3 \pm 1,36$) minutos. Por su parte, el índice fagocítico resultó mayor en los ratones tratados con el extracto ($0,07 \pm 0,01$), con relación al grupo control ($0,04 \pm 0,01$), existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$) (Tabla 1). Esta vía de administración permite que el extracto se distribuya, de forma sistémica y estimule el aclaramiento de las partículas coloidales fundamentalmente, por los tejidos reticuloendoteliales del bazo y del hígado.

También fue estudiada la relación de absorbancias del grupo experimental tratado con el extracto y del grupo control al que se le administró solución salina fisiológica, contra un grupo sin administración, a los 5 minutos de inoculada la solución de carbón coloidal. En este parámetro no existieron diferencias significativas entre los grupos.

Existen evidencias de que el extracto micelial de *Pleurotus* es capaz de estimular la actividad de los macrófagos peritoneales, en trabajos publicados por Morris y col. (2002, 2003), en biomodelos de inmunodeficiencias secundarias.

Estudios realizados por Sakurai y col. (1992), con SSG, un glucano obtenido a partir de *Sclerotinia sclerotiorum* y que fue administrado a ratones CDF₁ de 6-8 semanas de edad por vía endovenosa y en una dosis de 250-500 mg/kg de peso, mostraron que la actividad de los macrófagos esplénicos y las células de Kupffer resultó potenciada.

Por otra parte, SSG permaneció por largos períodos de tiempo en la cavidad peritoneal, cuando fue administrado por vía intraperitoneal (i.p), estimulando directamente a los macrófagos peritoneales durante varios días. También ha sido referido que la administración de esta sustancia por otras vías es capaz de estimular la proliferación y las funciones de otras poblaciones celulares vinculadas con el sistema monocito-macrófago. Por ejemplo, la inyección intraperitoneal (i.p) de una dosis única del extracto en cuestión (250 mg/kg) fue capaz de aumentar la función de los macrófagos alveolares en los días 1 y 8. Por su parte la administración oral supone un aumento de las mismas poblaciones de macrófagos, pero sólo si se realiza durante 10 días de forma consecutiva.

3.2.2 Estimulación de la permeabilidad vascular.

La permeabilidad vascular es un parámetro sensible para la evaluación de la respuesta inflamatoria aguda. Puede ser incrementada por diferentes mecanismos y sustancias, entre los que se destacan: la activación del complemento, la liberación de histamina y la síntesis de prostaglandinas (Bertram, 2005). En nuestro estudio, la permeabilidad vascular fue estimada tomando como criterio la disminución de la concentración intraperitoneal del azul de Evans, después de la administración del extracto micelial de *Pleurotus spp.* La figura 2 muestra una disminución significativa ($p < 0.05$) de la concentración del colorante en la cavidad peritoneal de los ratones tratados con el extracto. Ello, unido a la no existencia de diferencias significativas en los niveles de sangre del colorante, sugiere su extravasación y posible acumulación local en los espacios extravasculares. Tokunaka y col (2000) informaron un incremento de la permeabilidad vascular en ratones ICR tratados con 100 µg de CSBG, un β (1-3) D glucano soluble en agua, aislado de *Candida spp.*

3.2.3. Efectos radioprotectores del extracto de *Pleurotus spp.*, en ratones Balb/c.

La administración del extracto proporcionó una mejor base para la regeneración de la hematopoyesis, afectada severamente por las radiaciones ionizantes, lo cual se observa en la tabla 2, en el incremento significativo de la celularidad de la médula ósea y del bazo, dos de los órganos implicados en este proceso.

El estado inmunodeficitario provocado por la irradiación de cuerpo completo, se caracterizó por una disminución severa del conteo total y diferencial de leucocitos, especialmente en los ratones del grupo control, a los que no se les administró el extracto acuoso del micelio de *Pleurotus spp.* Los valores de linfocitos y neutrófilos evidenciaron un aumento en sus proporciones relativas en el grupo tratado con el extracto, en comparación con el control. Las deficiencias cuantitativas en la fagocitosis son frecuentes en las inmunodeficiencias secundarias a tratamientos inmunosupresores (Faimboaim, 1996).

En particular, los neutrófilos son las células fagocíticas por excelencia y ocupan un lugar fundamental además, en la inmunidad específica.

Por otra parte, el hecho que no se detecten monocitos en sangre periférica y la presencia de un valor elevado de macrófagos locales en la cavidad peritoneal (tabla 3) presupone una movilización de los primeros hacia el sitio de administración del extracto. Es probable que el aumento en la proporción de neutrófilos y de la población de macrófagos en la cavidad peritoneal se encuentre en estrecha relación con la síntesis de factores estimulantes de colonias (CSFs), mediado por componentes moleculares presentes en el extracto.

El factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), es una glicoproteína producida por los macrófagos activados, linfocitos T activados, células endoteliales y fibroblastos, que también promueve la proliferación de plaquetas y glóbulos rojos. Cuando es producido por células de la médula ósea, actúa como estimulante de la hematopoyesis, mientras que, cuando es liberado en los tejidos periféricos, se comporta como un activador de macrófagos. El GM-CSF recombinante se ha empleado para reconstruir la hematopoyesis, luego de la quimioterapia citotóxica o de un trasplante de médula ósea. El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), por su parte, es un péptido obtenido por las mismas células que producen GM-CSF. Este actúa sobre progenitores ya comprometidos a diferenciarse en granulocitos (Faimboaim, 1996).

Vacek y col. (1990) refirieron, los efectos de un extracto de la microalga *Chlorella kessleri*, administrado a ratones 24 horas antes de la irradiación. Éste disminuyó los efectos letales de la radiación gamma en ratones y ratas cuando fue administrado por vía i.p, s.c o i.m, a una dosis de 400 mg/kg. Con la aplicación de dosis de este extracto a ratones normales, se incrementó en 24 horas el número de unidades formadoras de colonias en la médula ósea y su proliferación, así como el número de GM-CFC y de colonias macroscópicas endógenas en la superficie parietal del bazo. La recuperación de estos parámetros fue más rápida en los animales tratados con el extracto que en el grupo de control con salina fisiológica además, en el estudio histológico de muestras del bazo de los ratones que recibieron el extracto se apreció la presencia moderada de células plasmáticas, así como células de la hematopoyesis extramedular (Informe Final. Dpto. de Anatomía Patológica, TOXIMED, 2008).

En la tabla 3 se presentan los efectos de la administración del extracto de *Pleurotus spp.* en el número de macrófagos peritoneales y en el aclaramiento del carbón coloidal de los ratones expuestos a las radiaciones. El extracto incrementó significativamente ($p < 0.01$) el número de macrófagos en la cavidad peritoneal y la actividad fagocítica de las células de Kupffer y macrófagos esplénicos, a juzgar por los valores en la relación de absorbancia a los cinco minutos ($p < 0.05$). Por su parte en el estudio histológico de muestras de hígado de los animales tratados con el extracto se observó un infiltrado inflamatorio de mononucleares. (Informe Final. Dpto. de Anatomía Patológica, TOXIMED, 2008). Estos elementos constituyen evidencias de la activación del sistema monocito-macrófago.

En el estudio histológico del timo de los animales tratados con el extracto, se observó una hiperplasia linfoide moderada (Informe Final. Dpto. de Anatomía Patológica, TOXIMED, 2008). Ha sido planteado que, en el adulto, el timo continúa siendo fuente importante de linfocitos pequeños, especialmente si el sujeto ha sufrido depleción de sus órganos linfoides por radiación (Leeson y Lesson, 1984).

También fueron estudiados los pesos relativos del timo, hígado y bazo de los ratones Balb/c sometidos a radiaciones gamma. Estos resultados se muestran en la tabla 4, donde no se aprecian diferencias significativas entre los pesos relativos del grupo control, al cual se administró solución salina fisiológica y los del grupo experimental, tratados con el extracto, lo cual es signo de que el mismo no produce toxicidad. Esto es comprensible, puesto que, por años, la fuente del extracto ha sido consumida por el hombre como alimento.

3.3 Efectos inmunomoduladores del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en biomodelos *in vitro*.

3.3.1 Evaluación de la capacidad de activación del sistema autolítico microbiano.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de un extracto micelial de *Pleurotus spp.* en la activación *in vitro* del sistema autolítico de nueve cepas de microorganismos. El producto ensayado ejerció una acción estimuladora del proceso autolítico en la totalidad de las cepas analizadas: siete consideradas autolíticas naturales con valores del índice de activación (K_A) en el intervalo de 1,3 - 12,8; y por otra parte la autólisis fue inducida a valores entre 1,8 y 2,1 % en dos cepas no autolíticas naturales (tabla 5) . Diferentes productos resultantes de la lisis microbiana, como el LPS y fragmentos de peptidoglucano entre otros, poseen acciones inmunopotenciadoras demostradas en estudios experimentales y clínicos. (Biziulevicius y col. 2006).

En este sentido, se han referido los efectos inoestimulantes que resultan de la administración oral de productos de la lisis microbiana (Biziulevicius y col 2003). Los beneficios para la salud de estas sustancias están respaldadas por el hecho de que una larga lista de inoestimulantes aplicados en la práctica clínica en su mayoría se componen de compuestos derivados de la lisis microbiana (Werner y Jolles, 1996).

Estas evidencias podrían constituir un aporte al conocimiento de los efectos inmunomoduladores de los derivados obtenidos de *Pleurotus spp.*

3.3.2 Activación de la vía alternativa del complemento.

En este experimento fueron incubadas diferentes diluciones del extracto, con suero humano en un intervalo de concentraciones de 0.4- 8 mg/mL durante 30 minutos, y luego se procedió a la determinación de la cinética de lisis de una suspensión de eritrocitos de conejo durante 2 horas como criterio de activación de la vía alternativa (Figura 3). En las condiciones empleadas en el estudio, la suspensión de eritrocitos en el control positivo (suero y tampón veronal) fue lisada, aproximadamente, en un 80% del valor inicial al final del experimento. Los valores iniciales y finales de turbidez fueron de

2.8 y 0.584, respectivamente. En cambio, en el control negativo (tampón veronal), solo se detectó una lisis de, aproximadamente 16%, a partir de los 75 minutos de incubación.

En las diferentes diluciones del extracto, la lisis de las diferentes suspensiones celulares resultó reducida en comparación con el control positivo ($P < 0.05$), dada la competencia que se establece entre C3 por la unión a componentes presumiblemente glucanos presentes en el extracto y la puesta en marcha de la cascada en fase fluida.

La activación de la vía alternativa no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el extracto sin diluir y las diluciones desde 1:2 hasta 1:10 y resultó ligeramente inferior en la dilución 1:20.

Resultados similares fueron referidos por Suzuki y col. (1992) con diferentes β 1, 3 D glucanos de distinta ultraestructura y grado de ramificación, utilizando plasma humano.

La vía alternativa es considerada un estado permanente de activación de bajo nivel debido a la reactividad del C3 soluble con el agua, que sufre una hidrólisis espontánea lenta de su enlace tioéster interno, generando C3i que se une al factor B y forma, así, la convertasa C3 de la vía alternativa en fase fluida (Abbas y col., 2000).

Las moléculas de C3b pueden formar aleatoriamente enlaces con los grupos hidroxilos de los glucanos, que son, desde el punto de vista estructural, polihi droxialdehídos. Esta asociación podría modular el destino de C3 con relación a la extensión de los procesos de amplificación o inactivación.

En este sentido, se ha demostrado que la hidrofobicidad puede ser un factor crítico en estos procesos y que la sustitución de un grupo hidrofílico en los β -(1,3)-D glucanos conlleva a una reducción de la actividad (Suzuki y col., 1992). Las respuestas biológicas a los β -glucanos están mediadas por receptores como el dectin-1 en ratones y el receptor humano transmembranoso tipo II, con sus dos isoformas principales (A y B) que se expresan y funcionan como un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) frente a una variedad de β -(1,3)-D glucanos, lo mismo que a levaduras retadas (Willment y col., 2001). El glucano enlazado a C3 podría actuar como un adaptador entre la célula efectora con un receptor de glucanos, PRR y una superficie microbiana, favoreciendo la formación de la convertasa de C3 de la vía alternativa en fase sólida y estable y la amplificación del sistema.

Desde otro punto de vista, la extrapolación de estos resultados *in vitro* a biomodelos *in vivo*, podría explicar, al menos, en parte, el incremento observado en la permeabilidad vascular.

3.3.3 Activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos.

Se conoce que los macrófagos desempeñan una función central en la regulación de la inmunidad específica e innata (Abbas y col., 2000). Se ha referido, además, que éstos

tienen un importante papel en los efectos inmunomoduladores y antitumorales de diferentes biopreparados de hongos superiores (Mojadadi y col. 2006)

En nuestro trabajo, se utilizó la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal como marcador bioquímico de la actividad funcional de los macrófagos, la cual es parte de los mecanismos de activación independientes del oxígeno (Faimboaim, 1996).

La actividad fue expresada en porciento respecto de los valores de un control sin polisacárido. El incremento observado en la actividad de esta enzima, al parecer, es dosis dependiente (figura 4). La curva resultante es característica de procesos de primer orden, típicos de una interacción ligando-receptor, lo cual está sustentado por la identificación de receptores de glucanos en la membrana citoplasmática de macrófagos (Willment y col., 2001).

Morris y col. (2007b) refirieron la activación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos por cinco fracciones polisacarídicas de *Pleurotus spp.* en función del mayor consumo de glucosa y el incremento observado en la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal.

Por otra parte, los macrófagos presentan receptores de membrana para el fragmento C3b de la vía alternativa del sistema del complemento. La enzima fosfatasa ácida es estimulada por dicho fragmento, lo cual sugiere que el extracto podría actuar como inductor de esta vía, desencadenando, así, el espectro de funciones inespecíficas de este sistema.

Janusz y col. (1989), refirieron que la unidad estructural que actúa como ligando del receptor de β - D- glucanos en monocitos humanos es un heptaglucósido. El descubrimiento de receptores específicos de β - D-glucanos en inmunocitos de mamíferos ofrece una explicación de la activación celular inducida por estos compuestos. Sin embargo, salvo escasas referencias, la gran mayoría de los estudios relacionados con los receptores han empleado glucanos insolubles en agua y el significado *in vivo* de estos ensayos no es aún conclusivo.

Se precisa, en nuestras condiciones experimentales, definir el efecto de la vía alternativa de activación del complemento en la respuesta biológica de los macrófagos inducida por glucanos de *Pleurotus spp.* Un método relativamente sencillo consistiría en la incubación de la monocapa celular con el extracto y suero humano normal, empleando como control un experimento similar, pero con suero calentado a 56 °C (las proteínas el complemento son termolábiles).

El avance en los estudios acerca de las propiedades inmunomoduladoras de extractos acuosos obtenidos a partir de setas comestibles continuará proporcionando evidencias experimentales que contribuyan a su posterior aplicación en la terapéutica de diversas enfermedades que afectan al sistema inmune.

En este sentido, los resultados preclínicos obtenidos en el presente trabajo con relación a algunos efectos inmunomoduladores *in vitro* e *in vivo* de un extracto micelial

de *Pleurotus spp.*, podrían ser promisorios con vistas a su evaluación posterior en la práctica clínica, y contribuir de esta forma a aumentar la sobrevivencia y calidad de vida de individuos con enfermedades que afectan al sistema inmune.

Capítulo 4. Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

1. La flexibilidad en las condiciones de extracción (temperatura y condiciones de cultivo) favoreció el predominio de los carbohidratos y/o proteínas, en los extractos obtenidos a partir del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.* En función del contenido mayoritario de carbohidratos (70.4 %), presumiblemente glucanos, y las condiciones controladas en que se desarrolla el cultivo sumergido, fue seleccionado el extracto micelial para la realización de las evaluaciones inmunológicas.
2. La administración a dosis única (100 mg/kg) del extracto micelial de *Pleurotus spp.* a ratones Balb/c inmunocompetentes estimuló la actividad funcional del sistema monocito-macrófago, reflejado en un aclaramiento más rápido de las partículas de carbón coloidal por las células fagocíticas, e incrementó además, la permeabilidad vascular.
3. El extracto micelial de *Pleurotus spp.*, administrado en régimen profiláctico, moduló eficientemente la recuperación inmunológica de ratones Balb/c irradiados, a través de la estimulación de la actividad hematopoyética de la médula ósea y el bazo, el incremento en el conteo de linfocitos y neutrófilos en sangre periférica y la activación del sistema monocito-macrófago.
4. El extracto micelial de *Pleurotus spp.* ejerció diferentes efectos inmunomoduladores *in vitro*, que se manifestaron a nivel de la inducción del sistema autolítico microbiano, la activación de la vía alternativa del sistema complemento y la estimulación de la actividad enzimática de macrófagos peritoneales murinos.

Recomendaciones

1. Optimizar las condiciones de obtención de los extractos de *Pleurotus spp.* con vistas a alcanzar mayores rendimientos.
2. Profundizar en el estudio de la actividad inmunomoduladora del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en otros sistemas experimentales, así como dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales ejerce su acción.

Bibliografía

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología Celular y Molecular. 3^{ra} ed. España, 2000.
2. Acosta UL, Bustos ZG, Portugal PP. Aislamientos y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* y su cultivo en residuos agroindustriales en el estado de Morelos. Revista Mexicana de Micología 1988; 4:13-20.
3. Bermúdez RC, Traba J, Verdecia M y Gross P. Producción de *Pleurotus sp* cfr. *florida* sobre residuales de agroindustria cafetalera en Cuba. Micol. Neotrop. Apl 1994; 7: 47-50.
4. Bermúdez RC, Garcia N, Gross P, Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. Micología Aplicada Internacional 2001; 13(1): 25-29.
5. Bermúdez RC, Donoso C, Martínez C, Ramos E, Morris H. Efecto de la luz en la concentración de micosteroides de *Pleurotus ostreatus*, var. *Florida*. Rev. Cub. de Aliment. y Nutr. 2002; 16 (1): 13-8.
6. Bermúdez RC, Morris H, Donoso C, Martínez C, Ramos E. Influencia de la luz en la calidad proteica de *Pleurotus ostreatus*, var. *Florida*. Invest. Biomed. 2003; 22 (4): 226-31.
7. Bertram G. Katzung. Basic Clinical Pharmacology. 9th Edition; 2005.
8. Bisko NA, Babitskay VG, Bilay VT, Mitropolskaya NY. Biologically active substances from *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*. En: Sánchez JE, Huerta G, Montiel E, editors. Mushroom. Biology and Mushroom Products- Proceedings of the Fourth International Conference, February 20-23, 2002, Cuernavaca, MÉXICO.
9. Biziulevicius GA, Kazlauskaite J, Lukauskas K, Ramanauskiene J and Sederevicius A. An enzymatic cow immunity-target approach to reducing milk somatic cell count. A preliminary study using lysosubtilin. Food Agric Immunol 2003; 15: 289-292.
10. Biziulevicius GA, Kislukhina OV, Kazlauskaite J, Zukaite V. Food- protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a cause and effect theory of biofunctionality. FEEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46: 131-138.
11. Blumenkrantz NG, Asboe-Hansen. New method for quantitative determination of uronic acids. Anal Biochem 1973; 54: 484- 489.
12. Bobek P, Ozdin L, Cerbven J. Efectos hipercolesterolémicos de la seta ostra (*Pleurotus ostreatus*) con sensibilidad hereditaria aumentada al colesterol de dieta. Biología (Bratislava) 1990; 54: 961- 966.
13. Bobek P, Galbauy S. effect of pleuran (B-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the anti oxidant status of the organism and on dimethylhydrazine- induced precancerous lesions in rat colon. Br J Biomed Sci 2001; 58: 164-8.
14. Chang R. The central importance of the beta glucan receptor as the basis of immunologic bioactivity of *Ganoderma* polysaccharides. In Reishi II. Ed. Mizumo T, Kim BK. Yang Press, Seoul 1996: 177- 179.
15. Chang ST, Buswell JA. Medicinal Mushrooms a prominent source of nutraceuticals for the 21st century. Curr Topics Nutraceut Res 2003; 1:257-280.
16. Chang ST, Miles PhG. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal

- effects, and environmental impact. CRC. Press Boca Ratón Florida; 2004.
17. Chavéz M, Díaz J, Pérez V, Delfín J. Temas de enzimología (Tomo 1), Santiago de Cuba. ENPES; 1990.
 18. Chihara G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. *Dev. Biol. Stand* 1992; 77: 191- 7.
 19. Diwakar B, Munjal RL, Bahukhandi D. Cultivation of *Pleurotus* species on different agricultural residues. *Indian Phytopathology* 1989; 42(4): 492-495.
 20. 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.
 21. Estrada A, Yun Ch, Van Kenssel A, Li B, Hauta S, Laarverld B. Immunomodulatory activities of Oat β - glucan *in vitro* and *in vivo*. *Microbiol Immunol* 1997; 41(12): 991- 998.
 22. Faimboaim L, Sáez ML. Introducción a la Inmunología Humana. 3ra ed. editorial Mosby. Barcelona, España. 1996
 23. Flegg PB, Spencer DM, Wood DA. The biology and technology of the cultivate mushrooms. New York. John Wiley; 1995: 347p.
 24. Fugimoto S, Furue H. Clinical evaluation of Schizophyllan adjuvant immunochemotherapy for patients with resectable gastric cancer: a randomised controlled trial. *Japanese Journal of Surgery* 1984; 14: 286-292.
 25. Gaitan R, Salmenes D. Cultivo y selección de cepas de *Pleurotus spp* con alto rendimiento. *Revista Mexicana de Micología* 1996; 12: 107-113.
 26. Gao Y H. The miracle herb, scientific reports of *Ganoderma*. Yuanquizai Publisher, Taipei; 2000.
 27. García RM. Cultivo de setas y trufas. Madrid. Mundi Prensa 1987: 217 p.
 28. Granero RE, Childress AM, Human LG, Domer JE. Characterization of *Candida albicans* mannan-induced, mannan-specific delayed-hypersensitivity suppressor cells. *Infection and Immunity* 1990; 58: 2613-2620.
 29. Gross P, Bermúdez RC. Influencia del manganeso y el calcio en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre pulpa de café *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Tesis en opción al título de Máster; 2004.
 30. Guzmán G. Fungi in traditional medicine in Mesoamerica and Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* 1994; 11:3,81-85.
 31. He X, Seleen J. Chemical análisis as a quality control method for medicinal mushroom and fungi extracts. *Int J. Medicinal Mushrooms* 2004; 6(3):253-261.
 32. Hetland G, Sandven P. Beta (1, 3) glucan reduces growth of *Micobacterium tuberculosis* in macrophage cultures. *Fems Immunol Med Microbiol* 2002; 33: 41-5.
 33. Hincapié JG. Fertilización mineral del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. Tesis de grado ingeniero; 1993: 91 p.
 34. Hobbs CH. Medical value of *Lentinus edodes*. A literature review. *Int J Med Mush* 2000; 2: 287-02.
 35. Horitsu H, Yohashi Y. Production of xylitol from D- xilose by *Candida tropicalis*. *Biotechnology and Bioengineering* 1992; 40: 1085- 1091.
 36. Informe Final. Dpto. de Anatomía Patológica, Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, 2008).
 37. Ishibashi K, Miura N, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3 β - D- glucan, and production of tumor necrosis

- factor by macrophages *in vitro*. Biosci Biotechnol Biochem 2001; 65(9): 1993-2000.
38. Janusz MJ, Austen KF, Czop JK. Isolation of a yeast heptaglucoside for monocyte phagocytic β -glucan receptors. FASEB J 1989; 3:6421.
 39. Jong S and Birmingham JM. Medical benefits of the mushroom Ganoderma. Advances in Applied Microbiology 1992; 37, 101-134.
 40. Kapich AN, Shishkina LN. Antioxidants properties of wood destroying basidiomycetes. Mikologiya fitopatologiya 1992; 26(2): 486-492.
 41. Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules including carbohydrates. Current Drug Targets: Cardiovascular and Haematological disorders 2005; 5: 39-64.
 42. Kerem Z, Friesem D, Hadar Y. Lignocellulose degradation during solid state fermentation. *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochecte chrysosporim*. Applied and environ. Microbial 1992; 58(5): 1121-1127.
 43. Kiho T, Shiose Y, Nagai K, Ukai S. Polysaccharides in fungi. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. Chem. Pharm. Bull 1992; 4(8):2110-4.
 44. Kim HM, Han SB, Kim YH, Hong ND, Yoo LD. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharides from mushroom *Phellinus linteus*. Int J Immunopharmac 1996; 18(5): 295- 303.
 45. Kimura Y, et al. Clinical evaluation of sizofiran as assistant immunotherapy in treatment of head and neck cancer. Acta Otolaryngology 1994; 511: 192-195.
 46. 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.
 47. Lee SS, Wei YH, Chen CH, Wang SY, Chen KY. Antitumour effects of *Ganoderma lucidum*. Journal of Chinese Medicine 1996; 6: 1-12.
 48. Leeson CR, Lesson TS. Histología. 2da edición cubana. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, 1984.564 pp.
 49. Lomberh H, Solomko E, Buchalo A, Kirchhoff A. Studies of Medicinal Mushrooms in submerged cultures. Mush Biol and Mush Prod 2002: 878-968-105-3).
 50. Lowry HO, Rosebrough A, Farr L, Randall JR. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1991; 193: 265- 275.
 51. Martínez-Carrera D, Morales P, Sobal M. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre bagazo de caña enriquecido con pulpa de café o paja de cebada. Revista de Micología Neotropical Aplicada 1990; 3: 49-52.
 52. Martínez -Carrera D. La producción de *Pleurotus* en México. In: Memorias del Primer Simposio Nacional de Hongos comestibles (Pachuca, Hgo. SEP). INIFAP/UAEH 1998: 33-38.
 53. Martínez -Carrera D, Nava D, Sobal M, Bonilla M, Mayett Y. Marketing channels wild and cultivated edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico. Micol Apl Int 2005; 17:9-20.
 54. Mc kenna DJ, Jones K, Hughes K. Reishi Botanical Medicines. The desk reference for major Herbal Supplements. 2 nd ED., The Haworth Herbal Press: New York, London, Oxford; 2002, p. 825-855.
 55. Miles PG y Shuting CH. Biología de las setas. Fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Hong Kong. World Scientific; 1997:133p.

56. Miura T. Inactivation of a particle B-glucan by proteins in plasma and serum. *Biol Pharm Bull* 1998; 20(10): 1103- 1107.
57. Mojadi S, Ebtakar M, Hasssan Z. Immunomodulatory activity of *Ganoderma lucidum*(w.Curti.Fr). Polysaccharide extract on delayed type hypersensitivity 2006, *International Journal of Medicinal Mushrooms*.volume 8. 108 p.
58. Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Tamayo V. Preliminary characterization and radioprotective effects of aqueous extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. 17 Conferencia Internacional de Química. Santiago de Cuba. 2002. ISBN: 959-207-0830.
59. Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, García N, Bermúdez RC. Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micología Aplicada Internacional* 2003; 15(1):7-13.
60. 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 and Microbial Technol* 2007(a); 40: 456-460.
61. Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauradó G, Marcos J. A note on the *in vitro* macrophage-stimulating activity of water-soluble extract from mycelium of *Pleurotus spp.* *Food Agric Immunol* 2007(b); 18(1):31-37.
62. Murlot A, Bermúdez RC, García N. Producción de *Pleurotus sp.* Sobre mezclas de pulpa de café y viruta de madera. Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología (Mención Industrial); 2007.
63. Muller J. Potencial genético de *Pleurotus ostreatus*. Borger, West Germani. *Mic. Neotrop. Aplic* 1998; 1: 29-44.
64. Ng T, Wang H, Wan D. Polysaccharopeptide from the Turkey Tail Fungus *Trametes versicolor* (L. Fr) inhibits human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2006.volume 8. 98 p.
65. Nosalova V., Bobek p., Cerná S, effects of pleuran (beta- glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol.Res.*50, 575-581.
66. Okuda T, Yoshioka Y, Ikekawa T, Chihara G, Nishioka K. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature* 1972; 238(80): 59- 60.
67. Ooi VEC, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharide. *Int J Med Mush* 1999; 1: 195-206.
68. Opetal L, Jahordar L, Chobot V, Zdansky P, Lukes J, Bratova M, Solichova D. Evidence for the hyperlipidemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. *British journal of biomedical science* 1997; 54(4): 240- 243.
69. Paulik S, Svrcec K, Mojzisor 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.
70. Rabel R, Stutz H, Fernández LC, Cavalcante JH, Cavalcante B, Bernardi RD, Moreno AN, Leita F, Soccol Cr. High immunomodulatory and preventive effects against Sarcoma 180 in mice with Reishi Mushroom *Ganoderma lucidum*. *Int J Med Mush* 2008; 10(1), pág 104.
71. Rodríguez N, Gómez FA. Cultivo de hongos comestibles en pulpa de café. *Avances*

- técnicos. Cenicafé. 2001; N° 285:1-8.
72. Rodríguez N, Jaramillo C. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* sobre residuos agrícolas de la zona cafetalera. Boletín técnico. Cenicafé 2005; N° 27.
 73. Rowan N.J., Smith J.E and Sullivan R. Immunomodulatory activities of mushrooms glucans and polysaccharide protein complexes in animals and humans (review). *Int J Med Mushr* 2003; 2, 95-110.
 74. Sakurai T, Ohno N, Yadomae T. Intravenously administered (1-3)- β -D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 939 augments murine peritoneal macrophage functions *in vivo*. *Chem. Pharm.Bull* 1992; 40: 2120-2124.
 75. Sánchez A, Royse B. La biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* Ed Limusa SA 2002, Pag .290.
 76. Sasaki T, Takasuka N, Chihara G, Maeda YY. Antitumor activity of degraded products of lentinan: its correlation with molecular weight. *Gann* 1985; 67(2): 191-5.
 77. Sigarrosa A. Biometría y diseño experimental. Ciudad de La Habana. Editorial Pueblo y Educación.1985.
 78. Smith J.E., Sullivan R and Rowan N.J. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs. Current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2003; 5: 217-234.
 79. Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, Yoo ID. Lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull* 1995; 43: 2105-21208.
 80. Steineck H. Cultivo comercial del champiñón. Zaragoza, España. Ed. Acribia; 1987: 142p.
 81. Suzuki T, Ohno N, Saito K, Yadomae T. Activation of the complement system by 1,3 β -D-glucans having different degrees of branching and different ultrastructures. *J. Pharmacobio- Dyn* 1992; 15: 277-285.
 82. Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Tanaka S, Tamura H, Yadomae T. Immunopharmacological and immunotoxicological activities of water-soluble (1-3) B-D- glucan, CSBG from *Candida spp.* *International Journal of Immunopharmacology* 2000; 22: 383-394.
 83. Tzianabos A. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 523- 533.
 84. Vedder PJ. Cultivo moderno del champiñón. Madrid, España. Ed Mundi Prensa 1986:369p.
 85. Villarreal L, Pérez J. Los hongos comestibles silvestres de México. *Micología Neotropical Aplicada* 1989; 2: 77- 144.
 86. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbial Biotechnol* 2002; 60: 258-74.
 87. 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.
 88. Werner y Jolles. Immunostimulating agents: what next? *Eur. J. Biochem* 1996; 242: 1-19.
 89. Wilment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta- glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 2001; 276: 43818-23.

90. Yadomae T. Structure and biological activities of fungal B- (1, 3) - glucans. *Yakugaku Zasshi* 2000; 120(5): 413- 431.
91. Yoshioka YM, Emori T, Ikekawa, Fakuoka F. Isolation, purification, and structure of components; 1975.
92. Zadrazil F. Cultivation of *Pleurotus sp.* 521- 557. En: Shuting Ch, Hayes WA, Miles PG, Chang ST. The biology and cultivation of edible mushrooms. New York. Academic Press; 1978.
93. 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.
94. Zervakis G, Balis C. Comparative study on the cultural characters of *Pleurotus* species under the influence of different substrates and fruiting temperatures. *Revista Mexicana de Micología Neotropical Aplicada* 1992; 5: 39-47.
95. Zhi-Binlin. Cellular and Molecular Mechanisms of immunomodulation by *G. lucidum*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2006, volume 8. 98 p.

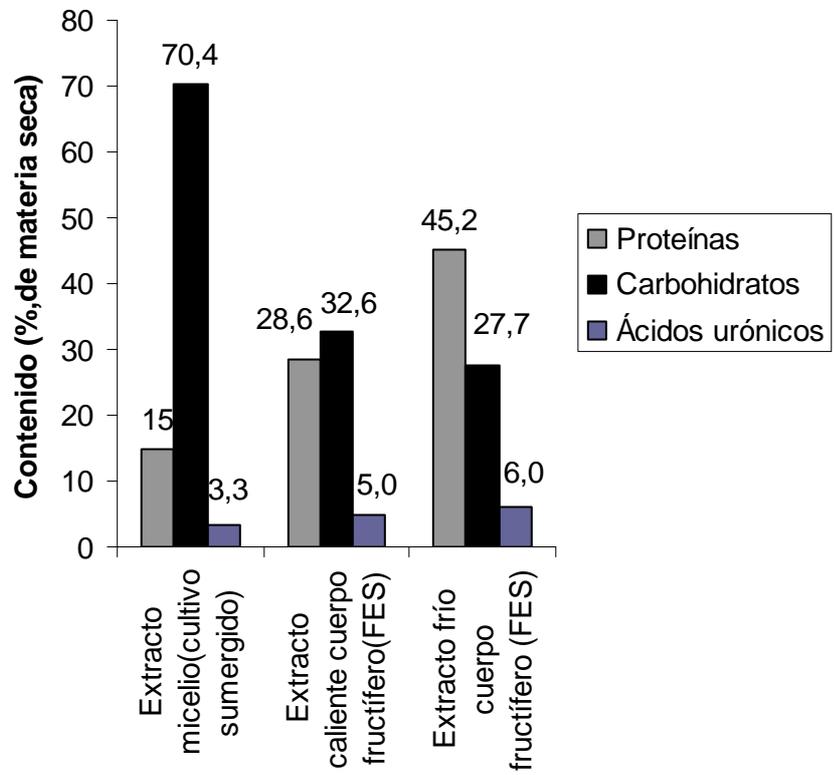


Fig. 1 Contenido de proteínas, carbohidratos y ácidos urónicos en extractos acuosos del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus spp.*

Tabla 1. Efecto de la administración a dosis única por vía endovenosa de un extracto acuoso del micelio de *Pleurotus spp.* sobre el sistema monocito-macrófago.

Grupos experimentales	Relación Absorbancia(A) a los 5 minutos	t ½(minutos)	Índice fagocítico(K)
Extracto micelial	0.21±0.09	10.11±1.35*	0.07±0.01*
Control	0.29±0.15	18.30±1.36	0.04±0.01

Se inoculó de forma endovenosa (vena de la cola) 0.2 mL de una solución de carbón coloidal. Se tomaron cada 5 minutos, después de la administración, muestras de sangre del plexo retroorbital, y se estimó la concentración de carbón coloidal en las muestras espectrofotométricamente a través de la absorbancia a 675nm. La velocidad de aclaramiento del carbón se expresó como su tiempo de vida media en sangre (t ½, minutos). Los valores representan las medias ± la desviación estándar de cada grupo.

(*) Diferencias significativas en la prueba de la t de Student para p < 0.05).

Tabla 2. Efectos del extracto acuoso del micelio de *Pleurotus spp.* en los parámetros hematológicos de ratones irradiados.

	Extracto acuoso del micelio de <i>Pleurotus spp</i>	Control (salina fisiológica)
Celularidad de médula ósea(x 10 ⁶ /fémur)	5.08 ±0.43**	1.13±0.46
Conteo de leucocitos(x 10 ⁹ /L)	10.5±4.8*	4.49±2.05
Neutrófilos (x 10 ⁹ /L)	5.14±1.36**	1.39±0.27
Linfocitos (x 10 ⁹ /L)	5.35±1.16**	3.01±0.18
Celularidad del bazo (x 10 ⁷ /bazo)	11.16±3.66**	6.20±1.87

Los valores representan las medias ± la desviación estándar de cada grupo
Diferencias significativas respecto al control, * P>0.05 o **P<0.01

Tabla 3.Efectos de la administración del extracto micelial de *Pleurotus spp.* en el sistema monocito-macrófago de ratones irradiados.

	Extracto micelial de <i>Pleurotus spp.</i>	Control (salina fisiológica)
Número de macrófagos peritoneales	4.61±0.33**	1.82±0.65
Relación de A a los 5 min.(A de la muestra/A del control sin administración)	1.62±0.12*	2.01±0.31

Los valores representan las medias ± la desviación estándar de cada grupo
Diferencias significativas respecto al control, * P<0.05 o **P<0.01

Tabla 4. Efectos del extracto acuoso del micelio de *Pleurotus spp.* en los pesos relativos de timo, bazo e hígado de ratones irradiados.

	Extracto acuoso del micelio de <i>Pleurotus spp.</i>	Control (salina fisiológica)
Peso corporal promedio(g)	23.31±2.28	23.48±1.99
Timo (g/100g de peso corporal)	0.13±0.05	0.09±0.04
Bazo (g/100g de peso corporal)	0.29±0.05	0.29±0.07
Hígado (g/100g de peso corporal)	5.33±0.35	4.86±0.63

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

Tabla 5. Efecto de la incubación con un extracto de *Pleurotus spp* (2.4 g/L) en el porcentaje de autólisis (Is) y el índice de activación autolítica (K_A) de diferentes microorganismos.

Microorganismos	Is (%)	K_A
Autolíticos naturales (I _c >0)		
<i>Bacillus subtilis</i> (1032)	24.7± 5.6	12.80
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	13.4± 5.5	1.88
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1071)	4.7±0.9	1.30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2010)	36.1± 6.0	3.05
<i>Saccharomyces fermentii</i> (2008)	19.8± 5.6	1.34
<i>Candida intermedia</i> (2034)	32.4± 7.9	1.62
<i>Candida sp</i> (2002)	2.7± 0.6	2.70
No autolíticos naturales (I _c =0)		
<i>Bacillus cereus</i> (1008)	1.8±0.4	1.80
<i>Escherichia coli</i> (1069)	2.1± 0.6	2.10

Los resultados se presentan como los promedios de tres réplicas. Cuando I_c>0 K_A= I_s/I_c, en los casos que I_c=0 K_A= I_s

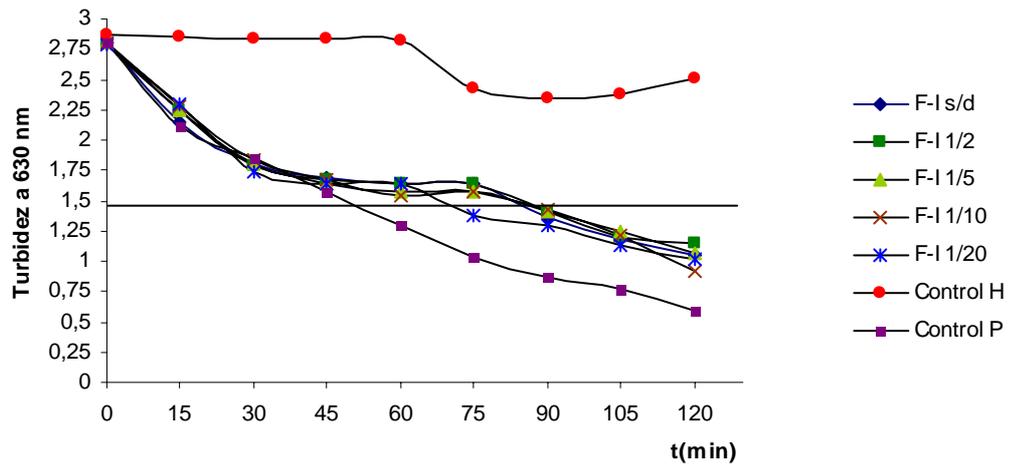


Figura 3. Activación de la vía alternativa del sistema complemento por el extracto micelial de *Pleurotus spp.* a diferentes concentraciones.

El extracto micelial a diferentes concentraciones fue incubado con suero humano normal. Se adicionaron 50 μ L de una suspensión de eritrocitos de conejo (7.5×10^8 células/mL) y cada 15 min durante 2 horas se determinó la turbidez a 630nm. Se emplearon un control negativo (tampón veronal+eritrocitos, Control P). Se presentan las medias de los experimentos realizados por triplicado. El tiempo requerido para la lisis del 50 % de la suspensión de eritrocitos se indica en el control positivo, con la letra(a), en la disolución 1/20 del extracto micelial con la letra (b) y en las restantes disoluciones con la letra (c).

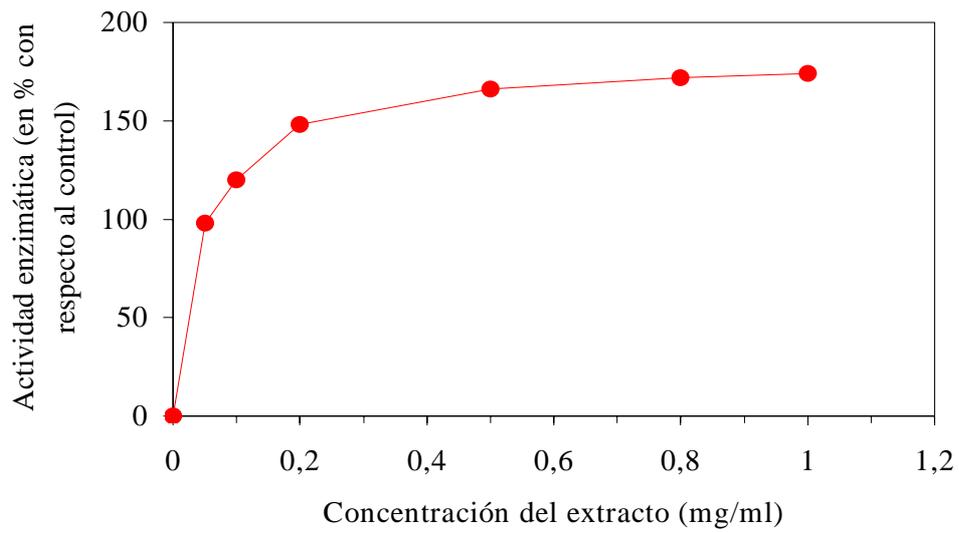


Figura 4. Actividad estimuladora de macrófagos dosis-dependiente del extracto micelial de *Pleurotus spp.*

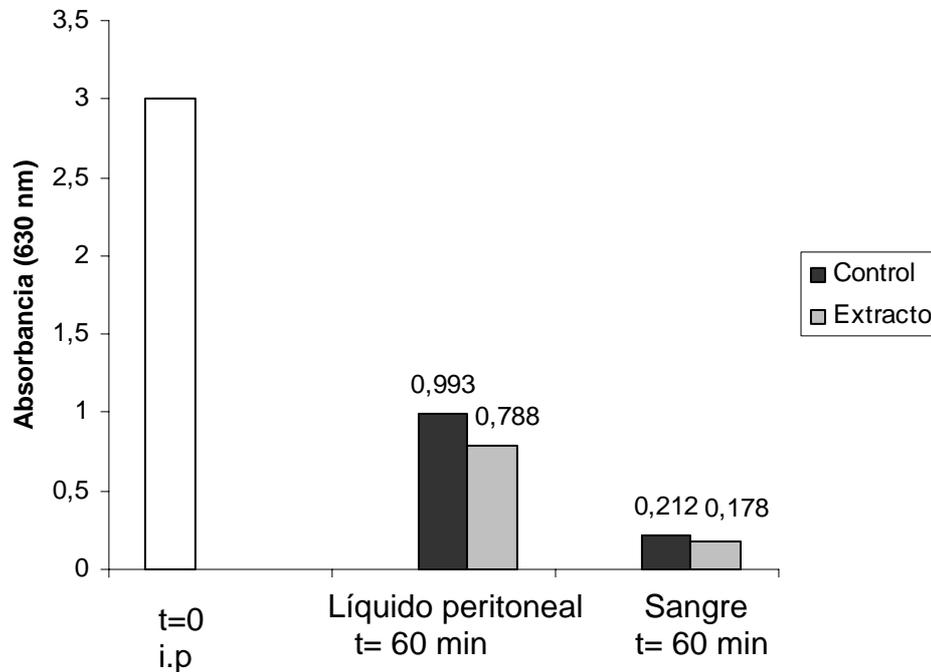


Figura 2. Efecto de la administración (100 mg/kg) de un extracto micelial de *Pleurotus spp.* en la permeabilidad vascular:

El extracto o la solución salina (control) fue administrado i.p a ratones Balb/c. a los 60 min, se inoculó i.p 0.5 mL de una solución de azul de Evans (10 mg/mL). Transcurridos 60min se estimó la concentración de azul de Evans en sangre y cavidad peritoneal a 630 nm. Se realizaron diluciones 1:4 de las muestras de exudado peritoneal. Los valores representan la media \pm desviación estándar de cada grupo (*) Diferencias significativas en la prueba de la t de Student para $p < 0.05$.