



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“EFECTO DE EXTRACTOS DE CULTIVO
SUMERGIDO DE *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus
djamor* Y *Pleurotus agaves* SOBRE LA
ACTIVACIÓN *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

BIÓL. SANDRA GÓMEZ VELÁZQUEZ

CO-DIRECTORES DE TESIS

DRA. JUDITH GONZÁLEZ CHRISTEN

DR. ISAAC TELLO SALGADO

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2018

Fecha: 16 de febrero de 2018

Asunto: Jurado

Medio de notificación: Impresa/personal

Folio: FF/D/SAC/CIP/MF/053/2018

BIOL. SANDRA GÓMEZ VELÁZQUEZ
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "**Efecto de extractos de cultivo sumergido de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* y *Pleurotus agaves* sobre la activación *in vitro* de macrófagos**".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dra. Verónica Rodríguez López
SECRETARIO: Dr. José Luis Montiel Hernández
VOCAL 1: Dr. Ismael León Rivera
VOCAL 2: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
VOCAL3: Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



Dr. Julio César Rivera Leyva.
Jefatura de Posgrado



Facultad
de Farmacia
POSGRADO

ccp: archivo
mitv

Este proyecto se desarrolló en:

El Laboratorio 13 de Inmunidad Innata de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la co-dirección de la Dra. Judith González Christen.



El Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con la co-dirección del Dr. Isaac Tello Salgado.



En el Laboratorio 9 de Química Analítica Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la supervisión del Dr. Ismael León Rivera.



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de la beca otorgada (N° 741572) para la realización de mis estudios de Maestría.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Inflamación.....	5
2.1.1. Proceso inflamatorio	6
2.1.2. Macrófagos	7
2.1.2.1. Función de los macrófagos.....	7
2.2. Agentes antiinflamatorios	8
2.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE).....	9
2.2.2. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides	10
2.2.3. Antiinflamatorios biológicos.....	10
2.2.4. Otros posibles agentes antiinflamatorios.....	11
2.3. Hongos: fuente de compuestos antiinflamatorios	12
2.3.1. Género <i>Pleurotus</i>	13
2.3.1.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.....	14
2.3.1.2. <i>Pleurotus djamor</i> (Rumph. ex Fr.) Boedijn	15
2.3.1.3. <i>Pleurotus agaves</i>	16
2.3.2. Propiedades farmacológicas de <i>Pleurotus</i>	17
2.3.2.1. Actividad antiinflamatoria de <i>Pleurotus</i>	21
2.4. Producción de <i>Pleurotus</i>	21
2.4.1. Cultivo en estado sólido o FES (fermentación en estado sólido)	22
2.4.2. Cultivo sumergido o FEL (fermentación en estado líquido)	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	29

5.1. Objetivo General	30
5.2. Objetivos Particulares.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Diseño experimental.....	32
6.2. Material fúngico	33
6.3. Activación de las cepas	33
6.4. Crecimiento en cultivo líquido	34
6.4.1. Medio de cultivo complejo.....	34
6.4.2. Medio de cultivo simplificado	34
6.4.3. Preparación del inóculo.....	34
6.5. Cinética de crecimiento en medio líquido	35
6.5.1. Velocidad de crecimiento en medio líquido	35
6.6. Extracción de metabolitos secundarios	36
6.7.1. Condiciones de crecimiento de las células.....	37
6.7.2. Preparación de las muestras de prueba.....	38
6.7.3. Ensayo de citotoxicidad	38
6.7.4. Efecto de los extractos en el modelo de inflamación <i>in vitro</i>	39
6.7.4.1. Expresión de mediadores pro-inflamatorios en macrófagos RAW 264.7 ..	39
6.7.4.1.1. Determinación en la producción de óxido nítrico	39
6.7.4.1.2. Determinación en la producción de citocinas	39
6.7.4.2. Línea celular RAW-Blue™	40
6.7.4.2.1. Determinación de activación de NF-kB	40
6.8. Análisis químico	41
6.8.1. Cromatografía en capa fina.....	41
6.8.2. Resonancia Magnética Nuclear ¹ H.....	41
7. RESULTADOS	42
7.1. Cinética de crecimiento en medio líquido	43
7.2. Extracción de metabolitos secundarios	45
7.3.1. Efecto de los extractos en el crecimiento celular.....	49
7.3.2. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	51
7.3.2.1. Efecto en la producción de óxido nítrico (NO).....	51

7.3.2.2. Efecto en la secreción de citocinas.....	53
7.3.2.3. Efecto en la activación de NF-kB.....	56
7.4. Análisis químico	59
7.4.1. Cromatografía en capa fina.....	59
7.4.2. Espectros de RMN.....	60
7.4.3. Cromatografía de gases - Espectrometría de masas	68
8. DISCUSIÓN.....	72
8.1. Producción de biomasa de <i>Pleurotus</i> en cultivo sumergido.....	73
8.2. Actividad biológica de los extractos de <i>Pleurotus</i>	77
8.3. Análisis químico de los extractos de <i>Pleurotus</i>	81
9. CONCLUSIONES	85
10. PERSPECTIVAS	87
11. BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXO 1.....	101
ANEXO 2.....	102
ANEXO 3.....	103
ANEXO 4.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	14
Figura 2. Compuestos aislados de <i>Pleurotus ostreatus</i> con actividad biológica. a) lovastatina aislada del cuerpo fructífero, y b) estructura monomérica del polímero pleuran.	15
Figura 3. Cuerpo fructífero de <i>Pleurotus djamor</i>	16
Figura 4. Estructura del compuesto esteroidal estigmast-24 (28)-en-3β-ol, de <i>Pleurotus djamor</i>	16
Figura 5. Cuerpo fructífero de <i>Pleurotus agaves</i>	17
Figura 6. Cultivo sólido de <i>Pleurotus ostreatus</i>	23
Figura 7. Cultivo sumergido de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizando un bioreactor “air-lift”	24
Figura 8. Germoplasma de a) <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-50), b) <i>P. djamor</i> (P-50) y c) <i>P. agaves</i> (P-52).	33
Figura 9. Protocolo de extracción de los metabolitos secundarios (Alarcón y Águila, 2006).	37
Figura 10. Cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido (BFL+C), de las especies de <i>Pleurotus</i> . Cada punto representa la media ± DE, n=3. * <i>P</i> <0.05.	44
Figura 11. Productos del cultivo sumergido de a) <i>Pleurotus ostreatus</i> (CP-50), b) <i>P. djamor</i> (P-50) y c) <i>P. agaves</i> (P-52).	45
Figura 12. Proceso de separación del cultivo fúngico, a) medio agotado y b) biomasa (liofilizada).	46
Figura 13. a) Proceso de separación por par de disolventes; b) formación de fase intermedia. Fo= Fase orgánica; Fi= Fase intermedia; Fa= Fase acuosa.	47
Figura 14. Extractos de la fracción orgánica de las especies de <i>Pleurotus</i> , a) extracto después de concentrar en rotavapor; b-d) extracto seco de b) <i>Pleurotus ostreatus</i> , c) <i>P. djamor</i> y d-e) <i>P. agaves</i>	47
Figura 15. Efecto sobre el crecimiento celular de macrófagos RAW 264.7 por los extractos del medio agotado durante 24 horas, a diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL). Los gráficos representan la media DE, n=3. ** <i>P</i> <0.01, *** <i>P</i> <0.001, **** <i>P</i> <0.0001, comparados con el grupo control (MOCK).	50

Figura 16. Efecto sobre el crecimiento celular de macrófagos RAW 264.7 por los extractos de la biomasa durante 24 horas, a diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * <i>P</i> < 0.05, **** <i>P</i> < 0.0001, comparados con el grupo control (MOCK).	50
Figura 17. Efecto de la lovastatina (a) y los extractos del medio agotado (b) en la producción de ON. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con Lovastatina (5, 10, 50 y 100 µg/mL) y extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. ** <i>P</i> < 0.01, **** <i>P</i> < 0.0001, comparados con el DMSO.	52
Figura 18. Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de ON. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a diferentes concentraciones (3.1 a 25 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. ** <i>P</i> < 0.01, *** <i>P</i> < 0.001, **** <i>P</i> < 0.001, comparados con el DMSO.....	53
Figura 19. Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de IL-6. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.	54
Figura 20. Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de IL-6. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a concentraciones de 12.5 y 25 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.	54
Figura 21. Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de TNF. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.	55
Figura 22. Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de TNF. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a concentraciones de 12.5 y 25 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.	56
Figura 23. Efecto de los extractos del medio agotado en NF-kB. Macrófagos pre-tratados con <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a diferentes concentraciones (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * <i>P</i> < 0.05, *** <i>P</i> < 0.001, **** <i>P</i> < 0.0001, comparados con el DMSO.	57
Figura 24. Efecto de los extractos de la biomasa en NF-kB. Macrófagos pre-tratados con <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. djamor</i> y <i>P. agaves</i> a diferentes concentraciones (3.1 a 25 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * <i>P</i> < 0.05, ** <i>P</i> < 0.01, **** <i>P</i> < 0.0001, comparados con el DMSO.	58
Figura 25. Cromatografía en capa fina de los extractos del medio agotado y la biomasa, de las especies de <i>Pleurotus</i> , utilizando un sistema de elución hexano: acetato de etilo: metanol (5:5:1); observado con luz UV de a) onda corta y b) onda larga. Extractos de medio agotado carril 1) <i>Pleurotus ostreatus</i> ,	

2) *P. djamor* y 4) *P. agaves*; extractos de la biomasa carril 5) *Pleurotus ostreatus*, 7) *P. djamor* y 8) *P. agaves*; compuestos estándar en el carril 3) Lovastatina y 6) cumarina. 59

Figura 26. Cromatografía en capa fina de los extractos del medio agotado y la biomasa de las especies de *Pleurotus*, utilizando un sistema de elución hexano: acetato de etilo: metanol (5:5:1); revelado con a) sulfato cérico y b) 4-hidroxibenzaldehído. Extractos de medio agotado carril 1) *Pleurotus ostreatus*, 2) *P. djamor* y 4) *P. agaves*; extractos de la biomasa carril 5) *Pleurotus ostreatus*, 7) *P. djamor* y 8) *P. agaves*; compuestos estándar en el carril 3) Lovastatina y carril 6) cumarina. 60

Figura 27. Espectro de RMN ¹H del extracto de acetato de etilo del medio agotado, de *Pleurotus ostreatus*. 61

Figura 28. Espectro de RMN ¹H del extracto de acetato de etilo del medio agotado de *Pleurotus djamor*. 62

Figura 29. Espectro de RMN ¹H del extracto de acetato de etilo del medio agotado *Pleurotus agaves*. 63

Figura 30. Espectro de RMN ¹H del extracto de acetato de etilo de la biomasa, de *Pleurotus ostreatus*. 65

Figura 31. Espectro de RMN ¹H del extracto de acetato de etilo de la biomasa, de *Pleurotus djamor*. 66

Figura 32. Espectro de RMN ¹H del extracto de acetato de etilo de la biomasa, de *Pleurotus agaves*. 67

Figura 33. Cromatograma de iones totales del extracto de acetato de etilo de *Pleurotus djamor*. 68

Figura 34. Cromatograma de iones totales del extracto de acetato de etilo de *Pleurotus ostreatus*. 69

Figura 35. Comparación del espectro de masas correspondiente al etil éster del ácido hexadecanoico presente en el extracto de *Pleurotus ostreatus* (inferior) con el de la biblioteca del equipo de CG-EM (superior). 70

Figura 36. Comparación del espectro de masas correspondiente al ácido 9,12-octadecadienoico, presente en el extracto de *Pleurotus djamor* (inferior) con el de la biblioteca del equipo de CG-EM (superior). 71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos bioactivos y de uso terapéutico de <i>Pleurotus</i> spp. (tomado de Paul <i>et al.</i> , 2017).	19
Tabla 2. Producción de biomasa y velocidad de crecimiento de <i>Pleurotus</i> spp. en medio de cultivo líquido.	43
Tabla 3. Rendimiento de la producción de biomasa y medio agotado para la extracción de metabolitos secundarios de <i>Pleurotus</i>	46
Tabla 4. Rendimiento del extracto del medio agotado de <i>Pleurotus</i> spp.	48
Tabla 5. Rendimiento del extracto de la biomasa de <i>Pleurotus</i> spp.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AP-1	Proteína activadora 1 (factor de transcripción)
BFL+C	Buffer de fosfatos líquido más cereal
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
COBIOCH	Corredor Biológico Chichinautzin
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
g	Gramos
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
IFN-γ	Interferón γ
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
L	Litro
LFA-1	Antígeno -1 asociado a la función de linfocitos
LPS	Lipopolisacárido
μ	Velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
M	Molar
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOCK	Grupo control basal
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	nanómetro
PBS	Buffer fosfato salino
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	Prostaciclina
rpm	Revoluciones por minuto
RMN ¹H	Resonancia magnético nuclear de protón
spp.	Especies

t_d	Tiempo de duplicación
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TLR	Receptor tipo Toll
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Las especies del género *Pleurotus* son conocidas como hongos comestibles, de las cuales también se han reportado propiedades farmacológicas como anti-lipídica y antiinflamatoria, debido a la presencia de estatinas y otros metabolitos bioactivos. Sin embargo, no todas las especies tienen estas propiedades y el potencial farmacológico de cepas mexicanas no ha sido reportado. Es por ello que, en este estudio realizamos el crecimiento biotecnológico de *Pleurotus ostreatus* cepa CP-50, *P. djamor* cepa P-50 y *P. agaves* cepa P-52, utilizando un sustrato no convencional, con el objetivo de evaluar la actividad antiinflamatoria de los metabolitos intracelulares y extracelulares, en un modelo *in vitro*.

Los hongos fueron crecidos en medio de cultivo líquido usando un sustrato no convencional (BFL+C). Los *pellets* del cultivo fúngico fueron separados por filtración, la biomasa fue liofilizada y el medio líquido fue utilizado directamente para la extracción. En estas condiciones de crecimiento, la producción de biomasa seca fue 5.40, 4.94 y 4.27 g/L y la velocidad de crecimiento de 0.11, 0.13 y 0.10 horas⁻¹, para *P. ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves*, respectivamente. La biomasa seca y el medio líquido fueron extraídos utilizando acetato de etilo como disolvente.

Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados para determinar las concentraciones seguras de los extractos, y se evaluó el efecto en la producción de NO, TNF e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS a diferentes concentraciones, mediante la reacción de Griess o ELISA. La activación de NF-κB fue evaluada en los macrófagos de la línea celular RAW-Blue™. Los resultados fueron comparados con las células tratadas con indometacina. Finalmente, se realizó un perfil cromatográfico y análisis de RMN para comparar los metabolitos entre las diferentes cepas.

Nosotros observamos que el extracto del medio líquido (ELM) de las tres especies fue citotóxico por arriba de los 50 µg/mL, mientras que el extracto del micelio (EM) fue citotóxico por arriba de 25 µg/mL para *P. ostreatus*, y arriba de 50 µg/mL para *P. djamor* y *P. agaves*. Por lo tanto, para los ensayos de actividad antiinflamatoria utilizamos concentraciones menores a esas, donde el EM de las tres cepas tuvo mayor efecto inhibitorio que ELM, en la producción de mediadores pro-inflamatorios. En este caso, las células tratadas con ELM de *P. ostreatus* y *P. agaves* redujeron la producción de NO, IL-6 y TNF a 50 µg/mL, pero los extractos de *P. djamor* no tuvieron efecto. Por

otro lado, EM de las tres especies redujo la producción de ON incluso a 3 µg/mL, y para TNF a 12.5 y 25 ug/mL. Para IL-6 sólo *P. agaves* redujo su secreción. Claramente, la activación de NF-kB fue drásticamente inhibida con todas las cepas evaluadas.

El perfil cromatográfico de los extractos de acetato de etilo de *P. ostreatus* y *P. djamor* mostraron mayor similitud que *P. djamor* y, el análisis preliminar de RMN sugirió ácidos grasos como metabolitos mayoritarios.

En conclusión, este trabajo confirmó el potencial uso de *P. ostreatus* como fuente de metabolitos antiinflamatorios, y por primera vez para *P. agaves*. Interesantemente, *P. djamor* presentó un diferente perfil metabólico y tuvo menos potencial antiinflamatorio.

ABSTRACT

Species of the genus *Pleurotus* are known as edible mushrooms, but also it has been reported to have pharmacological properties such as anti-lipidemic and anti-inflammatory activities, associated to the presence of statins and other bioactive metabolites. However, not all *Pleurotus* species has these activities, and the pharmacological potential of Mexican strains has not been reported. Therefore, in this study we perform the biotechnological growth of *Pleurotus ostreatus* strain CP-50, *P. djamor* strain P-50 and *P. agaves* strain P-52, using a non-conventional source, with the objective to evaluate the anti-inflammatory activity of intracellular and extracellular secondary metabolites, in an *in vitro* model of macrophage activation.

The mushrooms were grown in liquid culture medium using a non-conventional source (BFL+C). The *pellets* of the fungal culture were separated by filtration, the biomass was lyophilized and the liquid medium was used directly for extraction. In this conditions of growth, the production of dry biomass were 5.40, 4.94 and 4.27 g/L and the speed of growth were 0.11, 0.13 and 0.10 hour⁻¹, for *P. ostreatus*, *P. djamor* and *P. agaves*, respectively. The dry biomass and the liquid medium were extracted using ethyl acetate as dissolvent.

Cytotoxic assay were conducted to determine the safe concentrations of the extracts and the effect on NO, TNF e IL-6 production was evaluated in LPS-stimulated-macrophages at different concentrations by Griess reaction or ELISA. The activation of NF-kB was evaluated in the murine macrophage cell line RAW-Blue™. The results were compared with the cells treated with indomethacin. Finally, a chromatographic profile and RMN analyses were realized to compare metabolites between different strains.

We observed that the extract obtained from liquid medium (LME) of the three strains were cytotoxic over 50 µg/mL, while the mycelium extracts (ME) were toxic over 25 µg/mL for *P. ostreatus*, and over 50 µg/mL for *P. djamor* and *P. agaves*. Thus, we used concentrations lesser of these concentrations for anti-inflammatory activity assays, where the ME of the three strains had more inhibitory effect than LME on production of the pro-inflammatory mediator In this case, the cells treated with LME from *P. ostreatus* and *P. agaves* reduced production of NO, IL-6 and TNF to 50 µg/mL, but extracts of *P. djamor* has not effect. By other hand, ME of the three strains reduced

ON even at 3 $\mu\text{g/mL}$ and TNF production at 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$. For IL-6 only *P. agaves* reduced their secretion. Notoriously, NF-kB activation was drastically inhibited with all strains tested.

Chromatographic profile from ethyl acetate extracts of *P. ostreatus* and *P. agaves* showed more similarity than *P. djamor*, and the preliminary RMN assay suggest lipid acids as majority metabolites.

In conclusion, this study confirmed the potential use of *P. ostreatus* as source of anti-inflammatory metabolites and for the first time for *P. agaves*. Interestingly, *P. djamor* presented a different metabolic profile and has a lesser anti-inflammatory potential.

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo esencial para la supervivencia de los organismos ante diversos factores de agresión, como son agentes patógenos, exposición a agentes nocivos ambientales, o físicos como el calor o la radiación, por mencionar algunos. Sin embargo, en algunas situaciones esta reacción puede estar descontrolada y sin un aparente beneficio para el organismo, causando daño al mismo. La inflamación ocurre cuando el cuerpo sufre agresión ya sea por microorganismos, trauma o una variedad de agentes físicos (Gómez-Estrada *et al.*, 2011).

Además, en algunos procesos la inflamación aguda puede generar daño severo, como la sepsis, o una respuesta que incapacitan al paciente, como el caso de alergias y asma. Es por ello que existen diversos grupos de fármacos antiinflamatorios capaces de actuar sobre las células diana, bloquear las diferentes vías de señalización y mediadores del proceso inflamatorio. A pesar de que son efectivos, varios de ellos presentan el inconveniente de mostrar efectos indeseables y es preciso reunir esfuerzos para contar con alternativas en el tratamiento de la inflamación que sean menos tóxicas al organismo.

La inflamación está involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades agudas y crónicas de origen autoinmune como la artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y muchas más. Esto puede asociarse con el hecho de que varias enfermedades son resultado de una respuesta inflamatoria mal regulada, esto es, cuando la inflamación aguda no logra mitigar el estímulo nocivo o la misma respuesta inflamatoria se autoperpetúa. En esas circunstancias, el papel protector de la inflamación se vuelve perjudicial cuando la respuesta se hace excesiva en magnitud y duración (Okin & Medzhitov, 2012).

Por otro lado, los hongos desde hace miles de años han formado parte de la historia en la civilización humana, jugando un papel importante en su alimentación, y aunque menos conocido, por ciertas propiedades medicinales. Particularmente, las especies de *Pleurotus* se ha sugerido que producen sustancias bioactivas que se han utilizado para el tratamiento de varias enfermedades crónicas (Ajith y Janardhanan, 2007).

Por lo tanto, reconociendo que los hongos del género *Pleurotus* constituyen una fuente de metabolitos de gran interés con propósitos terapéuticos, en el presente estudio, se pretende evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos

intracelulares y extracelulares de tres especies de *Pleurotus*, dos de las cuales son nativas de Morelos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Inflamación

La inflamación se describe como un mecanismo de defensa del organismo en respuesta al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por estímulos exógenos o endógenos, de cualquier naturaleza ya sea física, química, biológica o mecánica. Este proceso implica una serie de eventos moleculares, celulares y vasculares muy heterogéneo, cuyo objetivo es liberar al organismo del agente causal y restablecer la homeostasis del tejido. Usualmente está acompañada por los signos clínicos conocidos como edema, rubor, calor, dolor espontáneo y pérdida de la función tisular (García Barreno, 2008; Okin & Medzhitov, 2012).

De acuerdo al tiempo de duración la inflamación puede clasificarse como aguda o crónica, y dependiendo de su evolución tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa están involucradas (Abdullatif, 2016). La inflamación aguda es la respuesta a corto plazo que se produce frente a un agente nocivo y presenta una evolución breve que se caracteriza por vasodilatación, pérdida de la vascularidad y la migración de leucocitos al sitio de la lesión para controlar la agresión y finalmente reparar el tejido dañado (Joydeb *et al.*, 2012). En esta etapa la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial, pues una respuesta no controlada puede llevar a un estado de choque, o bien una resolución inadecuada puede conducir a un estado crónico, donde la inflamación tiene mayor duración y se caracteriza básicamente por la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular.

Cuando se ocasiona daño al tejido, el sistema inmune se activa y desencadena una serie de eventos relacionados con la respuesta inflamatoria. En este proceso se muestran cuatro componentes principales que participan de manera organizada: a) inductores inflamatorios (señales exógenas o endógenas, que informan del mal funcionamiento del tejido); b) células sensoras (macrófagos residentes de tejido y células cebadas, inductores que detectan receptores específicos y responden produciendo mediadores inflamatorios); c) mediadores inflamatorios (actúan en los tejidos diana y alteran su estado funcional, promoviendo más inductores o eliminándolos); y, por último, d) mecanismos de reparación de tejido, cuya función principal es la restauración de la homeostasis del tejido (Okin y Medzhitov, 2012).

El sistema inmune innato es el principal mecanismo de defensa de nuestros organismos e involucra la actividad de diversas células, incluidos los neutrófilos,

macrófagos, las células cebadas y las células dendríticas, entre otras. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo implica la actividad de células más especializadas como las células B y T, que son responsables de erradicar los patógenos invasores mediante la producción de receptores y anticuerpos específicos.

2.1.1. Proceso inflamatorio

En las etapas tempranas de la inflamación hay un incremento en el tamaño de los vasos alrededor del foco inflamatorio, y la liberación de líquido. Ante este evento, distintas células son reclutadas al sitio lesionado, en primer lugar, los neutrófilos y, posteriormente, los macrófagos; es hasta varios días después que llegan los linfocitos. Los neutrófilos liberan proteínas a través de un proceso de degranulación, creando un ambiente citotóxico que incluye especies reactivas de oxígeno y proteasas. A su vez, los macrófagos son primordiales en el inicio del proceso de inflamación, ya que poseen receptores específicos capaces de reconocer elementos extraños, y cuando eso sucede producen citocinas como IL-1 β y TNF que desencadenan la inflamación y promueven la producción de más mediadores químicos (Noah *et al.*, 2012).

Los mediadores químicos a su vez alteran los estados funcionales de las células, tejidos y órganos, de manera que permiten, primero su adaptación y, posteriormente la reparación. Estas moléculas pertenecen a distintas clases químicas entre las que se encuentran aminas vasoactivas (histamina y serotonina), proteínas (citocinas, factores de crecimiento, factores de complemento, anticuerpos y quimiocinas), especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como mediadores lipídicos (factores activadores de plaquetas, prostanoïdes, leucotrienos) (Gómez Estrada *et al.*, 2011).

En la etapa de resolución de la inflamación se lleva a cabo la eliminación de los agentes patógenos, desechos pro-inflamatorios, macrófagos, la activación de receptores anti-inflamatorios y de reparación que normalizan la homeostasis tisular. Entre los principales factores que median la resolución se incluyen IL-10, TGF- β y mediadores lipídicos como lipoxinas, resolvinas y protectinas (Kowalewska *et al.*, 2010).

2.1.2. Macrófagos

Los macrófagos son un componente principal del sistema de fagocitos mononucleares que engloba un conjunto de células estrechamente relacionadas y originarias de la médula ósea, que incluyen monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares. Junto con los neutrófilos constituyen el principal mecanismo de defensa del organismo frente a agentes extraños. Desde la sangre, los monocitos migran a varios tejidos y se diferencian en macrófagos. En condiciones basales los macrófagos tienden a estar en reposo pero cuando se presenta un estímulo, son capaces de proliferar o bien se activan y pasan a ejercer funciones específicas. De lo contrario, en ausencia de estímulos que los induzca a proliferar o activarse, los macrófagos permanecen en estado de reposo durante corto tiempo y luego mueren por procesos de apoptosis (Varol *et al.*, 2015).

Estas células poseen una gran diversidad de receptores de membrana que reconocen cualquier tipo de agresión. Entre las señales que pueden activar a los macrófagos se incluyen las citocinas (INF- γ , GM-CSF y TNF), lipopolisacáridos bacterianos, proteínas de la matriz extracelular, complejos antígeno-anticuerpo, entre muchos otros (Oneissi Martínez *et al.*, 2008).

2.1.2.1. Función de los macrófagos

Estas células desempeñan un papel clave en la respuesta inmune ya que forman un puente entre la respuesta inmune innata y la adquirida. En el contexto de inmunidad innata, los macrófagos fagocitan y eliminan partículas extrañas como bacterias, macromoléculas y células apoptóticas, impidiendo que éstas puedan verter su contenido potencialmente tóxico al medio extracelular y evitar posibles procesos inflamatorios. Una vez que los macrófagos procesan el material fagocitado, presentan el antígeno a los linfocitos T, donde se inicia el mecanismo de inmunidad adquirida, que implica la actividad de células más especializadas, la cual finaliza con la producción de anticuerpos u otros mediadores específicos como IFN- γ , IL-10, etc. (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Asimismo, los macrófagos pueden inducir la muerte extracelular de microorganismos mediante la secreción de enzimas, metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno e intermediarios del metabolismo lipídico, por ejemplo prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos.

En la inflamación, los macrófagos cumplen cuatro funciones principales: 1) reconocimiento, fagocitosis y liberación de moléculas pro-inflamatorias, como NO y citocinas, de las cuales TNF, IL-1 β e IL-6 promueven el reclutamiento de otras células inflamatorias en los puntos de inflamación y son responsables en mayor parte de los efectos sistémicos de la inflamación; 2) presentación del antígeno e inmunomodulación, en este caso los macrófagos procesan antígenos extraños y los presentan en su superficie para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T y promuevan su activación, los cuales producirán otros mediadores que, de manera recíproca, activarán a su vez a los macrófagos aumentando su eficiencia en la presentación de antígeno; 3) regulación negativa de la inflamación a través de la secreción de IL-10, TGF- β y resolvinas y 4) reparación de tejido (Labonte *et al.*, 2014).

2.2. Agentes antiinflamatorios

La inflamación que involucra el sistema inmune innato y adaptativo es una respuesta autolimitada y normal, sin embargo, cuando se pierde su control y continua por períodos largos, se desarrolla un proceso de inflamación crónica que no sólo implica la presencia de ciclos de retroalimentación positiva, la generación de destrucción tisular (más que su reparación) y, eventualmente, esto puede llevar a la disfunción tisular (García Barreno, 2008).

Se ha observado que la inflamación crónica está íntimamente asociada con enfermedades de alta morbilidad y mortalidad como las enfermedades metabólicas, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades musculo-esqueléticas, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Okin & Medzhitov, 2012). En éstas y en otras enfermedades, la respuesta inflamatoria puede ocasionar más daño que las causas de la enfermedad y sus efectos se generalizan, desembocando incluso en la muerte del individuo (García Barreno, 2008). Es por ello que actualmente existen una amplia variedad de agentes antiinflamatorios para intentar regular de manera negativa la respuesta inflamatoria, reduciendo el dolor, la inflamación, la fiebre y limitando su cronicidad.

2.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Los AINEs constituyen uno de los grupos de fármacos más prescritos a nivel mundial en virtud de que tienen en común un efecto antiinflamatorio, analgésico, antipirético y, para el caso del ácido acetilsalicílico, también cuenta con un efecto anti-agregante plaquetario (Dinarelo, 2010). La inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) es la propiedad farmacológica fundamental de la mayoría de estos medicamentos ya que bloquean la síntesis de prostaglandinas, las cuales funcionan como mediadores de la respuesta inflamatoria (Ungprasert *et al.*, 2016). Existen dos isoformas de la ciclooxigenasa, las cuales son similares y ambas catalizan la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La diferencia más importante entre ellas es su patrón de regulación y expresión tisular: mientras que COX-1 está expresada constitutivamente bajo condiciones fisiológicas normales en las células y lleva a la producción de bajos niveles de PGE₂ y regula la homeostasis, la COX-2 es inducida por varios estímulos y es responsable de la producción de una gran cantidad de prostaglandinas en escenarios inflamatorios (Agarwal *et al.*, 2009).

Los AINEs convencionales se han utilizado durante décadas en una gran variedad de indicaciones terapéuticas, sin embargo, su utilidad se ha visto limitada por la presencia de efectos adversos significativos en el tracto gastrointestinal, los cuales incluyen lesiones en la mucosa, hemorragias, úlceras, perforación intestinal o insuficiencia renal. Incluso algunos estudios indican que también pueden repercutir en otros sistemas u órganos (Salido *et al.*, 2001). Se ha sugerido que parte de estos efectos adversos puede ser debido a la inhibición de la isoforma COX-1, pues se cree que la actividad antiinflamatoria de los AINEs está dada por la inhibición de COX-2 (Agarwal *et al.*, 2009)

Los inhibidores altamente selectivos de la COX-2 (coxib) son un subgrupo de AINE de nueva generación, utilizados como alternativas más seguras a los AINE convencionales. En su mayor parte, los inhibidores selectivos de COX-2 tienen efectos secundarios gastrointestinales significativamente reducidos en comparación con los inhibidores de la COX-1. Sin embargo, en el caso del rofecoxib, se encontró que su consumo a largo plazo causaba efectos adversos cardiovasculares, razón por la cual fue retirado voluntariamente del mercado. Originalmente se asumió que el uso crónico

de inhibidores coxibs se asociaba con un aumento de eventos cardiovasculares y cerebrovasculares, posiblemente porque afectan la producción de prostaciclina (PGI₂) en células endoteliales, un inhibidor de la agregación plaquetaria (Dinarello, 2010; Ungprasert *et al.*, 2016). Sin embargo en el 2017, la FDA reconoció que también los inhibidores no selectivos de COX-2 presentan este potencial de asociarse a eventos cerebrovasculares.

2.2.2. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides

Los glucocorticoides son un grupo de fármacos que incluyen formas sintéticas derivadas del cortisol o hidrocortisona, y son ampliamente utilizados en el tratamiento de muchas enfermedades inflamatorias, principalmente enfermedades crónicas como el asma, osteoartritis y enfermedades autoinmunes (Gómez-Estrada *et al.*, 2011).

Los glucocorticoides ejercen su efecto farmacológico al entrar a la célula y unirse al receptor esteroide citoplasmático. A continuación, este complejo se transloca al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN dentro de las regiones promotoras de genes blanco y compitiendo con factores de transcripción, como AP-1 y NF-κB, los cuales incrementan la expresión de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias. Los glucocorticoides también suprimen la expresión de genes que codifican factores de crecimiento de células T, tales como IL-2, IL-4, IL-15 e IL-17 así como INF-γ. También reducen la expresión de genes que codifican las enzimas COX-2 y óxido nítrico sintasa, y la molécula de adhesión intracelular ICAM-1, las cuales se inducen normalmente por citocinas IL-1β y TNF. Por otro lado, los glucocorticoides también incrementan la expresión de genes que codifican moléculas antiinflamatorias como la citocina IL-10 (Dinarello, 2010).

2.2.3. Antiinflamatorios biológicos

A todo lo largo del proceso inflamatorio, existen citocinas pro-inflamatorias que desempeñan un papel central en la orquestación de los eventos humorales y celulares. Por eso, desde hace casi 20 años se han desarrollado medicamentos biotecnológicos conocidos como terapias anti-citocinas en el tratamiento selectivo de la inflamación, limitando de esa manera la actividad de citocinas específicas o sus receptores y, por lo

tanto, inhibiendo sus efectos –en la activación, proliferación, diferenciación y tráfico de linfocitos hacia los tejidos. Al bloquear la actividad de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF, IL-6, IL-12, IL-23 e IL-17, se reduce la inflamación y se suprimen las vías principales del proceso inflamatorio y afectando tanto la inmunidad innata como adaptativa (Dinarello, 2010; van de Veerdonk *et al.*, 2009). Asimismo también se han utilizado antagonistas de receptores de quimiocinas para tratar la enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune (Proudfoot *et al.*, 2010).

Las terapias anti-citocinas han tenido un gran impacto en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias -como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerosis múltiple, así como en los diferentes tipos de cáncer. Aunque se ha demostrado que las terapias anti-citocinas parecen no ocasionar un incremento en la susceptibilidad a infecciones, desde su inicio se tiene cierta reserva a su empleo en pacientes con infecciones latentes como TB, SIDA y hepatitis.

2.2.4. Otros posibles agentes antiinflamatorios

Las estatinas fueron desarrolladas en principio para reducir la síntesis endógena de colesterol en pacientes con alto riesgo de infarto al miocardio y donde se observan niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad, por lo cual representan los fármacos de primera elección en el tratamiento de dislipidemias (Almuti *et al.*, 2006). El mecanismo de acción es a través de la inhibición competitiva de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA). Sin embargo, las estatinas no solo inhiben la síntesis de colesterol, sino también la producción de mevalonato y con ello un número importante de intermediarios isoprenoides, necesarios para la producción de moléculas y complejos de señalización intracelular, que están involucradas en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, la modulación en la generación de especies reactivas de oxígeno, la proliferación celular, apoptosis y adhesión celular (Antonopoulus *et al.*, 2012; Tousoulis *et al.*, 2014). Asimismo, hay evidencias que sugieren que las estatinas disminuyen la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II pero no afectan al MHC de clase I. También las estatinas se unen a un único sitio alostérico en la integrina β 2 conocida como antígeno-1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), que participa en muchos procesos inflamatorios, sin embargo, el efecto antiinflamatorio ocasionado por la unión a LFA- es independiente de la inhibición de HMG-CoA reductasa. En estudios *in vitro*, las estatinas se ha evidenciado que reducen la producción de citocinas y la expresión

de moléculas de adhesión endotelial. Por otro lado, varios estudios muestran una reducción de la severidad de la enfermedad en animales tratados con estatinas y que padecen una variedad de afecciones inflamatorias que incluyen colitis, uveítis, encefalitis alérgica experimental miocarditis, sepsis letal, rechazo de aloinjerto y asma (Dinarelo, 2010; Abeles y Pillinger, 2006).

2.3. Hongos: fuente de compuestos antiinflamatorios

Los hongos son un grupo muy diverso de organismos tanto microscópicos como macroscópicos. A nivel mundial, se calculan alrededor de 700 especies de hongos con posibles propiedades medicinales (Chang & Wasser, 2012), de las cuales se han documentado diversas actividades con capacidad antioxidante, antihiperlipidémica, antibacteriana, antiviral, reguladora del sistema cardiovascular, antiinflamatoria, anticancerígena e inmunomoduladora (Suárez y Jeannette, 2013; Chang, 2008).

Por su parte, los macrohongos tienen gran valor nutricional ya que son ricos en carbohidratos, proteínas, aminoácidos y vitaminas; Sin embargo, también son ricos en muchos metabolitos bioactivos de alto valor medicinal (Elsayed, 2014), de los cuales se estima se han aislado y elucidado unas 140 mil estructuras en los últimos años (Zaidman *et al.*, 2005). Por otra parte, se estima que los productos medicinales de hongos que derivan del cuerpo fructífero representan el 80 y 85% del total, y son obtenidos de cultivos comerciales o recolectados de su hábitat natural. Sólo el 15% de los productos con propiedades medicinales se basan en extractos de micelio y un pequeño porcentaje se obtiene de filtrados de cultivo (Lindequist *et al.*, 2005).

Los efectos antiinflamatorios observados por extractos de los hongos se atribuye a una diversidad de compuestos químicos que han sido aislados y purificados de diferentes especies, por ejemplo *Ganoderma lucidum*, un hongo utilizado en la medicina China; *Phellinus linteus* que se utiliza en la medicina tradicional de las culturas de Asia Oriental, y las especies comestibles de *Pleurotus pulmonarius* y *Grifola frondosa* (Lindequist *et al.*, 2005). Además se ha reportado que los extractos acuosos, metanólico, etanólico y de acetato de etilo de diversos hongos muestran una disminución significativa en la actividad de mediadores inflamatorios como el óxido nítrico, las citocinas y prostaglandinas, inhibiendo algunas funciones de los macrófagos y reduciendo las células inflamatorias (Taofiq *et al.*, 2016).

2.3.1. Género *Pleurotus*

Los hongos de éste género se encuentran ampliamente distribuidos a nivel mundial e incluyen especies comestibles de gran valor económico en muchos países. Son organismos degradadores de madera que crecen en partes vivas o muertas en forma de repisa, y los cuerpos fructíferos son generalmente gregarios, aunque también solitarios. Pertenecen a la siguiente clasificación taxonómica:

Reino Fungi
División Basidiomycota
Subdivisión Agaricomycotina
Clase Agaricomycetes
Subclase Agaricomycetidae
Orden Agaricales
Familia Pleurotaceae
Género *Pleurotus*

Sus especies se caracterizan por la presencia de un píleo liso convexo, casi siempre en forma de ostra o concha y pueden presentar escamas hacia el centro o en la base; llegando a medir entre 5 y 12 cm de diámetro. El color es muy variable según la especie. Sus laminillas son decurrentes, unidas en la base, anchas, blancas y algunas veces amarillas. Presentan un estípite corto, excéntrico, engrosado gradualmente hacia el píleo, aunque en ocasiones no se presenta; puede medir alrededor de 2 cm de largo, de color blanquecino y de contexto blanco (Guzmán, 2000; Sánchez y Royse, 2001).

En México la diversidad de *Pleurotus* está representada por seis especies: *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. agaves*, *P. levis*, *P. smithii* y *P. djamor* (Huerta *et al.*, 2010). De acuerdo a la región y el tipo de árbol donde crecen, se les conoce popularmente como “orejas blancas”, “orejas de cazahuate”, “hongo de copal”, “hongo de maguey”, “hongo de zompantle”, “hongo de nopal”, por mencionar algunos (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006; Tello *et al.*, 2012).

2.3.1.1. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.

Se distribuye principalmente en regiones templadas a frías y subtropicales de todo el mundo. Los cuerpos fructíferos son carnosos, y aunque en ocasiones llega a confundirse con *Pleurotus djamor*, se pueden apreciar diferencias en la coloración del sombrero que va de blanco a café grisáceo y en las esporas en masa, que llegan a ser de color lila a gris (Figura 1).

Pleurotus ostreatus es una especie rica en polisacáridos de estructura molecular compleja, con unidades de (1,3)- β -D-glucanos, lineales y ramificados, reportados con actividad antitumoral (Ayala Sánchez *et al.*, 2016). De *P. ostreatus* se ha aislado el pleuran, un polímero con cadenas de enlaces glicosídicos β -1-3 y β -1-6, con actividad antiinflamatoria (Figura 2) (Nosál'ová *et al.*, 2001); mevinolin, un polisacárido con propiedad antihiperlipidémica, así como también la lovastatina que presenta el mismo efecto (Figura 2).



Figura 1. Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*.

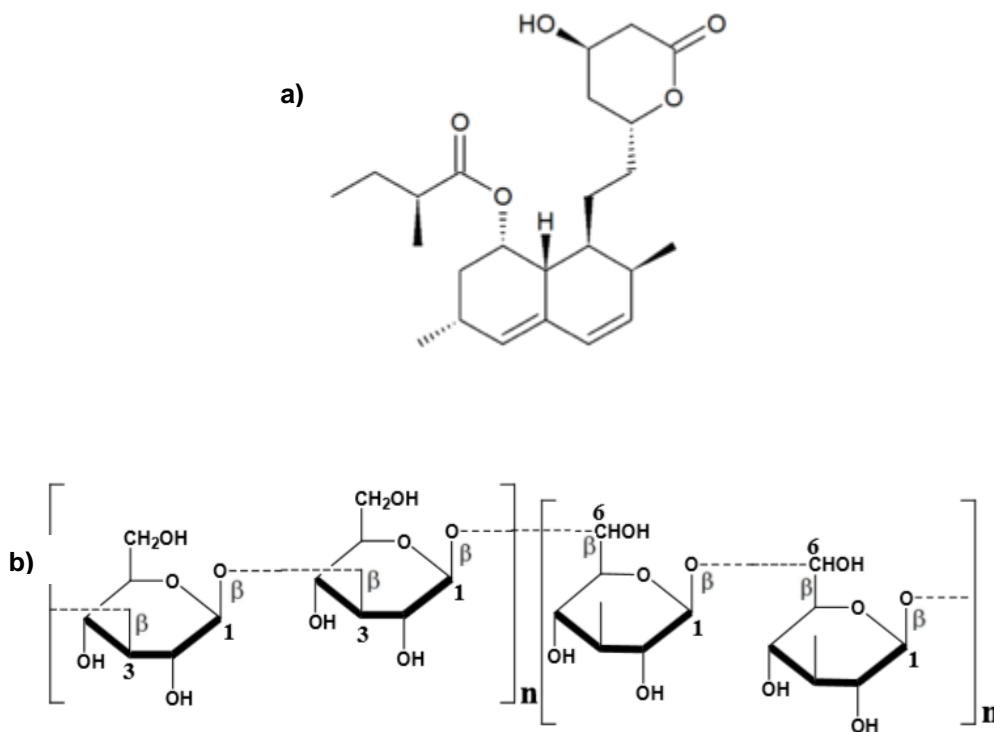


Figura 2. Compuestos aislados de *Pleurotus ostreatus* con actividad biológica. a) lovastatina aislada del cuerpo fructífero, y b) estructura monomérica del polímero pleuran.

2.3.1.2. *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn

Es un hongo con distribución pantropical que crece de manera natural sobre tocones de árboles en proceso de descomposición, para México comúnmente en árboles de *Ipomoea* spp. “cazahuate”. Crece generalmente en grandes conjuntos en forma de repisas, de fructificaciones carnosas y blanquecinas cuando jóvenes, y parduzcas al madurar. *Pleurotus djamor* puede crecer en zonas tropicales y templadas, y su plasticidad fenotípica puede verse reflejada en las diferencias en el color del sombrero y el estípite, habiendo cuerpos fructíferos desde blancos hasta rosa-anaranjado, características que varían dependiendo del sustrato donde crecen, altitud y clima (Menolli *et al.*, 2010; Tello *et al.*, 2012) (Figura 3).

De *Pleurotus djamor* se han aislado compuestos de tipo esteroides principalmente, que presentan actividad antioxidante: Colest-3- β -ol, ergostan-3- β -ol, estigmast-24(28)-en-3- β -ol, estigmast-28-en-3- β -ol, por mencionar algunos (Guzmán *et al.*, 2009). En la Figura 4 se puede observar uno de los compuestos aislados del cuerpo fructífero, el cual se ha reportado como novedoso de esta especie.



Figura 3. Cuerpo fructífero de *Pleurotus djamor*.

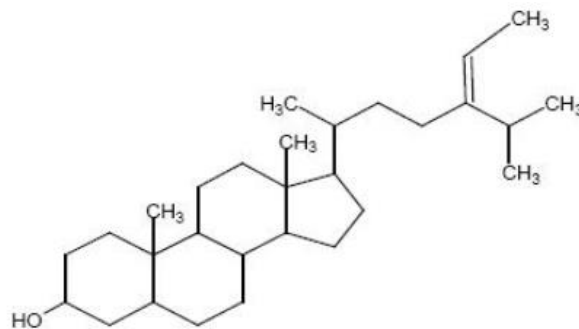


Figura 4. Estructura del compuesto esteroidal estigmast-24 (28)-en-3 β -ol, de *Pleurotus djamor*.

2.3.1.3. *Pleurotus agaves*

Es una especie endémica de México que se distribuye en todo el Altiplano Mexicano (Martínez-Carrera *et al.*, 2014), principalmente en regiones templadas a frías, creciendo en sustratos específicos de “*Agave spp.*”. En Morelos se encuentra creciendo por arriba de los 2800 msnm, sobre pencas de “maguey” *Agave spp.* (Figura 5). A diferencia de la mayoría de las especies de *Pleurotus*, *P. agaves* presenta un estípote largo de color café-vino, aterciopelado en la base con láminas delgadas, decurrentes muy juntas entre sí y un píleo liso con escamas ligeramente coloreadas,

de forma petaloide; los cuerpos fructíferos son blanquecinos a ligeramente amarillos y generalmente crecen de forma solitaria (Gómez-Velázquez, 2015).



Figura 5. a) Cuerpo fructífero de *Pleurotus agaves*, y b) creciendo sobre *Agave sp.*

2.3.2. Propiedades farmacológicas de *Pleurotus*

Las especies de *Pleurotus* no sólo son importantes nutricionalmente, también han sido objeto de investigación con fines medicinales desde hace varios años. Los hongos de este género son ricas fuentes de metabolitos bioactivos con capacidad de modular la respuesta inmune y presentan actividad hipoglucémica y antitrombótica (Chirinang e Intarapichet, 2009). Otros estudios han reportado que algunos metabolitos reducen la presión arterial, el colesterol sanguíneo, muestran acción antitumoral (Choi *et al.* 2004; Dalonso *et al.* 2009), actividad antioxidante (Poucheret *et al.* 2006, Ajith y Janardhanan 2007, Calabrese *et al.* 2009), antiinflamatoria (Jose *et al.* 2004) e inclusive, antimicrobiana y antiviral (Paul *et al.*, 2017).

Los estudios farmacológicos de este género de hongos se han realizado a partir del cuerpo fructífero, del micelio o del medio de cultivo agotado, ya sea en forma de extractos o de compuestos aislados como fenólicos, polipéptidos, terpenos y esteroides, polisacáridos, entre otros (Kim *et al.*, 2009). Entre estos metabolitos, los más estudiados son los polisacáridos, obtenidos de los cuerpos fructíferos y micelio de varias especies como *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* y *P. citrinopileatus*, por mencionar algunas (Dalonso *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2017).

Algunas especies de *Pleurotus* producen metabolitos que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, como la guanida (Badole *et al.*, 2007), una sustancia hipoglicémica que se usa en las medicinas orales antidiabéticas, y la lovastatina, cuyo derivado semisintético, la simvastatina, es el fármaco hipocolesterolémico más vendido (Demain y Sánchez, 2009). Las principales especies reportadas como fuentes de lovastatina incluyen a *P. ostreatus*, *P. saca*, *P. sapidus* y *P. pulmonarius* (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993). En este caso, la lovastatina se ha obtenido a partir de los cuerpos fructíferos o del cultivo *in vitro*, ya sea en el micelio o en el acúmulo en el caldo de cultivo (Gunde-Cimerman y Cimerman, 1995).

En la siguiente Tabla 1 se recopilan las especies de *Pleurotus* estudiadas farmacológicamente, describiendo los compuestos activos aislados o extractos, así como las propiedades que se les atribuyen.

Tabla 1. Compuestos bioactivos y de uso terapéutico de *Pleurotus* spp. (tomado de Paul *et al.*, 2017).

Especie	Compuesto activo	Propiedades	Referencia
<i>P. ostreatus</i>	Polisacárido-proteína		Facchini <i>et al.</i> , 2014
	Polisacárido (2.4x10 ⁴) Da		Sun <i>et al.</i> , 2009
	β-glucano con (1,3) y (1,6)	Actividad antialérgica y contra la infección de vías respiratorias	Sapena <i>et al.</i> , 2015 Jesenak <i>et al.</i> , 2013
	Extracto de proteína		Wu <i>et al.</i> , 2011
	Ribonucleasa	Antiviral	Nomura <i>et al.</i> , 2000
	Lectin dimérico	Antitumoral	Wang <i>et al.</i> , 2000
	Fracción proteoglicano (acuoso soluble)	Inmunomodulador y anticancerígena	Sarangi <i>et al.</i> , 2006
	Extracto crudo	Antibacteriana	Gerasimenya <i>et al.</i> , 2002
	Extracto hexano-dicloro-metano		Okamoto <i>et al.</i> , 2005
	Extracto de acetona	Anticancerígeno	Akanni <i>et al.</i> , 2010
Extracto metanólico	Antioxidante	Yang <i>et al.</i> , 2002	
Mevinolin	Actividad antihiperlipidémica	Hossain <i>et al.</i> , 2003	
<i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i>	Extracto metanólico	Inhibe mutagenicidad	Lakshmi <i>et al.</i> , 2004
<i>P. pulmonarius</i>	Extracto de polisacáridos		Lavi <i>et al.</i> , 2010
	Polisacáridos con enlaces α- y β-	Actividad antiinflamatoria	Jose <i>et al.</i> , 2002 Adebayo <i>et al.</i> , 2012
<i>P. citrinopileatus</i>	β- glucano	Inhibe la carcinogénesis asociada a colitis en ratones	Lavi <i>et al.</i> , 2010
	Proteína de extracto acuoso caliente	Antiviral, inhibe la actividad transcriptasa reversa 1 del VIH	Wang and Ng. 2007 Patel <i>et al.</i> , 2012
	Extracto de acetona	Actividad anticancerígena y antitumoral	Akanni <i>et al.</i> , 2010
	Proteína funcional (PCP-3A)	Inhibe la proliferación de células U937 de leucemia	Chen <i>et al.</i> , 2009
	Poliscáridos acuosos solubles	Actividad antihiperglicémica y disminuye el nivel de glucosa en sangre en ratas diabéticas	Wang <i>et al.</i> , 2005 Hu <i>et al.</i> , 2006
	Lectina	Actividad antitumoral	Li <i>et al.</i> , 2008

Tabla 1. Compuestos bioactivos y de uso terapéutico de *Pleurotus* spp. (continuación)

Especie	Compuesto activo	Propiedades	Referencia
<i>P. florida</i>	Glucanos	Estimula la fagocitosis de macrófagos <i>in vitro</i>	Rout <i>et al.</i> , 2005
	Fracción proteica	Actividad antiproliferativa.	Maiti <i>et al.</i> , 2008
	Lectina		Rana <i>et al.</i> , 2012
	Extracto metanólico	Actividad antiplaquetaria y antiinflamatoria	Jose <i>et al.</i> , 2004
<i>P. sajor-caju</i>	Polisacáridos-proteína	Antitumoral	Facchini <i>et al.</i> , 2014
	Ribonucleasa	Antimicrobiana	Negi and Ng. 2004
	Extracto acuoso caliente	Antiviral	Patel <i>et al.</i> , 2012
<i>P. eryngii</i>	Ubiquinona-9		Bae <i>et al.</i> , 2009
	Pleurona		Lee <i>et al.</i> , 2011
	Eringina	Actividad antibacteriana	Wang <i>et al.</i> , 2004
	Extracto etanólico	Actividad antiinflamatoria y antialérgica	Sano <i>et al.</i> , 2002
<i>P. tuber-regium</i>	Polisacáridos acuosos solubles	Actividad antioxidante	Chen <i>et al.</i> , 2012
	B- glucanos sulfatados	Antiviral	Zhang <i>et al.</i> , 2003, 2004
	Polisacárido	Antitumoral	Zhang <i>et al.</i> , 2001 Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>P. cornucopiae</i>	Lacasa (mol wt. 66 kDa)	Antitumoral y antiviral	Wong <i>et al.</i> , 2010
	Extracto de acetona	Inhibe crecimiento e induce apoptosis de células HL60	Takei <i>et al.</i> , 2005
<i>P. ferulae</i>	Extracto etanólico	Reduce colesterol total en plasma, LDL, triglicéridos, etc.	Alam <i>et al.</i> , 2011
<i>P. geesteranus</i>	Polisacárido de extracto acuoso caliente	Actividad anticancerígena	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>P. nebrodensis</i>	Hemolisina	Actividad anticancerígena y antiviral	Lv <i>et al.</i> , 2009
	Extracto acuoso y finas partículas secas	Actividad antihipertensiva	Miyazawa <i>et al.</i> , 2003

Tabla 1. Compuestos bioactivos y de uso terapéutico de *Pleurotus* spp. (continuación)

Especie	Compuesto activo	Propiedades	Referencia
<i>P. cystidiosus</i>	Extracto metanólico	Antioxidante	Yang <i>et al.</i> , 2002
	Fracción proteica	Disminuye la presión sanguínea	Ching <i>et al.</i> , 2011
<i>P. salmoneostramineus</i>		Reduce fosfolípidos totales, lípidos y LDL/HDL	Yoon <i>et al.</i> , 2012
<i>P. eous</i>	Extracto metanólico	Actividad antioxidante	Ramkumar <i>et al.</i> , 2010
<i>P. abalonus</i>	Lectina	Antitumoral	Mahajan <i>et al.</i> , 2002
	Polisacárido-péptido		Li <i>et al.</i> , 2007
<i>P. djamor</i>	Polisacáridos precipitados	Antitumoral	Borges <i>et al.</i> , 2013
<i>P. floridaus</i>	Extracto acuoso y etanólico 70%	Antibacteriana	Das <i>et al.</i> , 2012

2.3.2.1. Actividad antiinflamatoria de *Pleurotus*

Estudios han evidenciado que el empleo de extractos o moléculas aisladas de algunas especies de *Pleurotus* redujeron la inflamación aguda y crónica en modelos *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, se reportó que los extractos metanólicos del cuerpo fructífero de *Pleurotus pulmonarius* y *P. florida* ocasionaron la disminución del edema inducido en ratones (Smiderle *et al.*, 2008; Jose *et al.*, 2004). Por otro lado, se reportó que una glicoproteína aislada del cuerpo fructífero de *P. citrinopileatus*, inhibió los mediadores pro-inflamatorios tales como iNOS y NF- κ B en las células RAW 264.7 (Chen *et al.*, 2011). En congruencia con esto, el extracto del cuerpo fructífero de *P. eryngii* y el pleuran, un polisacárido aislado de *P. ostreatus*, también se encontró que poseen actividad antiinflamatoria (Sano *et al.*, 2002; Nosál'ová *et al.*, 2001).

2.4. Producción de *Pleurotus*

El cultivo de *Pleurotus* se ha desarrollado con la finalidad de cubrir las demandas alimentarias de la población al estar disponible en cualquier época del año; de lo contrario la obtención de cuerpos fructíferos de manera silvestre no alcanzaría para satisfacer dichas necesidades debido a que su presencia sólo es en época de lluvias. Se estima que la producción nacional en el año 2014, fue alrededor de 63,374 toneladas de hongos frescos (Martínez-Carrera y Ramírez Juárez, 2016). En este

contexto, el cultivo en estado sólido ha sido el método más utilizado para la producción de cuerpos fructíferos. Por otro lado, gracias a las propiedades nutritivas y medicinales que parece poseer este hongo, su estudio se ha diversificado impulsando a la investigación en incrementar la productividad a través de otros métodos de crecimiento como el cultivo sumergido para la producción de biomasa micelial y metabolitos bioactivos (Gregori *et al.*, 2007).

2.4.1. Cultivo en estado sólido o FES (fermentación en estado sólido)

La fermentación en estado sólido se define como cualquier proceso de fermentación desarrollado en materiales no solubles y empleando un soporte sólido que puede ser en este caso un sustrato inerte natural o sintético (Figura 6). El uso de los recursos naturales como materiales lignocelulósicos, especialmente de la industria alimentaria, como sustratos de crecimiento para el cultivo de hongos es el enfoque más prometedor, ya que tales residuos son ricos en azúcares y otros compuestos útiles, que son fácilmente metabolizados por hongos. Sin embargo, el uso de sustratos lignocelulósicos podría hacer que el proceso de purificación de productos sea más difícil. Por esta razón, esta técnica de cultivo sería más apropiada para la colonización de sustrato de crecimiento de micelio del hongo (Gregori *et al.*, 2007).

Para el caso de *Pleurotus*, su cultivo en estado sólido se ha incrementado debido a la facilidad que presenta, su alto potencial de rendimiento y alto valor nutricional. En el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), el cultivo de *Pleurotus* ha sido un proceso continuo en el que han participado estudiantes y población en general a través del trabajo científico desarrollado y la capacitación del cultivo de *Pleurotus* spp. mediante cursos y talleres. Poco después de la creación del cepario de hongos del CIB-UAEM en el año 1986, el grupo del Laboratorio de Micología ha trabajado constantemente con diversas cepas extranjeras y silvestres de diferentes regiones del estado de Morelos, empleando diferentes sustratos para el crecimiento en cultivo sólido y en medio líquido. Entre las especies que han sido cultivadas corresponden a *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor*, *Pleurotus* sp. y, recientemente *P. agaves*.



Figura 6. Cultivo sólido de *Pleurotus ostreatus*.

2.4.2. Cultivo sumergido o FEL (fermentación en estado líquido)

Esta técnica es la más utilizada en la industria debido a que es sencilla, pueden controlarse muchas más variables que la FES y el producto final es mucho más fácil de recuperar. La fermentación en cultivo sumergido requiere de una solución nutritiva en la que los organismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo (Figura 7) y en el caso de los hongos, éstos forman pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación, de lo contrario sólo crecen en la superficie (Suárez y Jeannette, 2013). En este tipo de cultivo el desarrollo del organismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y la última, de muerte. Además la FEL puede darse de manera continua, por lote, cuando el suministro de los nutrientes se realiza en una sola ocasión; o alimentada (método discontinuo), de acuerdo a la entrada y salida tanto del sustrato como del producto.

La fermentación por cultivo sumergido se ha desarrollado para la propagación de micelio de una variedad de hongos entre ellos los del género *Pleurotus*, con diferentes aplicaciones tales como producción de inóculo líquido para la producción de cuerpos fructíferos, y para la obtención de biomasa para alimento, suplementos dietarios y de aplicación farmacéutica (Suárez y Jeannette, 2013).



Figura 7. Cultivo sumergido de *Pleurotus ostreatus* utilizando un bioreactor “air-lift”.

A pesar de que el cultivo de *Pleurotus* en FES es un procedimiento simple que no involucra equipo sofisticado, el cultivo a gran escala resulta más laborioso debido al trabajo continuo y los largos periodos de incubación; su producción depende en parte de las condiciones ambientales, lo que implica variación de la producción en cada lote (Gregori *et al.*, 2007). Por otro lado, la FES no permite obtener los bioactivos en breves periodos de tiempo a diferencia de la FEL, el cual ofrece la posibilidad de obtener una alta producción de biomasa en un espacio compacto, menor tiempo (días) y con pocos problemas de contaminación (Chegwin *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el cultivo sumergido fue la opción ideal para lograr la propagación del micelio de *Pleurotus* por la facilidad en el manejo de sus variables, para obtener un producto homogéneo y un aumento en la producción de sus metabolitos. Cabe mencionar que dichos compuestos se encuentran tanto en el micelio como en el medio agotado (Paul *et al.*, 2017), lo que proporciona un mayor valor al empleo de la fermentación en estado líquido, para la producción de macrohongos de *Pleurotus*.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, como en muchos otros países, se contabilizan serios problemas de salud que se asocian cada vez más con un grado de inflamación crónica como el cáncer, síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares, por mencionar algunas. Ante esta problemática, se han desarrollado diversos agentes farmacológicos para inhibir o controlar la inflamación. No obstante, el consumo de los agentes antiinflamatorios ha presentado efectos indeseables diversos, que van desde efectos menores hasta severos al organismo, a tal grado que algunos han sido retirados del mercado. Por otro lado, los medicamentos biológicos quizás son más eficientes para el manejo de inflamación pero significan precios muy elevados para que pueda ser una opción para la población general, sobre todo en países en vías de desarrollo como el nuestro. Por lo tanto, continúa siendo un desafío el desarrollar agentes más efectivos, con menos efectos adversos y de precios accesibles para tratar los signos y síntomas de la inflamación.

Por otra parte, los hongos constituyen un recurso natural utilizado durante años en la medicina tradicional. En particular, los hongos comestibles de *Pleurotus*, han mostrado ser una fuente de compuestos de amplia actividad biológica. A pesar de los esfuerzos, son pocos los estudios que se han realizado para evaluar sus propiedades antiinflamatorias y, para el caso de especies mexicanas, su potencial farmacológico no ha sido reportado.

En este sentido, en el presente proyecto se pretende estudiar tres cepas de *Pleurotus*, de las cuales *P. djamor* y *P. agaves* son especies mexicanas, y *P. ostreatus* una especie de la cual se ha reportado que produce metabolitos con propiedades farmacológicas. El estudio iniciará desde el establecimiento de las condiciones de crecimiento biotecnológico, para la producción de metabolitos biológicamente activos y, continuará con la preparación de extractos, y por último, la evaluación en modelos *in vitro*, para evidenciar su potencial actividad antiinflamatoria. Para ello, se pretende evaluar el efecto de los metabolitos en un modelo *in vitro* utilizando macrófagos murino estimulados con lipopolisacáridos. Debido a que los macrófagos producen una amplia gama de moléculas biológicamente activas involucradas en el proceso inflamatorio, representan un blanco terapéutico en el tratamiento de procesos inflamatorios.

4. HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos a partir de cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* y *Pleurotus agaves* (biomasa y medio agotado) serán capaces de inhibir la activación pro-inflamatoria de macrófagos tratados con LPS.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

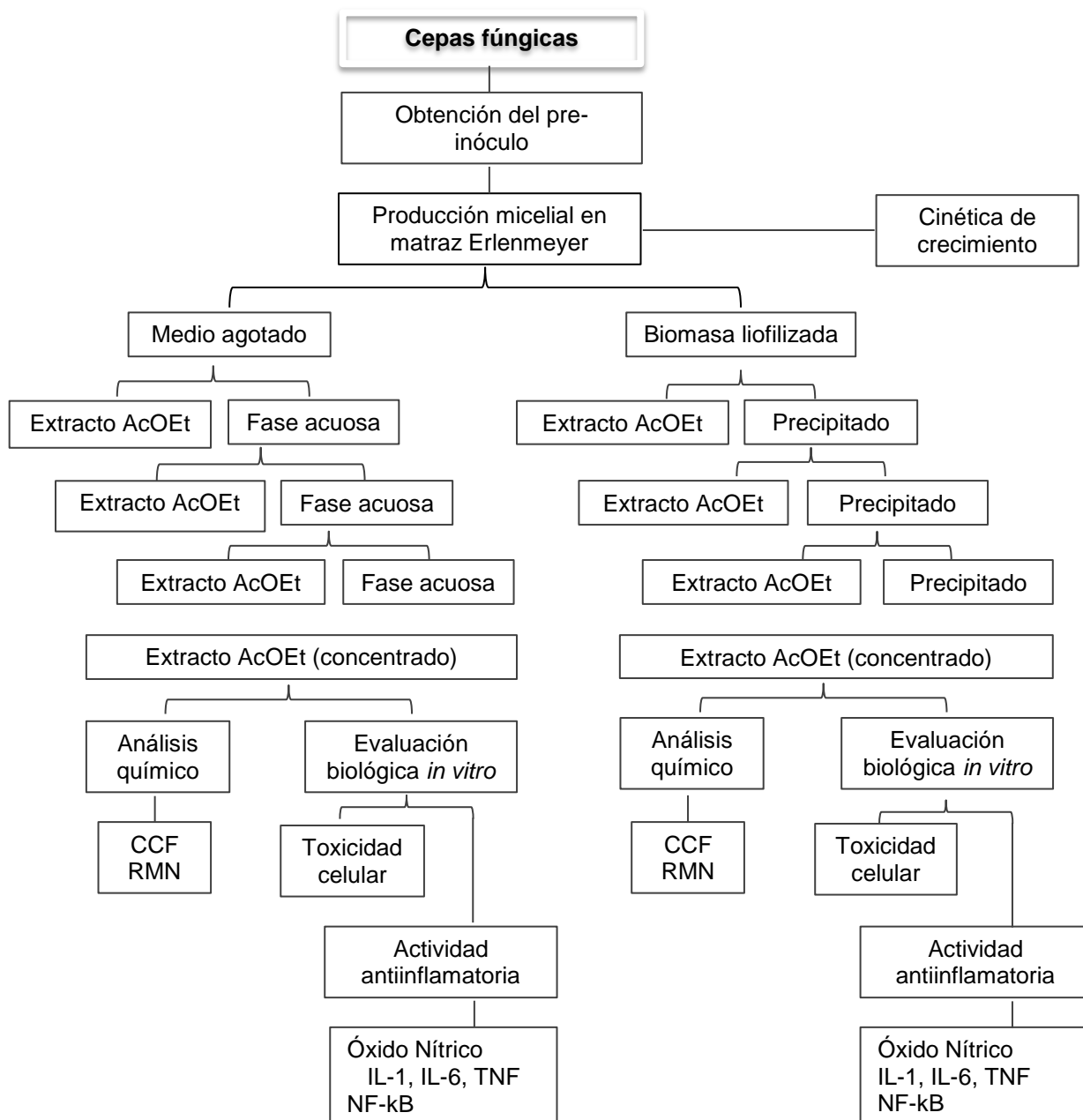
Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos obtenidos del cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* y *Pleurotus agaves*, en macrófagos activados por LPS.

5.2. Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones de cultivo para la obtención de biomasa y productos del agotamiento del medio de cultivo de *Pleurotus* spp.
- Determinar si los extractos obtenidos presentan efecto citotóxico y establecer los valores de concentración que no induzcan muerte celular.
- Evaluar el efecto de los extractos sobre la producción de óxido nítrico (NO), de las citocinas TNF, IL-6 e IL-1 β y la activación del factor NF-kB en macrófagos RAW estimulados con LPS.
- Identificar los principales componentes presentes en los extractos del medio de cultivo de *Pleurotus* spp.) por medio de Resonancia Magnética Nuclear.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental



6.2. Material fúngico

Los recursos genéticos fúngicos se encuentran almacenados en el cepario COBIOCH-UAEMor del Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), con clave CP-50: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm; COBIOCHUAEMor P-50: *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, y COBIOCHUAEMor P-52: *Pleurotus agaves* (Figura 8). La preservación de las cepas y la etapa del cultivo sumergido se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Micología-CIB bajo la dirección del Dr. Isaac Tello Salgado.

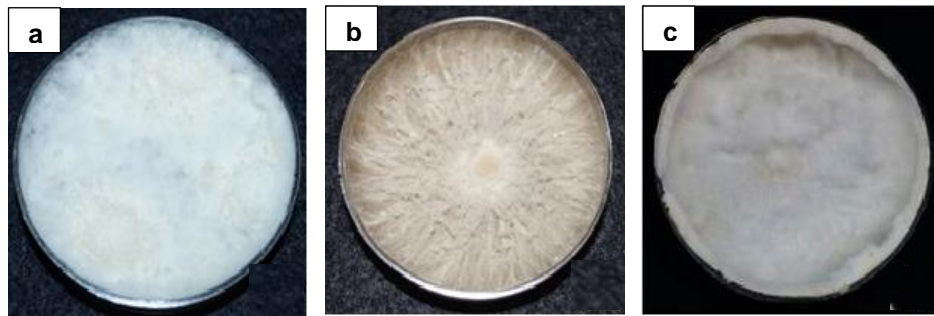


Figura 8. Germoplasma de a) *Pleurotus ostreatus* (CP-50), b) *P. djamor* (P-50) y c) *P. agaves* (P-52).

6.3. Activación de las cepas

Las cepas fueron crecidas en medio de cultivo sólido, preparado de la siguiente manera: para 500 mL de medio se adicionaron a un matraz 15 g de extracto de malta, 10 g de cereal molido, 8 g de agar y se aforó a 500 mL con agua destilada. La solución para cultivo fue esterilizada en autoclave por 20 minutos a temperatura de 121°C y 15 libras de presión, se dejó enfriar y se vació en cajas de Petri. Transcurridas 24 horas, las cajas fueron sembradas con fragmentos de micelio del hongo, mantenidas a temperatura ambiente y mediante resiembras continuas.

6.4. Crecimiento en cultivo líquido

6.4.1. Medio de cultivo complejo

El medio de cultivo líquido, buffer de fosfatos líquido más cereal (BFL+C) se preparó de la siguiente manera: 8.28 g de fosfato de sodio monobásico 60 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 4.25 g de fosfato de sodio dibásico 60 mM (Na_2HPO_4) fueron disueltos en 1000 mL y 500 mL de agua destilada, respectivamente. La solución de fosfato de sodio monobásico fue ajustada a un pH final de 6.0, agregando poco a poco la solución de fosfato de sodio dibásico. Finalmente, por cada litro de BFL preparado con pH 6.0, se adicionaron 10 g de cereal molido y la solución se esterilizó a temperatura de 121°C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.

6.4.2. Medio de cultivo simplificado

A partir del medio de cultivo complejo se obtuvo un medio simplificado, como lo reporta Núñez Urquiza (2017) en su tesis de Maestría. El medio complejo se dejó enfriar unas horas y se filtró para eliminar las partículas no disueltas. Se llenaron matraces Erlenmeyer con el medio simplificado y se esterilizaron nuevamente bajo las mismas condiciones, para ser inoculados posteriormente con el hongo.

6.4.3. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo del hongo, fragmentos de 0.5 cm de diámetro de micelio y agar fueron transferidos a matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 50 mL del medio de cultivo simplificado BFL+C, y puestos en agitación a 210 rpm a temperatura ambiente durante 5-7 días.

Los cultivos para la producción de biomasa se realizaron en matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 600 mL del medio de cultivo simplificado BFL+C y 5% del inóculo. Los matraces fueron puestos en agitación a 210 rpm a temperatura ambiente durante un periodo aproximado de 10 días.

6.5. Cinética de crecimiento en medio líquido

Se determinó la cinética de crecimiento de cada una de las especies estudiadas durante un periodo de 10 días, y en ensayos por triplicado. Las cinéticas se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo BFL+C, en agitación constante de 210 rpm y a temperatura ambiente. Los matraces fueron seleccionados al azar cada tercer día, hasta completar 10 días de crecimiento.

Los rendimientos de la biomasa fueron determinados por diferencia de peso. En este caso, los cultivos fueron procesados de la siguiente manera: el producto micelial se colocó en tubos Falcon de 50 mL y se sometieron a centrifugación en una centrifuga GS-6R Centrifuge (Beckman) durante 10 minutos a 2800 rpm. Se colocó papel filtro Whatman sobre un embudo Buchner previamente acondicionado a un matraz Kitasato, y el medio de cultivo líquido se filtró en una bomba al vacío. El medio líquido se depositó en un matraz y la biomasa recuperada en el filtro se llevó a una estufa para eliminar el exceso de humedad, a una temperatura de 40°C, durante 24 horas. El peso seco de la biomasa se determinó con la siguiente fórmula, y los resultados fueron expresados en g/L.

$$\text{Biomasa seca (g)} = (\text{Biomasa húmeda} - \text{Biomasa seca}) - \text{Peso del papel filtro}$$

6.5.1. Velocidad de crecimiento en medio líquido

El crecimiento de los hongos filamentosos en medio sólido no presenta una fase exponencial, sino más bien presenta una fase de crecimiento lineal. Para el caso específico de cultivo líquido agitado, los hongos tienden a formar agregaciones hifales denominadas "pellets". En este caso se considera que los pellets del hongo, de espesor fijo y densidad, crece en tres dimensiones a una tasa de extensión lineal y de manera constante, y el incremento se da como una fracción de la población celular en el medio.

$$\frac{\ln X_f}{X_0} = \mu (t_f - t_0)$$

Por lo tanto, para calcular la velocidad de crecimiento de los hongos en cultivo líquido agitado se tiene la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln X_f}{t_f - t_0}$$

$$\frac{X_0}{(t_f - t_0)}$$

Donde se indica que, la velocidad específica de crecimiento (μ) está en función de la biomasa al final del cultivo (X_f) entre la biomasa inicial (X_0), entre la diferencia del tiempo final (t_f) y el tiempo inicial (t_0) de la cinética. De tal manera que μ , X_0 y X_f está expresado en g/L; y t_f y t_0 es el tiempo expresado en días (Sánchez y Royse, 2001).

6.6. Extracción de metabolitos secundarios

Para la obtención de los metabolitos bioactivos, se realizó un escalamiento a matraces de mayor volumen para incrementar la producción del cultivo fúngico. El crecimiento de los hongos se realizó en matraces Erlenmeyer de 1L con 600 mL del medio de cultivo simplificado BFL+C y 5% del inóculo, empleando las mismas condiciones de crecimiento. Los productos del cultivo fueron procesados como se describe arriba (apartado 6.5). Después de filtrar el producto fúngico, la biomasa depositada en el papel filtro se sometió a liofilización y el medio agotado se reservó hasta su posterior uso. En el siguiente diagrama se muestra el protocolo para la extracción de los metabolitos secundarios extracelulares (medio agotado) e intracelulares (biomasa).

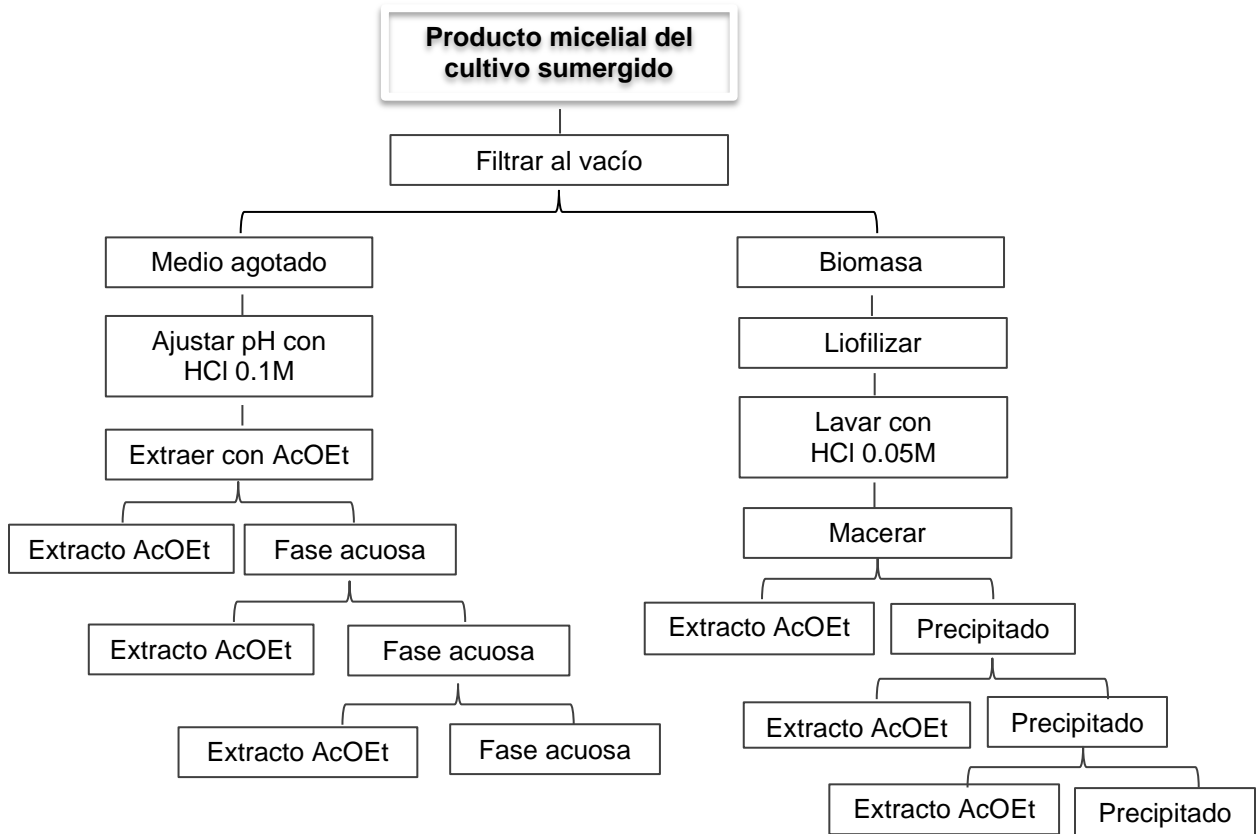


Figura 9. Protocolo de extracción de los metabolitos secundarios (Alarcón y Águila, 2006).

6.7. Evaluación biológica *in vitro*

6.7.1. Condiciones de crecimiento de las células

Las células de la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) se mantuvieron en medio de cultivo Advanced DMEM F-12 (GIBCO) suplementado con 3.5% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (1%, solución stock) y 1% de antibiótico MycoZap™ (LONZA). Las células de la línea RAW-Blue™ se mantuvieron en medio de cultivo Advanced DMEM F-12 (GIBCO) suplementado con 3% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (1% solución stock), 1% de antibiótico MycoZap y Zeocina (InvivoGen) (200 µg/mL, solución stock). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, en frascos de cultivo celular de 25 cm². El subcultivo se realizó cada tercer día y las células adheridas se desprendieron con 1 mL de Tripsina (TrypLE™ Express, GIBCO) y ligeros golpes al frasco, cuidando de no sobrepasar el 75% de confluencia.

6.7.2. Preparación de las muestras de prueba

Se preparó una solución stock utilizando dimetilsulfóxido (DMSO 99.99%; Sigma, Aldrich) como vehículo para disolver los extractos de acetato de etilo. A partir de esta solución se prepararon las concentraciones de 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL de los extractos, en medio de cultivo celular. La concentración del vehículo no excedió el 0.5% (v/v) de DMSO en los extractos.

6.7.3. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad se realizó por medio del ensayo con MTT (M2128-1G, Sigma-Aldrich). Los macrófagos RAW 264.7, en fase logarítmica de crecimiento, se sometieron a las diferentes concentraciones de los extractos. En una placa de 96 pozos se colocaron 100 µL de suspensión celular (100,000 cel/mL) en cada pozo, 24 horas después se agregaron los extractos a las diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL), el vehículo (DMSO 0.5%, v/v) o el control positivo (etopósido) (E1383-100MG, Sigma-Aldrich) a 20 y 40 µg/mL, en ensayos por triplicado. Las células se incubaron durante 24 horas en las condiciones arriba descritas y, posteriormente, se agregaron 10 µL de reactivo MTT (5 mg/mL solución stock). Transcurridas 4 horas para la formación de cristales de formazán, el medio de cultivo fue retirado y se agregaron 100 µL de DMSO en cada pozo. La placa se dejó incubar durante 20 min para solubilizar los cristales formados y la densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas de ELISA a 490 nm El porcentaje de crecimiento celular se calculó respecto a la DO₄₉₀ del control basal (células con medio de cultivo).

$$\% \textit{crecimiento celular} = \frac{DO_{490} \text{ células con tratamiento}}{DO_{490} \text{ células con medio de cultivo}} \times 100$$

6.7.4. Efecto de los extractos en el modelo de inflamación *in vitro*

6.7.4.1. Expresión de mediadores pro-inflamatorios en macrófagos RAW 264.7

En una placa de 96 pozos se colocaron 200 μL de suspensión celular (150,000 cel/mL) en cada pozo. A las 24 horas, las células fueron incubadas con medio, el vehículo (DMSO 0.5%, v/v) los controles positivos (Indometacina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Lovastatina 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o los extractos fúngicos a diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en ensayos por triplicado. Después de 2 horas, se agregaron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (*Escherichia coli* 0111: B4, Sigma-Aldrich) a las células y se incubaron durante 2 horas. Los sobrenadantes se colectaron para cuantificar la producción de óxido nítrico mediante la reacción de Griess y una fracción del sobrenadante se almacenó a -20°C para cuantificación de citocinas mediante la técnica de ELISA.

6.7.4.1.1. Determinación en la producción de óxido nítrico

La determinación de óxido nítrico (NO) se realizó de manera indirecta, midiendo la concentración de nitrito, un producto final estable de NO. De los sobrenadantes colectados, se usaron 50 μL para medir la concentración de nitrito de sodio mediante la reacción de Griess (sulfanilamida al 1%, naftiléndiamina al 0.1% en 2.5% de ácido fosfórico). En una placa de 96 pozos se colocaron 50 μL de los sobrenadantes y se les agregaron 0.1 mL de los reactivos, determinados en una mezcla 1:1 de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) con naftiléndiamina (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y la densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas de ELISA a 540 nm EPOCH (Biotek). Para la curva estándar de nitritos se emplearon varias concentraciones de NaNO_2 .

6.7.4.1.2. Determinación en la producción de citocinas

Para determinar la concentración de citocinas en los sobrenadantes celulares se utilizaron los ELISA tipo sándwich específicos para TNF, IL-1 β e IL-6 de ratón (PREPROTECH), siguiendo las instrucciones del proveedor. De manera resumida la técnica se realizó como se describe a continuación:

Los pozos de una placa de 96 fueron recubiertos con el primer anticuerpo (anti-citocina) e incubados durante toda la noche. El sobrenadante fue retirado, se

bloquearon con BSA al 1% en PBS, y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se lavaron con solución de lavado (Tween-20 al 0.05% en PBS). Posteriormente se agregaron las muestras correspondientes a la curva estándar o las muestras a evaluar, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiró nuevamente el sobrenadante, se lavó cuatro veces y en seguida se agregaron los anticuerpos de detección acoplados a biotina específicos para TNF, IL-1 β o IL-6. Las placas se incubaron a temperatura ambiente, se lavaron y se agregó la estreptavidina-peroxidasa. Para medir la actividad de peroxidasa se adicionó la solución de sustrato ABTS, se incubó a temperatura ambiente para el cambio de coloración. La densidad óptica se midió en un lector de placas EPOCH (Bioitek) a 405 y 650 nm, y la concentración de citocinas se determinó con base en la curva estándar.

6.7.4.2. Línea celular RAW-Blue™

En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ L de suspensión celular (150,000 cel/mL) en cada pozo. A las 24 horas, las células fueron incubadas con medio, el vehículo (DMSO 0.5%, v/v), los controles positivos (Indometacina 30 μ g/mL y Lovastatina 5, 10, 50 y 100 μ g/mL), o los extractos a diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 μ g/mL), en ensayos por triplicado. Después de 2 horas se agregó LPS (10 μ g/mL) a las células y se incubaron durante 24 horas. Los sobrenadantes se colectaron para determinar activación de NF-kB mediante el ensayo colorimétrico con QUANTI-Blue™.

6.7.4.2.1. Determinación de activación de NF-kB

Para determinar la activación de NF-kB se utilizó el ensayo enzimático colorimétrico con QUANTI-Blue™ (InvivoGen), que determina cualquier actividad fosfatasa alcalina (AP), inducida después de la activación de NF-kB, por algún agonista. En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ L de reactivo QUANTI-Blue™ en cada pozo, previamente aatemperado a 37 °C. A continuación, se agregaron 20 μ L de los sobrenadantes y las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37° C. La densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas a 630 nm. El % de activación se determinó respecto a la DO₆₃₀ del control 100% de activación NF-kB (LPS).

6.8. Análisis químico

6.8.1. Cromatografía en capa fina

El método de CCF se utilizó como método de análisis cualitativo para conocer el perfil químico de los extractos. Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron en placas de aluminio con gel de sílice, utilizando diferentes disolventes orgánicos como sistemas de elución.

Se utilizó como agente cromogénico sulfato sérico y 4-hidroxibenzaldehído, y para lograr el desarrollo de color fue necesario calentar la placa durante aproximadamente 1 minuto. En todos los casos antes de revelar con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas mediante luz UV de λ corta (254 nm) y de λ larga (360 nm).

6.8.2. Resonancia Magnética Nuclear ^1H

Estos estudios fueron realizados por el Dr. Ismael León Rivera, en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la UAEM. Los espectros de los extractos se obtuvieron en un espectrómetro de 200 MHz. Las muestras fueron disueltas en metanol deuterado (CD_3OD) y cloroformo deuterado (CDCl_3), y se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

6.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron obtenidos al menos por tres experimentos independientes y son presentados como la media \pm desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos fueron realizados por análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba de Dunnett en el programa GraphPad Prism versión 6.0. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Cinética de crecimiento en medio líquido

En el crecimiento de las tres especies estudiadas no se observó una etapa de adaptación al sustrato, exhibiendo un crecimiento exponencial desde el primer día y, alcanzando la mayor acumulación de biomasa entre el cuarto y octavo día. Al analizar la cinética de las especies mediante un ANOVA de dos vías, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) a partir del cuarto día de crecimiento, en la producción de biomasa, mostrando mayor producción *Pleurotus ostreatus* y *P. djamor*, cepas CP-50 y P-50 respectivamente, en comparación con *P. agaves* cepa P-52. Sin embargo, al comparar la velocidad de crecimiento (μ) de la cepa P-52, de 0.135 ± 0.017 horas⁻¹ y el tiempo de duplicación (t_d) de 5.20 horas⁻¹, no hubo diferencias significativas con las otras especies. En este caso, en la cepa CP-50 se registró una μ de 0.111 ± 0.010 horas⁻¹ y un t_d de 6.26 horas⁻¹; y para la cepa P-50 se obtuvo una μ de 0.104 ± 0.037 horas⁻¹, y una t_d de 7.17 horas⁻¹. Esta cepa alcanzó la máxima producción de biomasa al cuarto día con 4.27 ± 0.56 g/L pero, a pesar de que registró la menor producción de las tres especies, no hubo diferencias significativas en comparación con *P. ostreatus* y *P. agaves*, cepas CP-50 y P-52, de las cuales se obtuvo una producción de 5.40 ± 0.15 g/L y 4.94 ± 0.49 g/L de biomasa, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de biomasa y velocidad de crecimiento de *Pleurotus* spp. en medio de cultivo líquido.

Cepa	Medio de cultivo	Producción de biomasa peso seco (X) g/L	Velocidad específica de crecimiento (μ) horas ⁻¹
CP-50	BFL + C	5.40 ± 0.15^a	0.111 ± 0.010^a
P-50	BFL + C	$4.27 \pm 0.56^{a,b}$	0.104 ± 0.037^a
P-52	BFL + C	4.94 ± 0.49^b	0.135 ± 0.017^a

Medias con diferente letra son estadísticamente significativas para los tratamientos.
BFL+C= Buffer de fosfatos líquido más cereal.

Para la especie *Pleurotus ostreatus*, la fase exponencial se mantuvo hasta el sexto día de crecimiento y para *P. agaves* hasta el octavo día. Posterior a ésta etapa se observó una ligera fase estacionaria en ambas especies, donde no hubo diferencias significativas en la producción de biomasa al octavo y décimo día de crecimiento. De manera contraria, en *P. djamor* se observó una fase de muerte después del día cuatro, presentando diferencias significativas en la producción de biomasa a partir del día ocho, en comparación con las otras especies. (Figura 10).

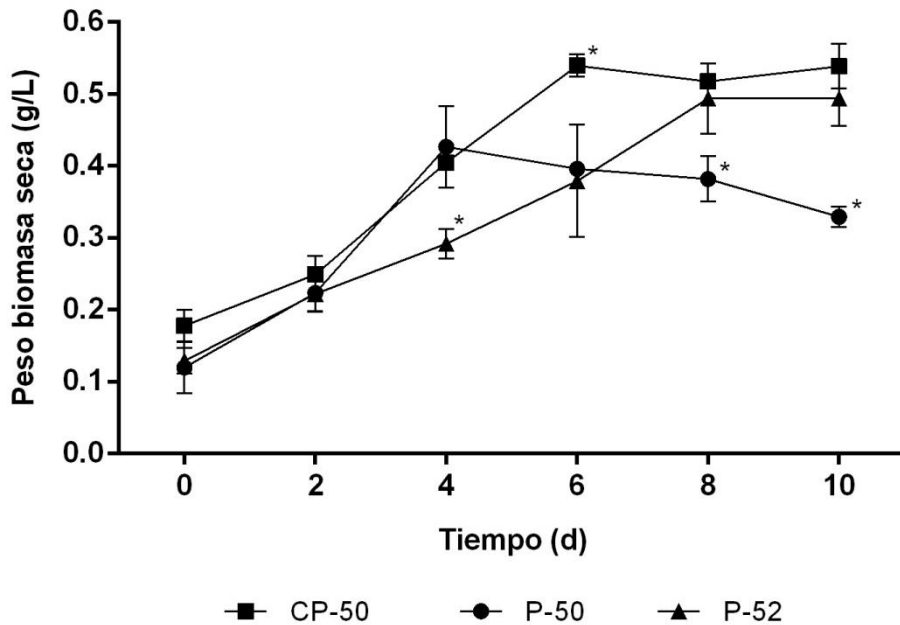


Figura 10. Cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido (BFL+C), de las especies de *Pleurotus*. Cada punto representa la media \pm DE, n=3. * $P < 0.05$.

El crecimiento en medio líquido para cada cepa presentó características particulares en cuanto a la coloración del medio de cultivo y tamaño del pellet. *Pleurotus agaves* cepa P-52, se observaron pellets con diámetros de aproximadamente 1 cm, que fue mayor respecto a *P. ostreatus* y *P. djamor* cepa CP-50 y P-50, donde se observaron pellets de menor diámetro, presentando la cepa P-50 los pellets más pequeños, con diámetros alrededor de los 0.5 cm. También se observó cambios en la coloración del medio de cultivo, observando diferentes tonalidades de color amarillo en las tres cepas. Un color amarillo claro se observó en el sobrenadante de la cepa P-50; *P. djamor*; mientras que tonos más oscuros se observaron en los sobrenadantes de las cepas CP-50 y P-52 de *P. ostreatus* y *P. agaves* (Figura 11).

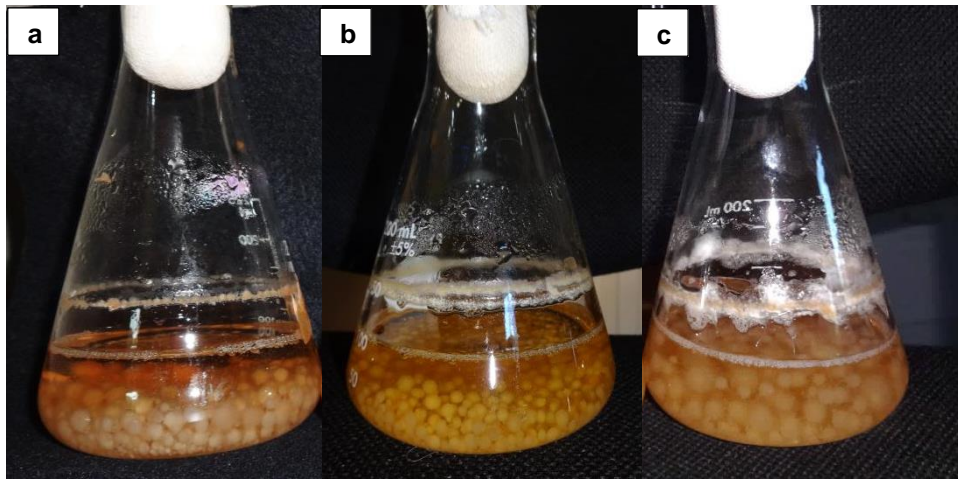


Figura 11. Productos del cultivo sumergido de a) *Pleurotus ostreatus* (CP-50), b) *P. djamor* (P-50) y c) *P. agaves* (P-52).

7.2. Extracción de metabolitos secundarios

Para la extracción de los metabolitos secundarios, el producto micelial del cultivo líquido se detuvo después de la fase exponencial de crecimiento, y fue procesado de acuerdo a lo descrito en metodología en el apartado 6.6. En la Figura 12 se observa el proceso de filtrado de un cultivo fúngico, donde se aprecian el medio agotado y la biomasa después de liofilizar.

Para *Pleurotus ostreatus* cepa CP-50 el cultivo se detuvo al T_8 , alcanzando una producción de 174.1 ± 2.33 g/L de biomasa húmeda, con un rendimiento de 5.18 ± 0.07 g/L de biomasa seca y 0.80 ± 0.00 L de sobrenadante fúngico. En *P. agaves* el cultivo se detuvo al T_{10} , reportando una producción de 136.97 ± 24.08 g/L de biomasa húmeda, y se obtuvo un rendimiento de 4.94 ± 0.38 g/L en peso seco y 0.81 ± 0.01 L de sobrenadante, valores donde no se observaron diferencias significativas con *P. ostreatus*. Por otra parte, el cultivo de la cepa P-50 de *P. djamor* se detuvo al T_6 , de la cual se obtuvo 128.67 ± 2.42 g/L de biomasa húmeda. Los rendimientos de esta cepa fueron significativos cuando se compararon con las otras dos cepas, observando un menor rendimiento de biomasa seca, que fue de 3.96 ± 0.01 g/L, pero también un mayor volumen de sobrenadante, de 0.84 ± 0.01 L (Tabla 3).

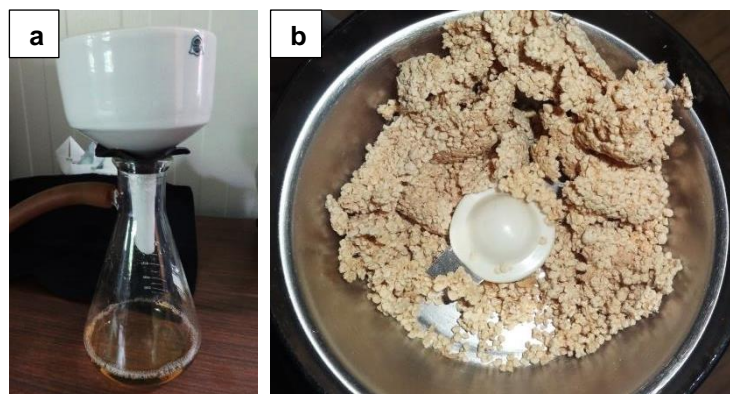


Figura 12. Proceso de separación del cultivo fúngico, a) medio agotado y b) biomasa (liofilizada).

Tabla 3. Rendimiento de la producción de biomasa y medio agotado para la extracción de metabolitos secundarios de *Pleurotus*.

Cepa	Medio de cultivo	Producción de biomasa peso húmedo (g/L)	Producción de biomasa peso seco (g/L)	Medio agotado(L)
CP-50	BFL + C	174.1 ± 2.33 ^a	5.18 ± 0.07 ^a	0.80 ± 0.00 ^a
P-50	BFL + C	128.67 ± 2.42 ^b	3.96 ± 0.01 ^b	0.84 ± 0.01 ^b
P-52	BFL + C	136.97 ± 24.08 ^b	4.94 ± 0.38 ^a	0.81 ± 0.01 ^a

Medias con diferente letra son estadísticamente significativas para los tratamientos.
BFL+C= Buffer de fosfatos líquido más cereal.

Durante la extracción del medio agotado, se observó la formación de una fase entre las fracciones orgánica y acuosa presentando una apariencia turbia. Ésta interfase presentó una apariencia espumosa, de consistencia y aspecto graso (Figura 13).

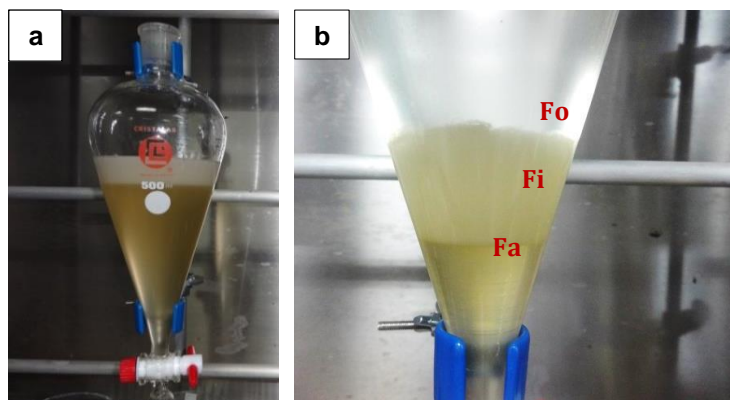


Figura 13. a) Proceso de separación por par de disolventes; b) formación de fase intermedia. Fo= Fase orgánica; Fi= Fase intermedia; Fa= Fase acuosa.

En la Figura 14 se muestran los concentrados de extracto de las tres especies. Los extractos presentaron una coloración marrón a café claro en la mayoría de los casos; de apariencia cristalina, consistencia resinosa y, en ocasiones, la formación de pequeñas agujas.

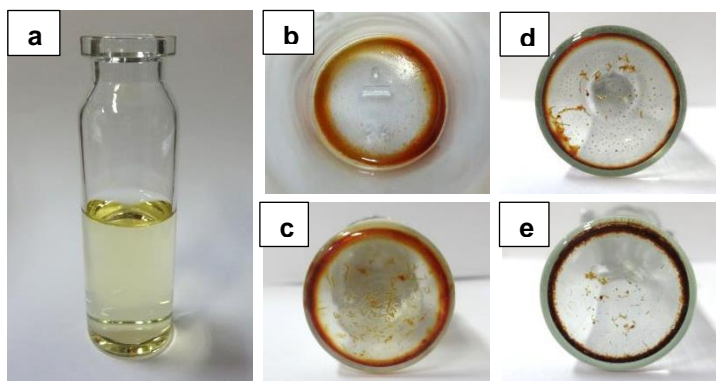


Figura 14. Extractos de la fracción orgánica de las especies de *Pleurotus*, a) extracto después de concentrar en rotavapor; b-d) extracto seco de b) *Pleurotus ostreatus*, c) *P. djamora* y d-e) *P. agaves*.

Los extractos se dejaron secar hasta la completa evaporación del disolvente para conocer el rendimiento por diferencia de peso. Las Tablas 4 y 5 muestran los rendimientos de extracto para metabolitos extracelulares (medio agotado) y los metabolitos intracelulares (biomasa), respectivamente. Los mayores rendimientos de extracto se observaron para la especie *Pleurotus ostreatus* cepa CP-50; donde se obtuvo un peso de 0.113 g/L de extracto del medio agotado y del extracto de la

biomasa 25.87 mg/g de peso seco. Hay que resaltar que en los extractos de la biomasa, se observaron los mayores rendimientos de extracto para todas las especies (Tabla 5).

Tabla 4. Rendimiento del extracto del medio agotado de *Pleurotus* spp.

Especie	Peso del extracto
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.113 g/L
<i>Pleurotus djamor</i>	0.026 g/L
<i>Pleurotus agaves</i>	0.061 g/L

Tabla 5. Rendimiento del extracto de la biomasa de *Pleurotus* spp.

Especie	Peso del extracto
<i>Pleurotus ostreatus</i>	25.87 mg/g
<i>Pleurotus djamor</i>	18.65 mg/g
<i>Pleurotus agaves</i>	8.77 mg/g

7.3. Evaluación de la actividad biológica

7.3.1. Efecto de los extractos en el crecimiento celular

Previo a la determinación de la actividad antiinflamatoria de las especies de *Pleurotus* spp., se evaluó el efecto citotóxico de los extractos del medio agotado y biomasa sobre la línea celular RAW 264.7. En la Figura 15 se muestran los porcentajes de crecimiento celular de los macrófagos incubados durante 24 horas, a distintas concentraciones del extracto del medio agotado comparadas con las células no tratadas (control basal, MOCK). Un incremento en el crecimiento celular fue observado en la concentración de 25 µg/mL de los extractos evaluados, sin embargo, este efecto no fue significativo ($P < 0.05$) respecto al grupo control. Mientras tanto a la concentración máxima de 100 µg/mL del extracto, en las tres especies se mostró una disminución significativa en el crecimiento celular respecto al control basal.

El extracto que mayor efecto citotóxico presentó correspondió a la especie *Pleurotus ostreatus* donde se obtuvo un porcentaje de crecimiento del $29.34 \pm 4.90\%$; esta especie presentó un efecto similar que el control positivo (etopósido) que mostró porcentajes de $31.96 \pm 1.50\%$ y $21.64 \pm 0.40\%$ de crecimiento celular a 20 y 40 µg/mL, respectivamente. Para las especies *P. djamor* y *P. agaves* los porcentajes de crecimiento celular a 100 µg/mL fueron de $48.25 \pm 7.90\%$ y $58.86 \pm 1.10\%$, respectivamente (Figura 15). Por otro lado, en el grupo tratado con el vehículo (DMSO 0.5%, v/v) a pesar de que se observó un menor crecimiento con respecto al control basal, éste no fue significativo estadísticamente.

Por otra parte, en la Figura 16 se observan los resultados del efecto de los extractos de la biomasa sobre los macrófagos RAW 264.7 incubados durante 24 horas. En estas circunstancias, la especie *Pleurotus ostreatus* presentó porcentajes de crecimiento celular significativamente bajos ($P < 0.05$), de $15.36 \pm 1.02\%$ y $12.65 \pm 0.92\%$, a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL, respectivamente; mostrando un mayor efecto inhibitorio comparado con el control positivo (etopósido) quien mostró porcentajes de $34.26 \pm 4.12\%$ y $22.66 \pm 1.79\%$ a 20 y 40 µg/mL, respectivamente. La especie *P. djamor* presentó también una disminución significativa en el crecimiento celular a 50 y 100 µg/mL, con valores de $79.10 \pm 5.34\%$ y $14.90 \pm 3.64\%$, respectivamente. Para la especie *P. agaves* sólo a 100 µg/mL mostró una disminución significativa con $31.94 \pm 1.30\%$ de crecimiento celular (Figura 16).

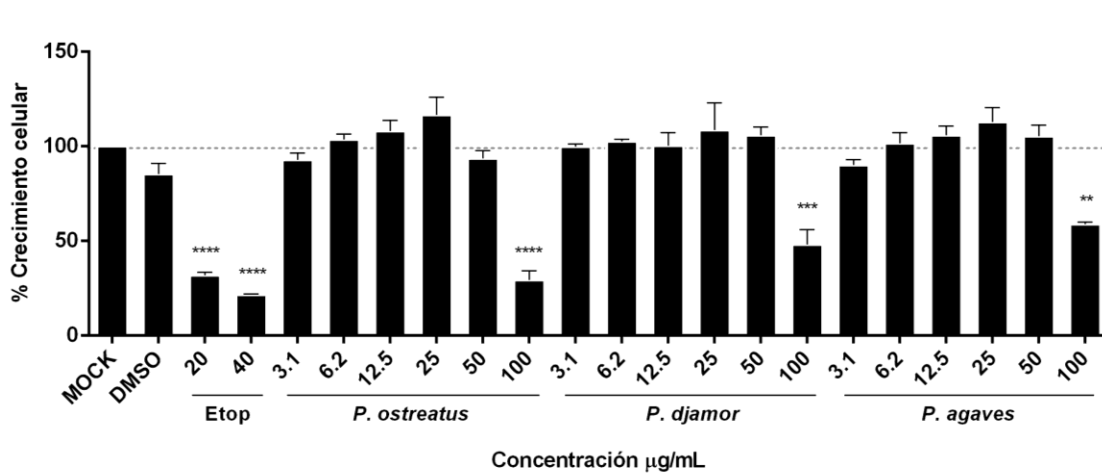


Figura 15. Efecto sobre el crecimiento celular de macrófagos RAW 264.7 por los extractos del medio agotado durante 24 horas, a diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, comparados con el grupo control (MOCK).

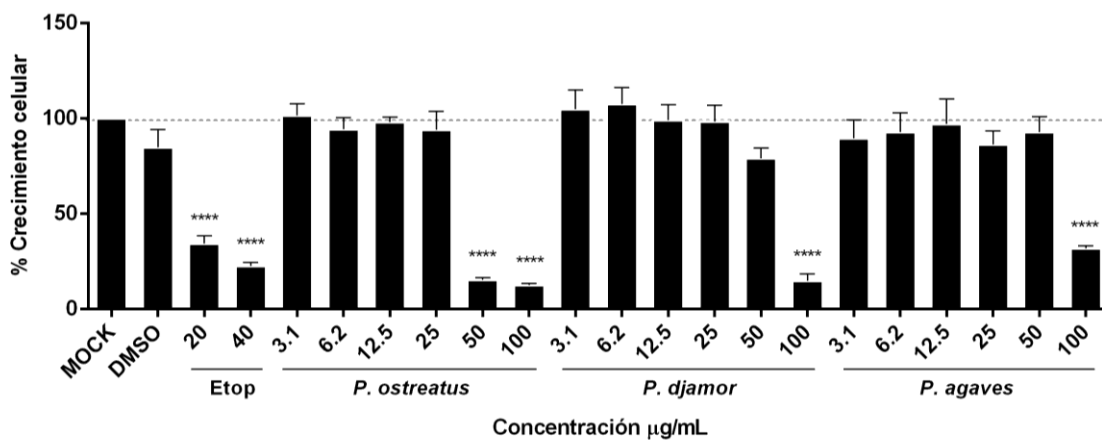


Figura 16. Efecto sobre el crecimiento celular de macrófagos RAW 264.7 por los extractos de la biomasa durante 24 horas, a diferentes concentraciones (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, comparados con el grupo control (MOCK).

Debido al efecto tóxico que presentaron los extractos, las evaluaciones posteriores de actividad antiinflamatoria sólo se realizaron a concentraciones menores a 50 µg/mL para los extractos del medio agotado y menores a 25 µg/mL para los extractos de la biomasa, concentraciones a las cuales no se alteró de manera significativa el crecimiento celular

7.3.2. Actividad antiinflamatoria *in vitro*

7.3.2.1. Efecto en la producción de óxido nítrico (NO)

Para determinar si los extractos tenían un efecto inhibitorio en el proceso inflamatorio *in vitro*, se evaluó la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Los resultados mostraron que la producción de NO fue incrementada en los macrófagos estimulados por el LPS y este efecto se vio disminuido por el tratamiento con indometacina (30 µg/mL), lovastatina (5, 10, 50 y 100 µg/mL) y los extractos a varias concentraciones.

En la Figura 17 se observa que la lovastatina inhibió la producción de NO de manera dependiente de la concentración, con un efecto significativo de $51.33 \pm 4.89\%$ y $69.83 \pm 6.61\%$ a 50 y 100 µg/mL, respectivamente. Hay que resaltar que ésta última concentración tuvo un efecto similar a la indometacina (30 µg/mL) que mostró $70.81 \pm 2.75\%$ de inhibición (Figura 17). En los extractos del medio agotado, la producción de NO se vio disminuida significativamente ($P < 0.05$) un $58.18 \pm 1.63\%$ y $42.73 \pm 2.95\%$, en *P. ostreatus* y *P. agaves* a 50 µg/mL, respectivamente, en comparación con el DMSO (Figura 17). En este caso, se observó que el DMSO presentó un efecto sobre la inhibición de la activación de los macrófagos y, otra manera de comparar el efecto de los extractos puede ser vista en el ANEXO 1. A ninguna otra concentración se observó efecto inhibitorio significativo. En *P. djamor* la producción de NO no mostró reducción significativa a ninguna de las concentraciones evaluadas.

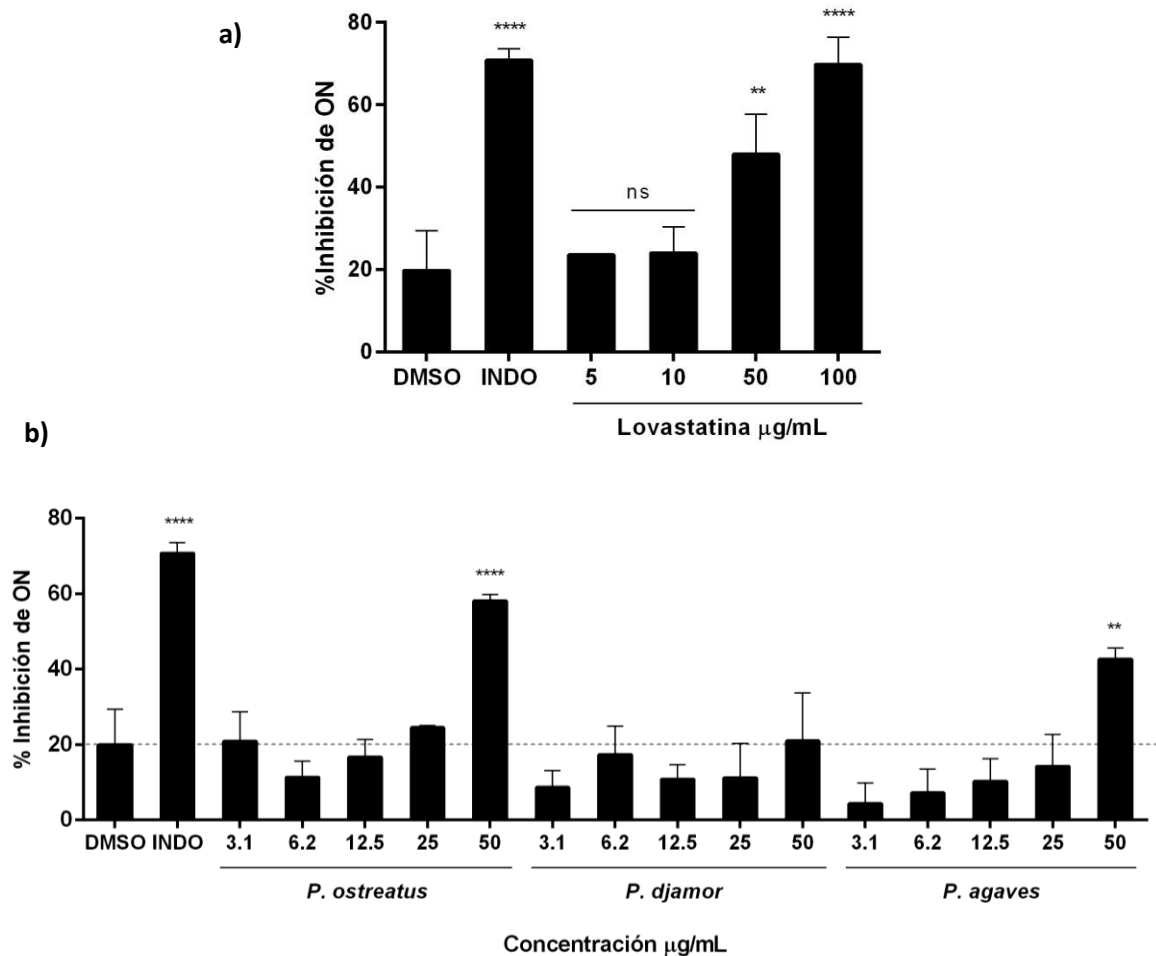


Figura 17. Efecto de la lovastatina (a) y los extractos del medio agotado (b) en la producción de ON. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con Lovastatina (5, 10, 50 y 100 µg/mL) y extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media \pm DE, n=3. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, comparados con el DMSO.

En la Figura 18 se muestran los resultados del efecto que tuvieron los extractos de biomasa sobre la producción de ON en macrófagos RAW 264.7 estimulados por el LPS. En todos los casos se inhibió la producción de ON a todas las concentraciones evaluadas, sin embargo a 25 µg/mL, el efecto inhibitorio fue mayor con valores de $57.33 \pm 10.73\%$, $51.04 \pm 3.89\%$ y $51.42 \pm 1.21\%$ para *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves*, respectivamente.

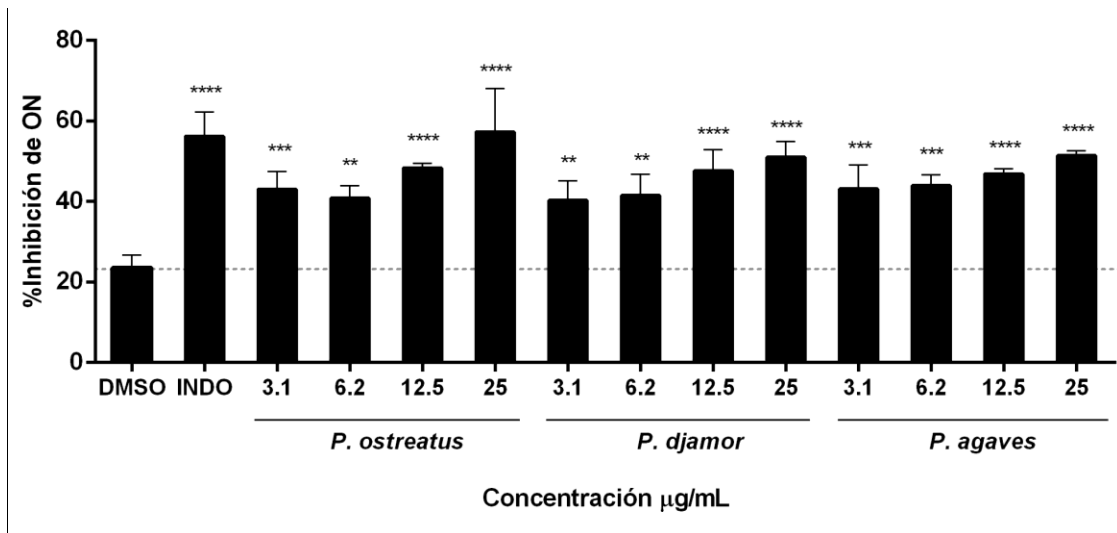


Figura 18. Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de ON. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a diferentes concentraciones (3.1 a 25 µg/mL). Los gráficos representan la media \pm DE, n=3. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, comparados con el DMSO.

7.3.2.2. Efecto en la secreción de citocinas

Los resultados de la producción de IL-6 por parte de los macrófagos se muestran en las Figura 19 y 20 para los extractos evaluados del medio agotado y la biomasa, respectivamente. El grupo control positivo (indometacina) mostró un porcentaje de inhibición de IL-6 del 89.40 ± 2.58 %, mientras que de las especies de *Pleurotus* evaluadas, *P. agaves* mostró mayor efecto inhibitorio a la concentración de 25 µg/mL en el extracto del medio agotado con un porcentaje de 80.90 ± 11.21 % (Figura 19), y para el extracto de la biomasa un porcentaje de 63.45 ± 0.68 % a 12.5 µg/mL (Figura 20). Para el caso de *P. ostreatus* y *P. djamor* en el extracto del medio agotado se observa que las concentraciones de 50 µg/mL inhibieron la producción de IL-6 en mayor porcentaje que a la concentración de 25 µg/mL (Figura 19). Sin embargo, se requiere hacer más ensayos para poder confirmar si los cambios son significativos, con respecto a la condición control (DMSO). Por su parte, en los extractos de biomasa de ambas especies se observó un mayor efecto inhibitorio a la concentración de 12.5 µg/mL en comparación a 25 µg/mL, al igual que en *P. agaves* (Figura 20).

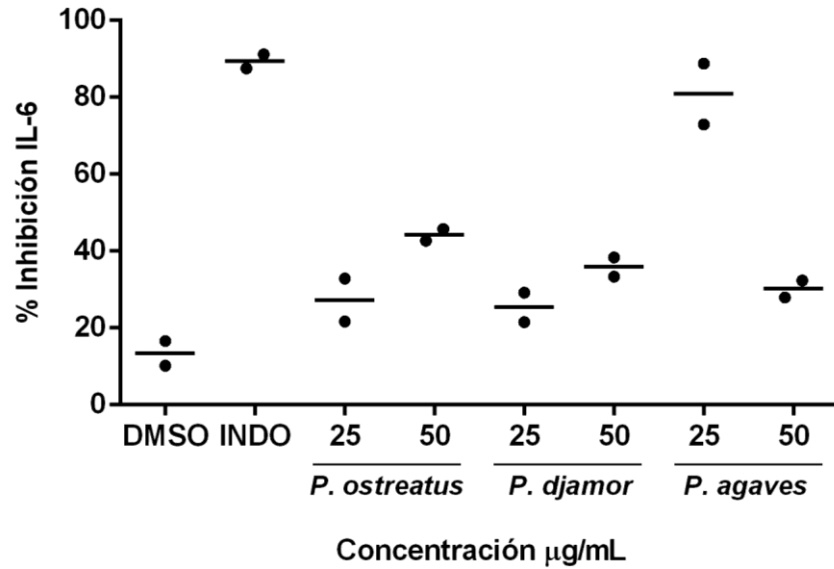


Figura 19. Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de IL-6. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

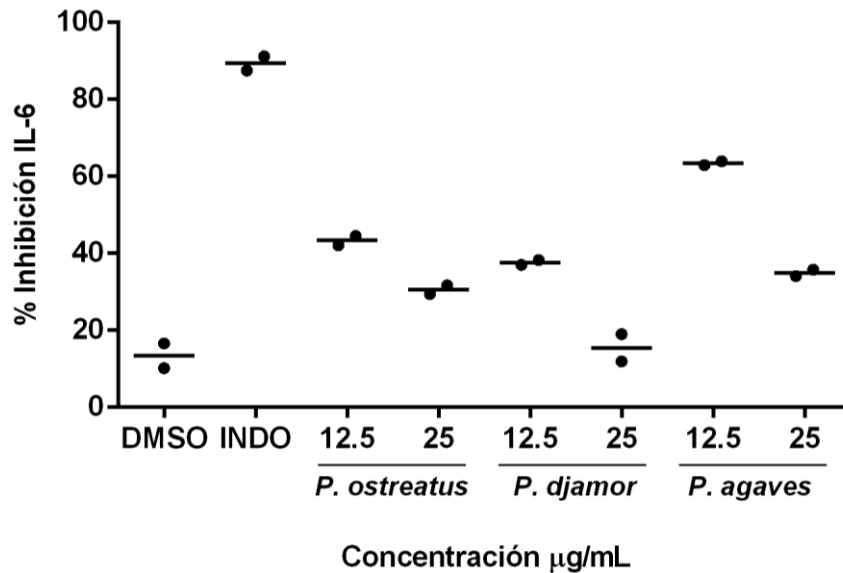


Figura 20. Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de IL-6. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 12.5 y 25 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

En las Figura 21 y 22 se muestran los resultados de un ensayo por duplicado para la producción de TNF en los macrófagos tratados con los extractos del medio agotado y la biomasa, respectivamente. De esa manera, se observa que la indometacina inhibió en un 57.49 ± 2.42 % la producción de TNF en los macrófagos estimulados con LPS y, en los extractos evaluados el efecto inhibitorio fue menor. En el extracto del medio agotado de *Pleurotus djamor* la inhibición de TNF fue menor a la concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ ($12.57 \pm 0.49\%$), en comparación con las especies *P. ostreatus* y *P. agaves*, en las cuales se obtuvo un efecto dependiente de la concentración y con porcentajes de inhibición de $36.06 \pm 2.48\%$ y 35.63 ± 3.53 %, respectivamente (Figura 21). Sin embargo, se requiere hacer más ensayos para poder confirmar si los cambios son significativos, con respecto a la condición control (DMSO).

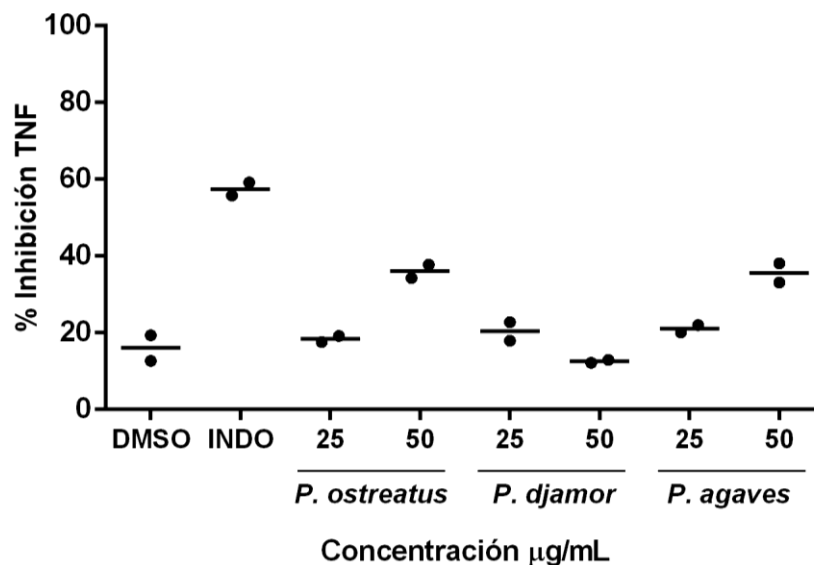


Figura 21. Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de TNF. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

Con respecto a la producción de TNF para los macrófagos tratados con los extractos de la biomasa, se observa que las especies *Pleurotus ostreatus* y *P. agaves* tuvieron un efecto cercano al de la indometacina, con porcentajes de inhibición de 42.77 ± 4.79 % y 41.64 ± 3.53 % respectivamente, a las concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, la especie de *P. djamor* tuvo un mayor efecto inhibitorio de 38.57 ± 0.51 %, a la concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22).

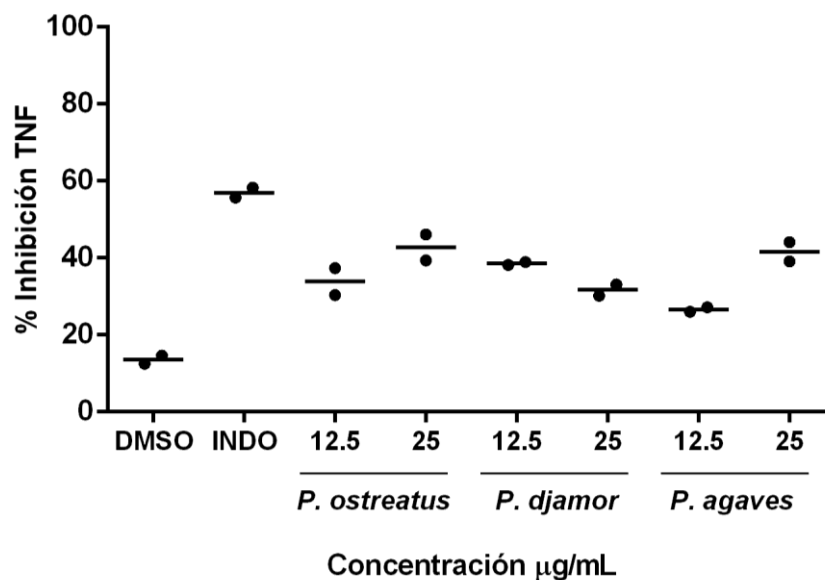


Figura 22. Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de TNF. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 12.5 y 25 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

7.3.2.3. Efecto en la activación de NF-kB

De acuerdo con los resultados obtenidos, adicionalmente se determinó si los extractos también modulaban la actividad de NF-kB en macrófagos RAW-Blue estimulados por LPS (Figuras 23 y 24). Las células pre-tratadas con los extractos del medio agotado mostraron altos porcentajes de la activación de NF-kB a distintas concentraciones, comparada con la indometacina (Figura 23). *Pleurotus ostreatus* inhibió de forma significativa a 25 y 50 µg/mL, con porcentajes de $29.65 \pm 6.35\%$ y $54.32 \pm 3.94\%$, respectivamente. Por otro lado, el mayor efecto en *P. djamor* se observó a 12.5 µg/mL con un $47.82 \pm 1.92\%$ de inhibición de NF-kB. Finalmente *P. agaves* inhibió la activación de NF-kB de manera dependiente de la concentración, presentando el mayor efecto a 50 µg/mL con $49.29 \pm 2.24\%$ de inhibición (Figura 23).

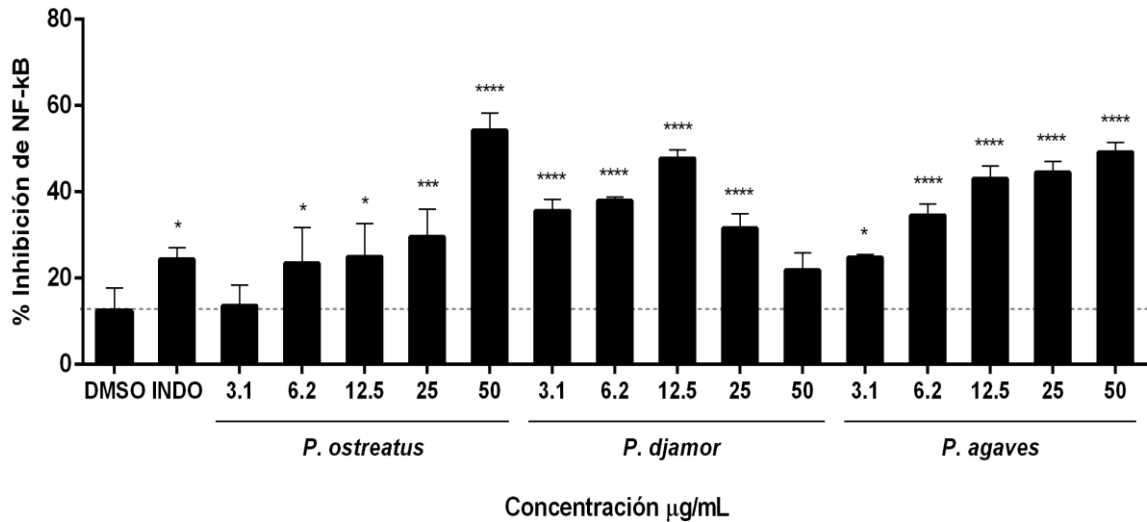


Figura 23. Efecto de los extractos del medio agotado en NF-kB. Macrófagos pre-tratados con *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a diferentes concentraciones (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media \pm DE, n=3. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, comparados con el DMSO.

Por otro lado, las células pre-tratadas con los extractos de la biomasa mostraron porcentajes de inhibición de NF-kB a las concentraciones más altas, en comparación con la indometacina. *Pleurotus ostreatus* inhibió un $49.22 \pm 1.28\%$ a 25 µg/mL, *P. djamor* en un $45.48 \pm 4.00\%$, $54.54 \pm 8.15\%$ y $58.12 \pm 4.55\%$ a las concentraciones de 6.2, 12.5 y 25 µg/mL; y finalmente *P. agaves* inhibió la activación de NF-kB a 12.5 y 25 µg/mL con porcentajes de $44.71 \pm 2.09\%$ y $67.12 \pm 3.57\%$ (Figura 24); en todos los casos el efecto fue de manera dependiente de la concentración.

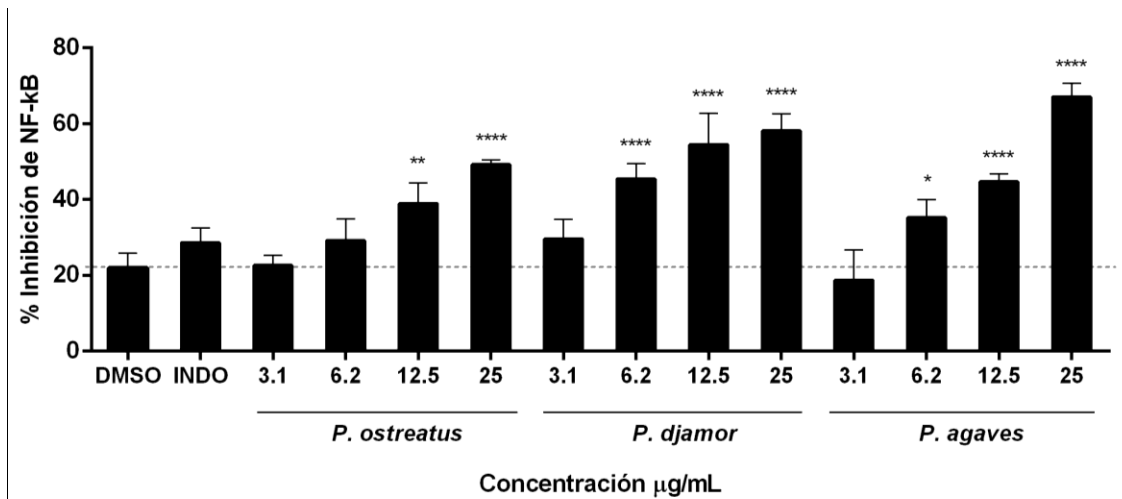


Figura 24. Efecto de los extractos de la biomasa en NF-kB. Macrófagos pre-tratados con *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a diferentes concentraciones (3.1 a 25 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, comparados con el DMSO.

7.4. Análisis químico

7.4.1. Cromatografía en capa fina

A continuación se muestra un estudio comparativo del perfil cromatográfico de los extractos de las especies de *Pleurotus*, empleando cromatografía en capa fina, mostrando una variedad de compuestos en los extractos de la biomasa y del medio agotado. En la Figura 25 se muestran dos cromatoplasmas en fase normal empleando un sistema de elución hexano-acetato de etilo-metanol (5:5:1), utilizando como compuestos estándar la lovastatina y una cumarina; y visualizadas con luz UV de onda corta y onda larga antes de ser revelados.

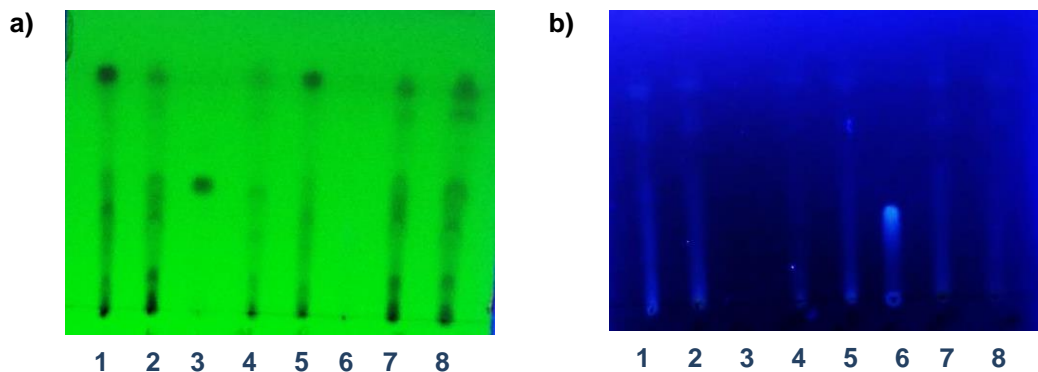


Figura 25. Cromatografía en capa fina de los extractos del medio agotado y la biomasa, de las especies de *Pleurotus*, utilizando un sistema de elución hexano: acetato de etilo: metanol (5:5:1); observado con luz UV de a) onda corta y b) onda larga. Extractos de medio agotado carril 1) *Pleurotus ostreatus*, 2) *P. djamor* y 4) *P. agaves*; extractos de la biomasa carril 5) *Pleurotus ostreatus*, 7) *P. djamor* y 8) *P. agaves*; compuestos estándar en el carril 3) Lovastatina y 6) cumarina.

En la Figura 26 se observa los resultados del perfil cromatográfico de los extractos de *Pleurotus*, utilizando como revelador sulfato cérico y 4-hidroxibenzaldehído. Por medio de estos sistemas fue posible comparar la variedad de compuestos en los diferentes extractos y observar la posible presencia de los compuestos estándar. En este caso, se observaron compuestos que migraron a la misma distancia que la lovastatina y compuestos que se comparten tanto en la biomasa como en el medio agotado. De acuerdo a este análisis, se permitió distinguir cinco compuestos compartidos en los extractos.

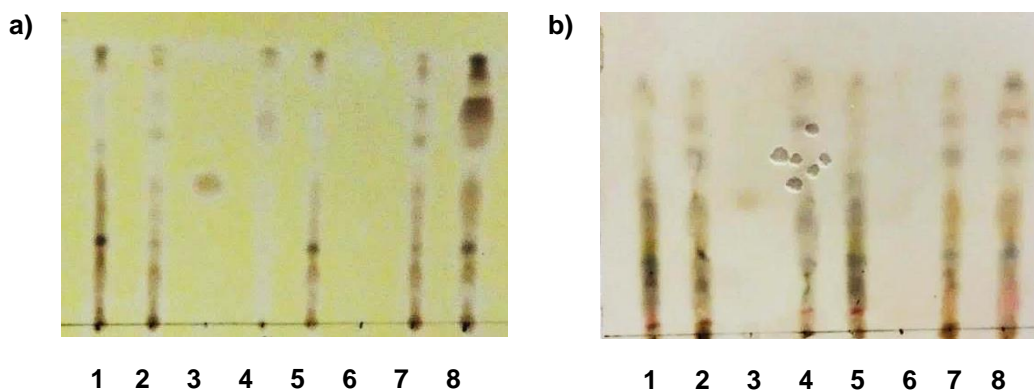


Figura 26. Cromatografía en capa fina de los extractos del medio agotado y la biomasa de las especies de *Pleurotus*, utilizando un sistema de elución hexano: acetato de etilo: metanol (5:5:1); revelado con a) sulfato cérico y b) 4-hidroxibenzaldehído. Extractos de medio agotado carril 1) *Pleurotus ostreatus*, 2) *P. djamor* y 4) *P. agaves*; extractos de la biomasa carril 5) *Pleurotus ostreatus*, 7) *P. djamor* y 8) *P. agaves*; compuestos estándar en el carril 3) Lovastatina y carril 6) cumarina.

7.4.2. Espectros de RMN

En la Figura 27, 28 y 29 se muestran los espectros de RMN ^1H que corresponden a los extractos del medio agotado de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves*. Se observan señales en la región de 0.6 a 2.6 ppm, asociadas con la presencia de compuestos de tipo ácido graso, y en la especie de *P. ostreatus* se observa una señal en la región 7.4 a 7.8 ppm, que corresponde a la presencia de una posible estructura aromática.

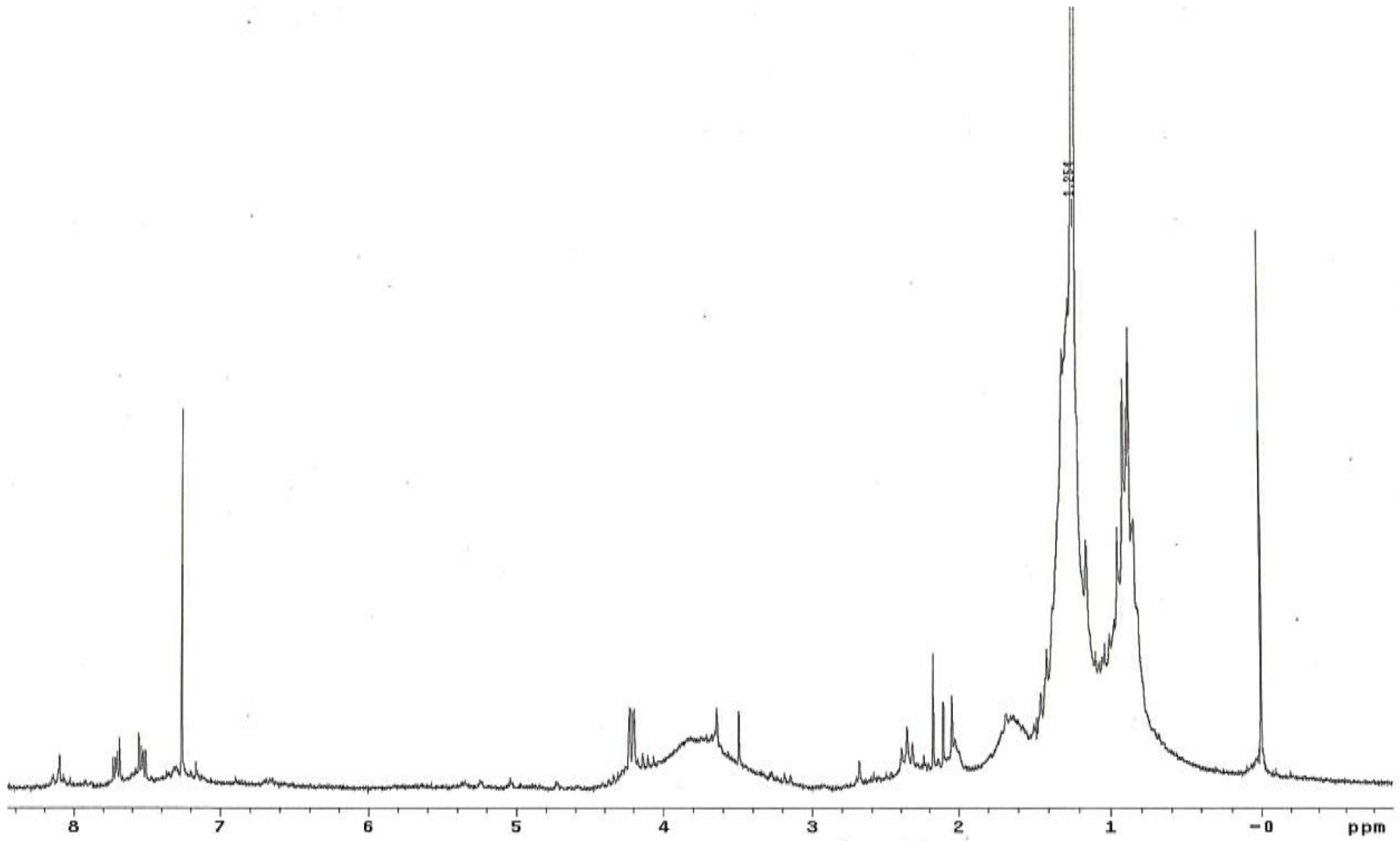


Figura 27. Espectro de RMN ^1H del extracto de acetato de etilo del medio agotado, de *Pleurotus ostreatus*.

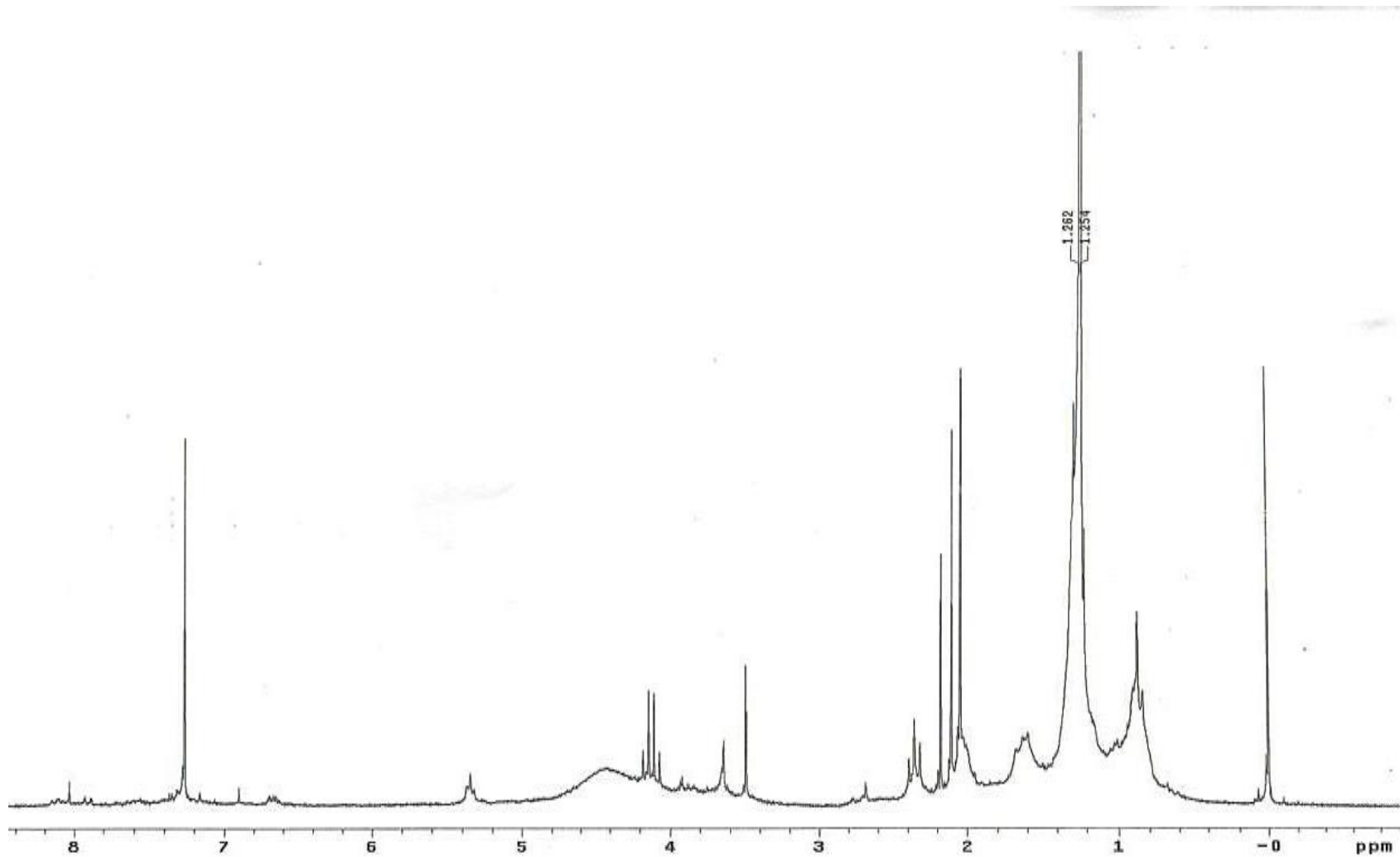


Figura 28. Espectro de RMN ^1H del extracto de acetato de etilo del medio agotado de *Pleurotus djamor*.

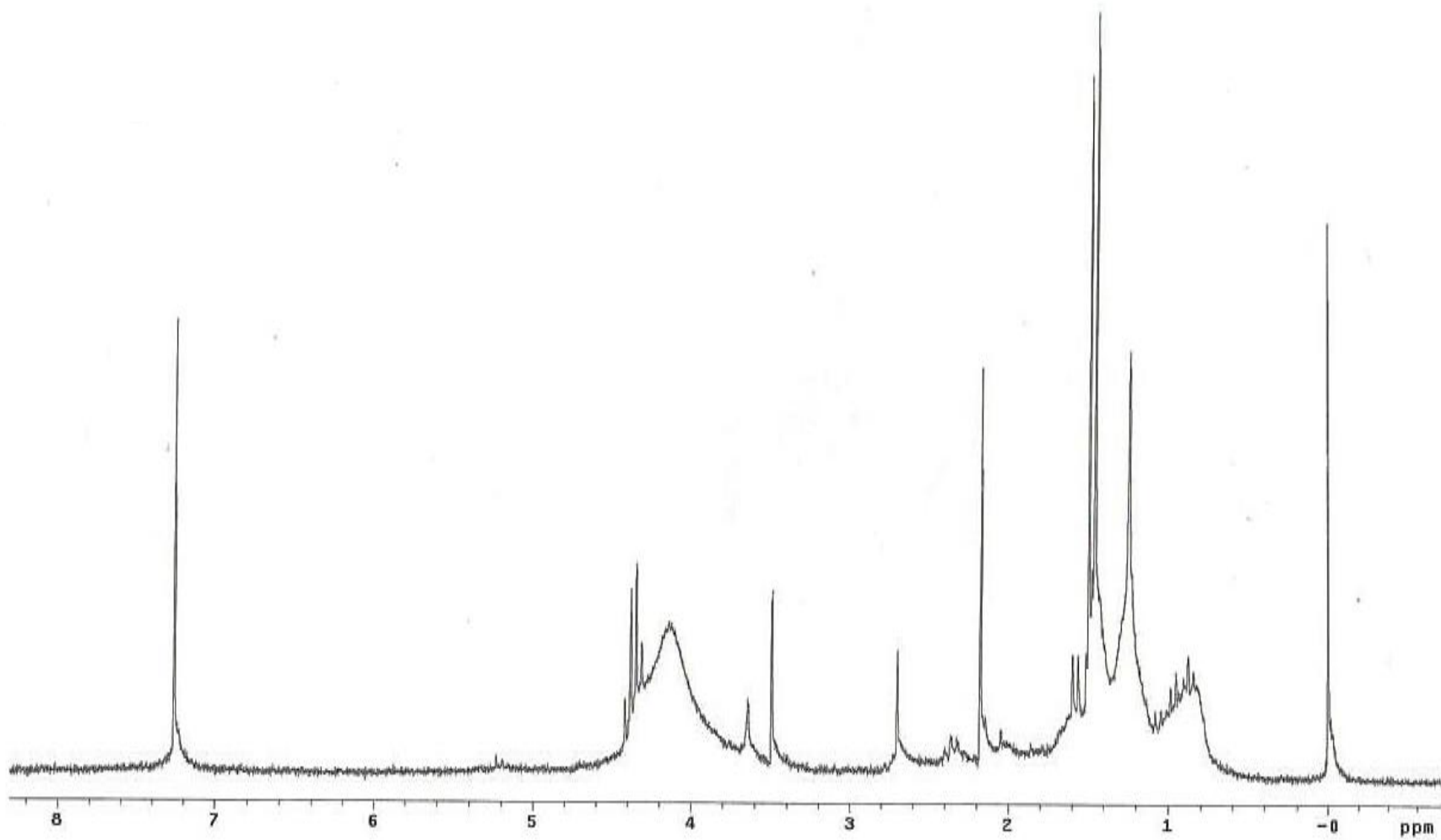


Figura 29. Espectro de RMN ^1H del extracto de acetato de etilo del medio agotado *Pleurotus agaves*.

En la Figura 30, 31 y 32 se muestran los espectros de RMN ^1H de los extractos de la biomasa, donde se observa similitud con los espectros del medio agotado, con señales en la región 0.6 a 2.6 ppm, que corresponde a estructuras de tipo ácido graso, en todos los casos. Además en la región 4.0 a 4.4 ppm se observan señales particularmente en las especies de *Pleurotus ostreatus* y *P. djamor*, y muy ligeramente se observan en *P. agaves*. También está presente una señal en la región 7.0 a 7.4 al igual que en los espectros anteriores; y la presencia de la estructura de tipo aromático únicamente en *P. ostreatus* en la región 7.4 a 7.8 ppm.

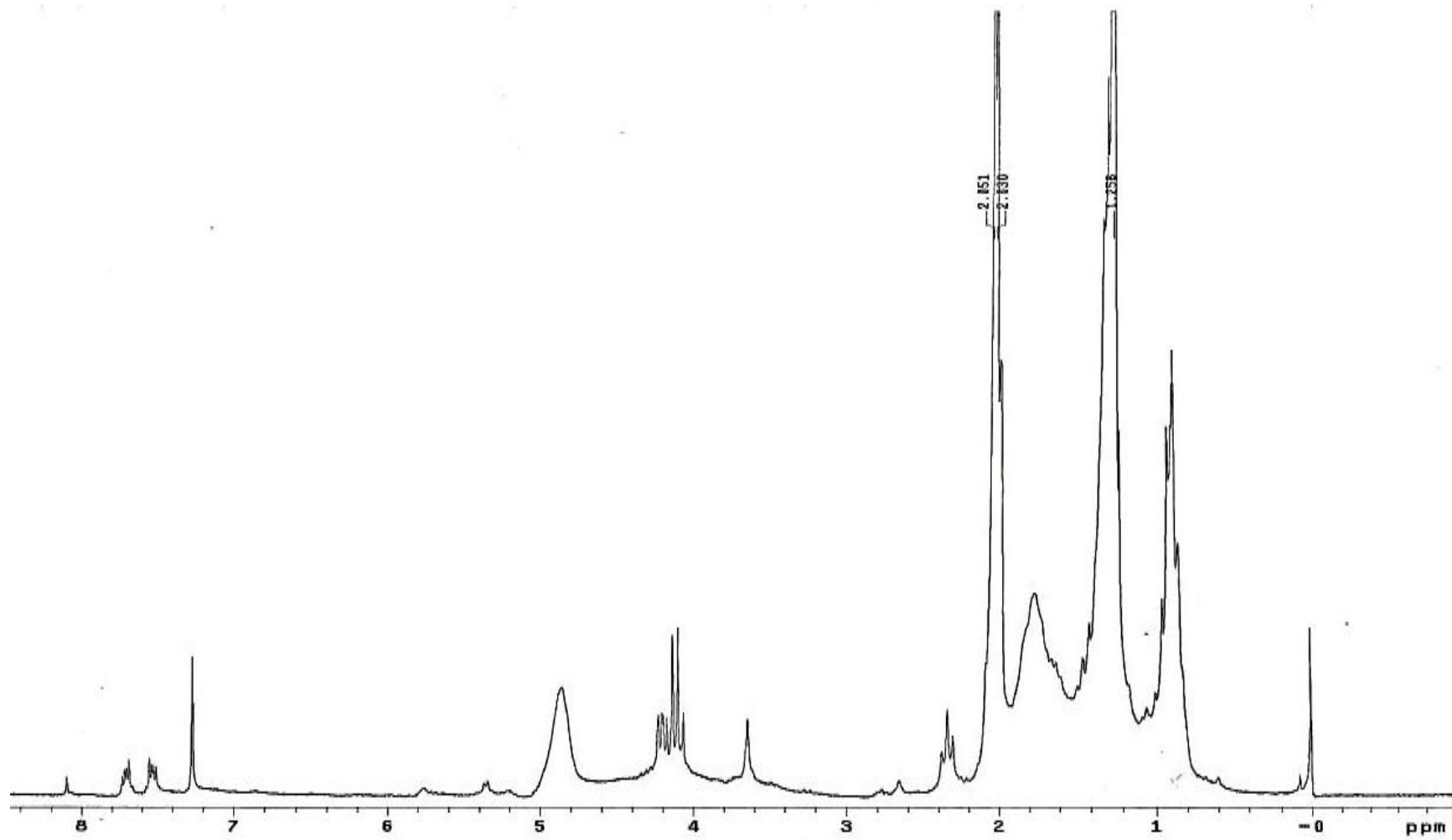


Figura 30. Espectro de RMN ^1H del extracto de acetato de etilo de la biomasa, de *Pleurotus ostreatus*.

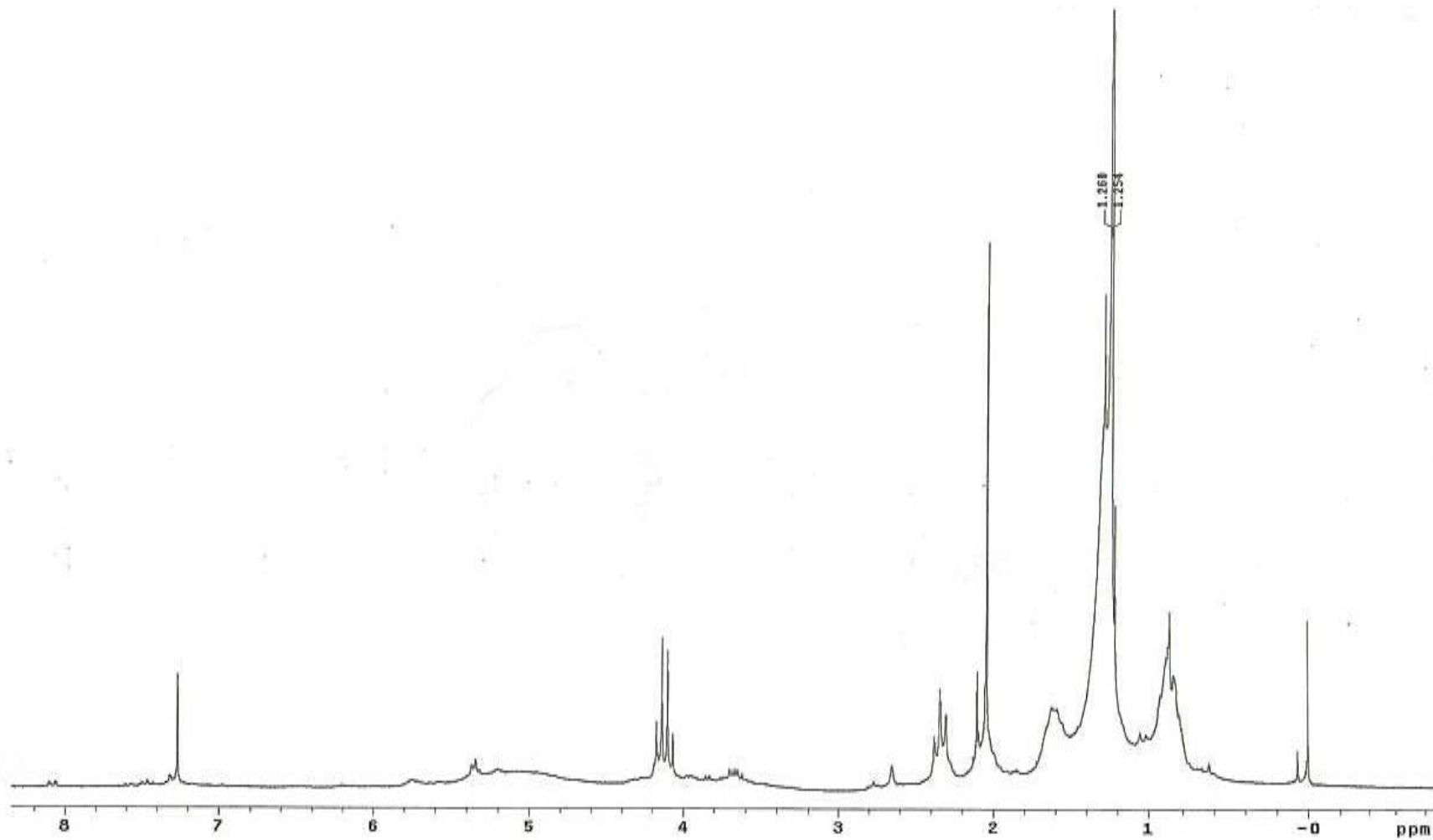


Figura 31. Espectro de RMN ^1H del extracto de acetato de etilo de la biomasa, de *Pleurotus djamor*.

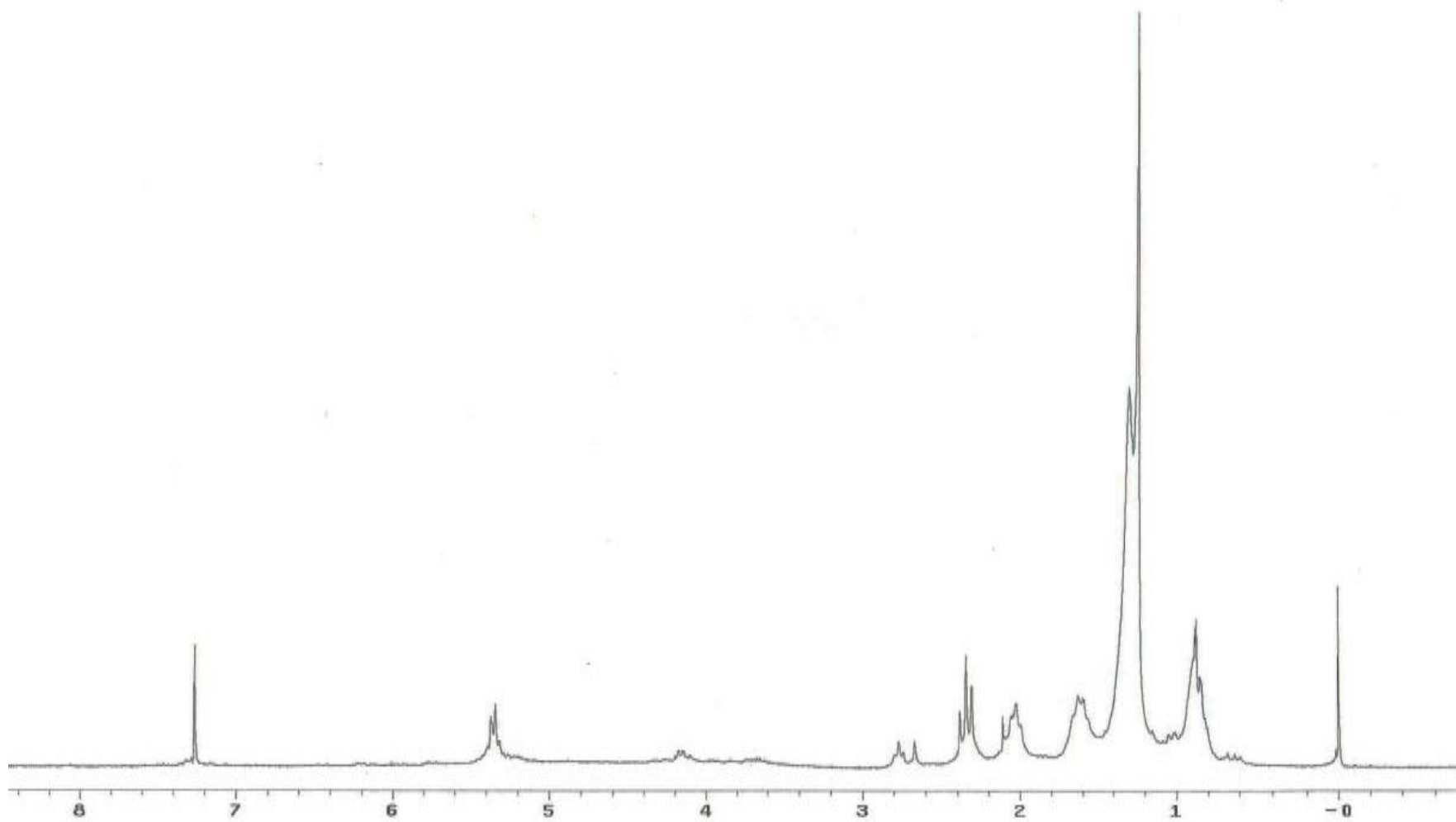


Figura 32. Espectro de RMN ^1H del extracto de acetato de etilo de la biomasa, de *Pleurotus agaves*.

7.4.3. Cromatografía de gases - Espectrometría de masas

Se analizaron los extractos solubles en acetato de etilo del medio agotado de las especies *Pleurotus djamor* y *P. ostreatus* por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, con la finalidad de elucidar los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo. Cada uno de los picos más abundantes fue analizado y comparado con una biblioteca de moléculas del equipo de CG-EM, como un acercamiento de la composición química del extracto.

En la Figura 33 se muestra el cromatograma de *Pleurotus djamor*, las señales analizadas corresponden a los picos más abundantes en los tiempo de retención a los 19.48 y 21.17 min. De acuerdo a la similitud los compuestos corresponden al éster del ácido hexadecanoico y al ácido 9,12-octadecadienoico, respectivamente. La similitud entre el espectro de éstos compuestos del extracto y la biblioteca pueden observarse en las Figuras 35 y 36.

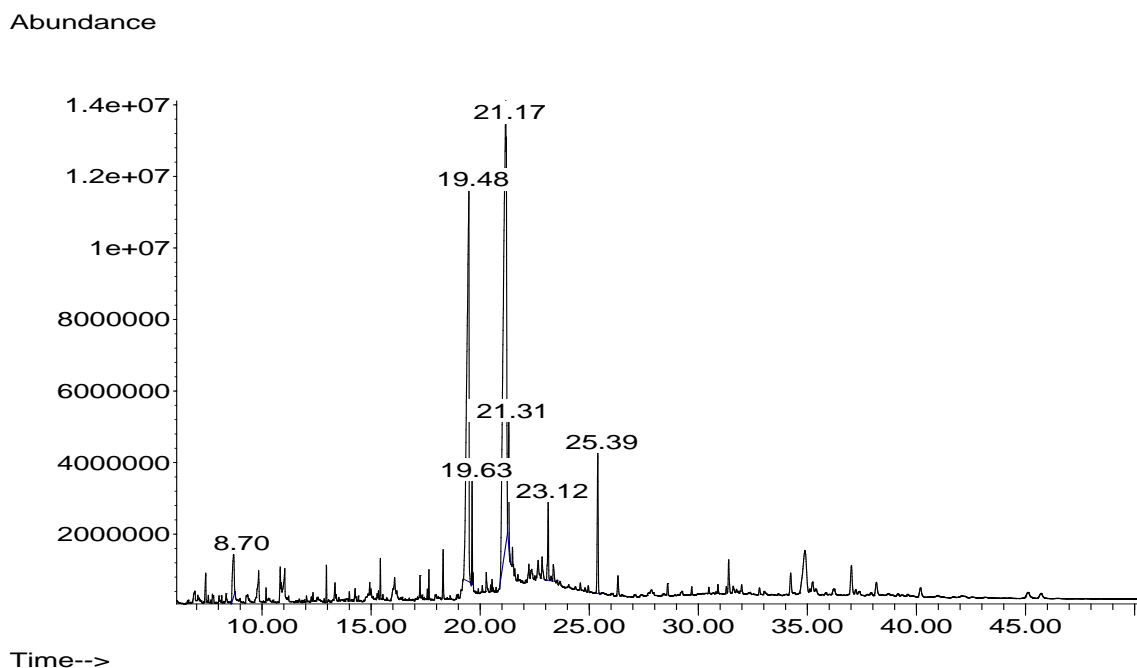


Figura 33. Cromatograma de iones totales del extracto de acetato de etilo de *Pleurotus djamor*.

En la Figura 34 se muestra el cromatograma de *Pleurotus ostreatus*, donde uno de los picos analizados en el tiempo de retención 20.98 min corresponde también al ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico). La similitud entre los espectros del extracto y la biblioteca puede observarse en la Figuras 36.

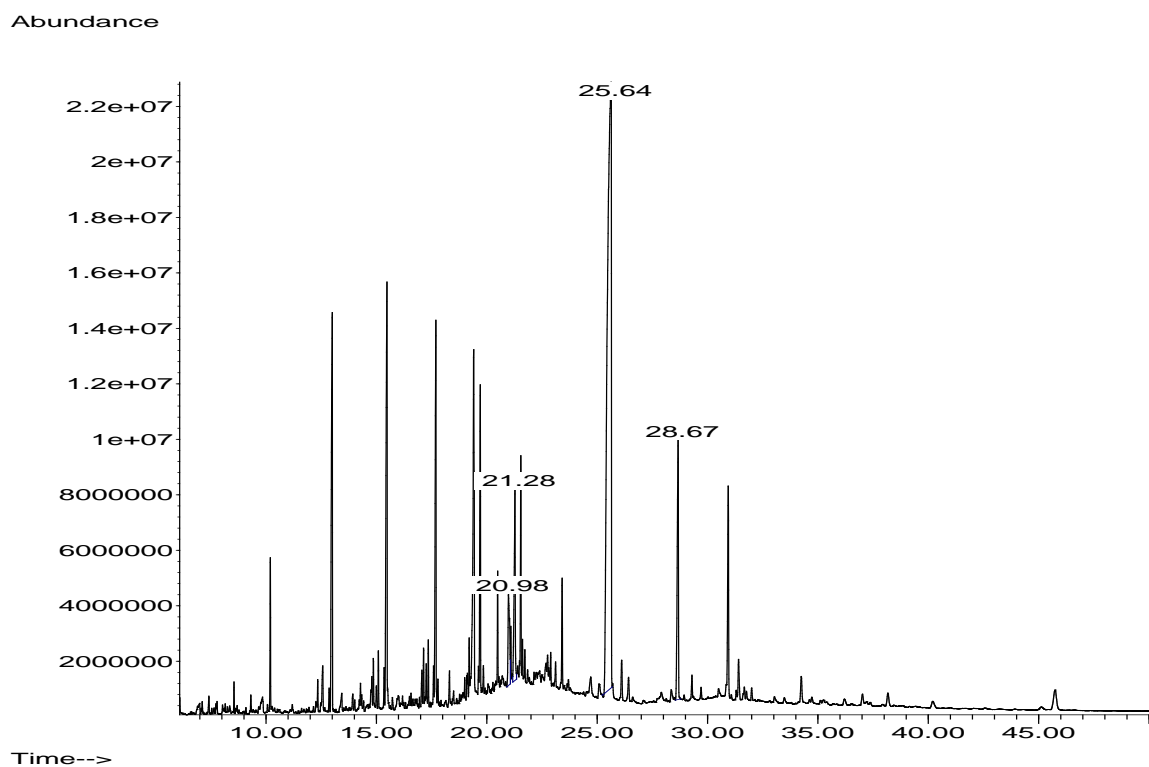


Figura 34. Cromatograma de iones totales del extracto de acetato de etilo de *Pleurotus ostreatus*.

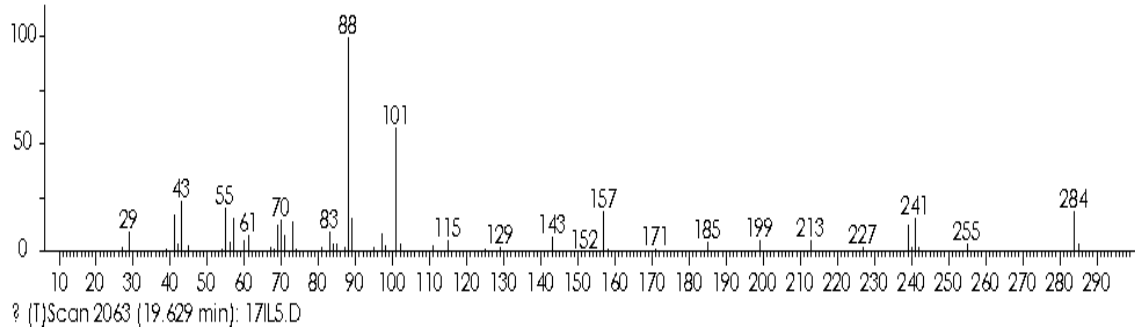
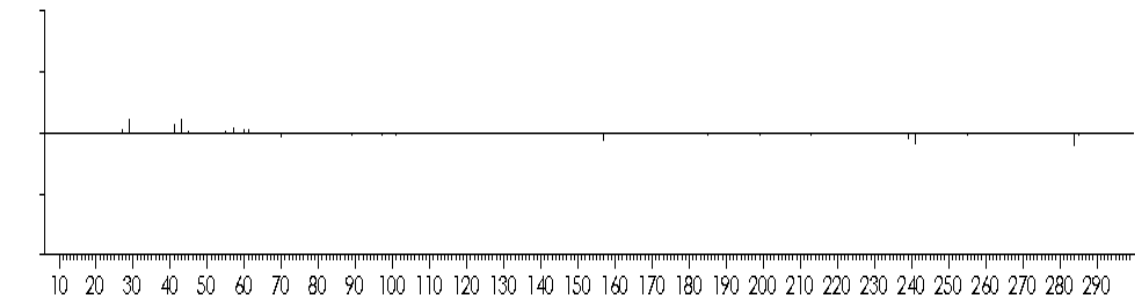
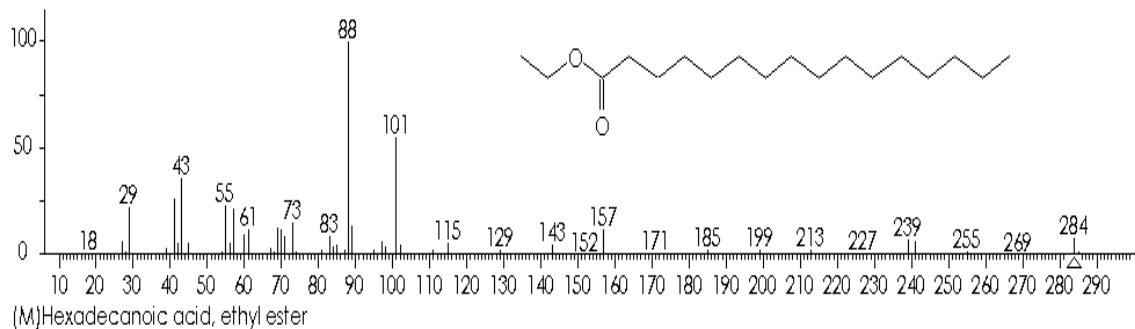


Figura 35. Comparación del espectro de masas correspondiente al etil éster del ácido hexadecanoico presente en el extracto de *Pleurotus ostreatus* (inferior) con el de la biblioteca del equipo de CG-EM (superior).

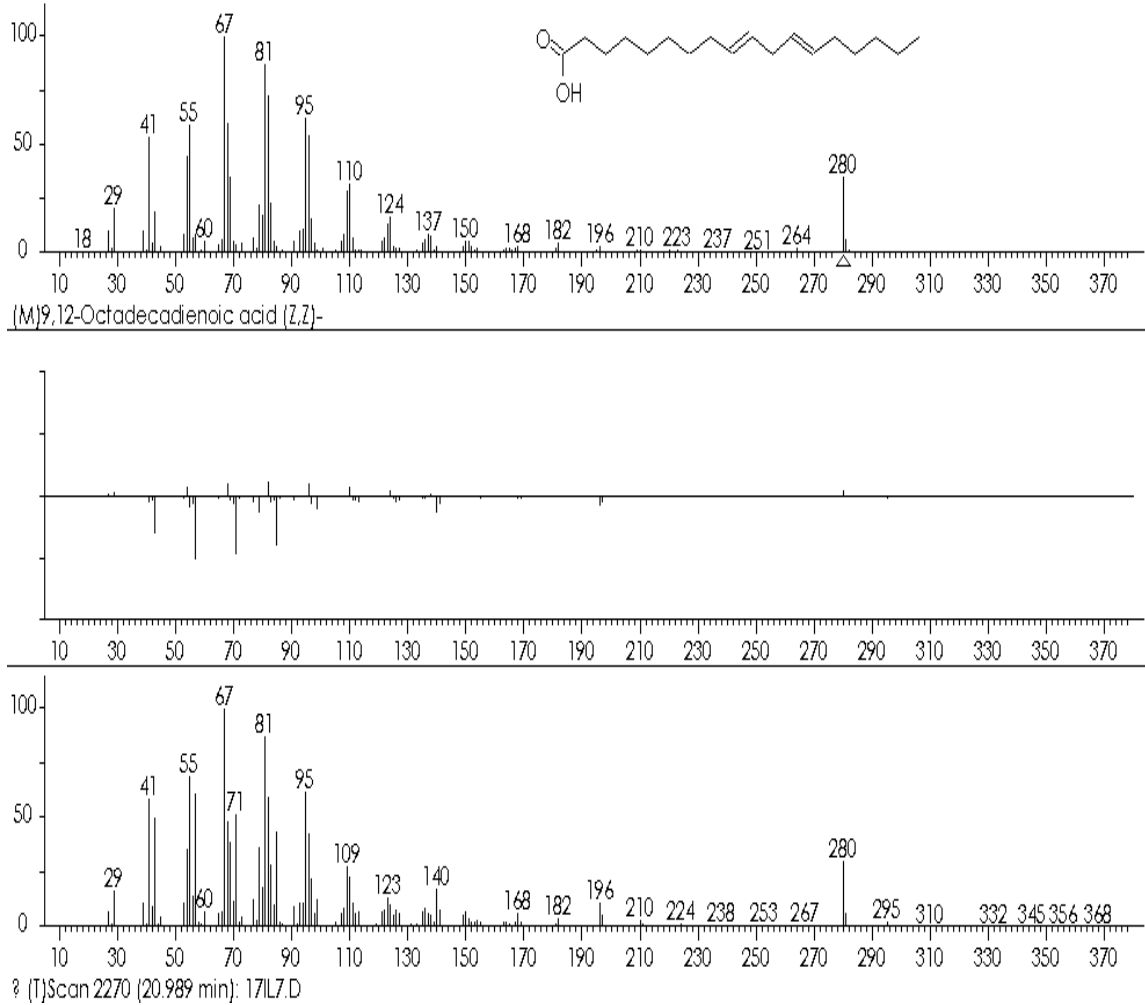


Figura 36. Comparación del espectro de masas correspondiente al ácido 9,12-octadecadienoico, presente en el extracto de *Pleurotus djamor* (inferior) con el de la biblioteca del equipo de CG-EM (superior).

8. DISCUSIÓN

8.1. Producción de biomasa de *Pleurotus* en cultivo sumergido

De los métodos que se conocen para la producción de biomasa en *Pleurotus*, sin duda la fermentación en estado sólido permanece como el método de elección para la obtención de cuerpos fructíferos debido a los altos rendimientos que se obtienen. Sin embargo, la fermentación en estado sólido es un proceso lento que implica un periodo de tiempo prolongado para la obtención de cuerpos fructíferos. Para la producción de metabolitos bioactivos, la fermentación en estado líquido o cultivo sumergido representa una de las mejores alternativas en cuestión de ahorrar tiempo, obtener un producto de gran calidad a través de procesos estandarizados, se reduce el espacio de trabajo y aumenta la producción, son fácilmente reproducibles y se controlan más variables; por estos motivos se optó utilizar éste método para la producción de biomasa fúngica.

En cultivo líquido los hongos presentan un crecimiento de tipo microbiano con presencia de cuatro etapas: latencia, exponencial, estacionaria y de muerte (Sánchez y Royse, 2001). En la cinética de crecimiento de las especies de *Pleurotus*, se observó ausencia de la fase de latencia, ya que se promovió durante la producción del inóculo anteriormente, el cual se encontraba en la etapa exponencial de crecimiento. Este paso favoreció el crecimiento del hongo inmediatamente (fase exponencial), reduciendo el tiempo para la producción de biomasa. En este caso, los resultados obtenidos son importantes ya que si se pretende llevar la producción a escala industrial, un cultivo líquido podría satisfacer las necesidades para la producción de metabolitos funcionales. En la mayoría de estudios, la producción del inóculo es un paso fundamental, ya que tiene dos funciones principales: 1) la propagación celular en el medio, lo cual proporciona un inóculo homogéneo y estable para la fase de producción de los metabolitos de interés y 2) dirigir el metabolismo del hongo hacia la biosíntesis de metabolitos secundarios (Chegwin *et al.*, 2012). De esta manera se alcanzó la mayor producción de biomasa en las especies aquí estudiadas entre el cuarto y octavo día, en comparación con un estudio donde se reporta que la mayor producción se observa luego del día nueve de crecimiento (Rosado *et al.*, 2003).

De los diversos factores que influyen en la producción de la biomasa, los componentes del medio juegan un papel importante, donde el carbono y el nitrógeno son los más dominantes ya que estos están directamente relacionados con la

formación de la biomasa y los metabolitos producidos, tanto intracelulares como extracelulares (Goswami *et al.*, 2012; Alarcón *et al.*, 2006); además la naturaleza y la concentración de éstos componentes pueden regular el metabolismo secundario de los hongos.

Estudios realizados en *Pleurotus* han evaluado distintas fuentes de carbono y nitrógeno con el propósito de determinar la influencia que tienen únicamente en la producción de biomasa. En *P. tuber-regium* se encontró que la adición de fructosa al medio permitió mayores producciones de biomasa que cuando se adicionó glucosa, y en relación a la fuente de nitrógeno el extracto de levadura favoreció mejor la producción que al utilizar peptona (Wu *et al.*, 2003). Al estudiar *P. ostreatus* se determinó que las mejores condiciones de crecimiento se dieron al suministrar 20 g/L de glucosa al medio de cultivo, lo que permitió un aumento en la producción de biomasa de 8.6 g/L (Guillén-Navarro *et al.*, 1998). Otro estudio en *P. ostreatus* determinó que las mejores condiciones de crecimientos se obtuvieron utilizando dextrosa en una concentración de 40 g/L y peptona y extracto de levadura (1:1) en concentración de 5 g/L, con una producción de biomasa de 7.58 g/L (Horincar *et al.*, 2014). Estos valores son mayores a los reportados en este trabajo; por otro lado Horincar y colaboradores mencionan que para alcanzar esos rendimientos utilizaron una concentración de 0.2% de inóculo en medio sólido de las cuatro que ellos evaluaron. Sin embargo, al comparar los resultados utilizando 5% del inóculo en estado líquido, su producción disminuyó oscilando entre 1.93 y 2.9 g/L de biomasa; este efecto se pudo asociar a la diferencia del inóculo que emplearon, obteniendo mejores resultados con el inóculo crecido en cultivo sólido en comparación con el proveniente de cultivo líquido, posiblemente porque el micelio en estado sólido crece en mayor densidad. Si bien, las producciones que se obtuvieron en este estudio utilizando la misma concentración de inóculo fueron mayores a las que ellos reportan, con 4.27 g/L, 4.94 g/L y 5.40 g/L de biomasa para *P. djamor*, *P. agaves* y *P. ostreatus*, respectivamente.

Papaspyridia y colaboradores (2010) quienes trabajaron con *Pleurotus ostreatus* reportan producciones que varían entre 2.5 y 23.7 g/L dependiendo del tiempo del cultivo y utilizando xilosa como fuente de carbono en una proporción de 60 g/L. Manifiestan que después del día seis, en el que se obtiene la máxima producción de biomasa, se presenta un fenómeno de autólisis del micelio con reducciones

cercanas al 50% en el séptimo día del cultivo, efecto no observado en este estudio. Además en este estudio se utilizó una concentración de 20 g/L del sustrato, tres veces menor que los que se reportan al utilizar otros medios.

Existen estudios donde además de enriquecer los medios de cultivo para mejorar las producciones de biomasa, también lo hacen para optimizar la producción de metabolitos o de enzimas particulares. Para el caso de enzimas, del cultivo sumergido de *P. eryngii*, *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* se evaluó la influencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de lacasas y peroxidasas (Stajic *et al.*, 2006); y en *P. ostreatus* además se han evaluado varios inductores para estimular la producción de ciertas enzimas. *P. dryinus* es otra especie que también se ha cultivado para la producción simultánea de hidrolasas y oxidasas (Gregori *et al.*, 2007). En cuanto a la producción de metabolitos, en *P. citrinopileatus* se optimizaron las condiciones del medio para maximizar el crecimiento y producción de polisacáridos, reportando que la mayor producción de éstos se obtuvo al utilizar una proporción de C/N de 40 (Wang *et al.*, 2005). Otro caso se presenta en *P. ostreatus* al analizar el efecto del carbono y nitrógeno para favorecer la producción de lovastatina en el medio líquido, encontrando que la mayor producción del metabolito se obtuvo en una proporción de C/N de 6.07 (Alarcón y Águila, 2006). La relación entre estas fuentes de nutrientes dependerá del interés en la producción de biomasa o de algún metabolito determinado. Se ha reportado que altos contenidos de nitrógeno en el medio producen inhibición en el crecimiento de *P. ostreatus* (Rizki *et al.*, 2011). Sin embargo, en el trabajo de Alarcón y Águila (2006) se observó un efecto paralelo en el incremento de la fuente de nitrógeno al medio y la producción de lovastatina, alcanzando una producción de 25.49 mg/L. Este incremento fue significativo cuando se utilizó fuentes de nitrógeno orgánicas como extracto de levadura y peptona.

En los estudios descritos arriba, la mayoría utilizan medios de cultivo compuestos por una o dos fuentes de carbono y nitrógeno, y una solución de sales como fuente de micro elementos. Entre las fuentes de carbono destacan la glucosa, fructosa, dextrosa y lactosa, y el extracto de malta como una fuente adicional (Horincar *et al.*, 2014); y como fuente de nitrógeno incluyen el extracto de levadura y peptona, principalmente. En esos estudios se comprueba que el uso de medios sintéticos y naturales como los que se describen favorece la producción de biomasa y metabolitos en las especies de *Pleurotus* estudiadas.

Por otro lado, se han realizado estudios enfocados en el uso de sustratos orgánicos no convencionales debido a su gran disponibilidad en comparación con los medios sintéticos. El uso de este tipo de sustratos va en aumento para la producción de hongos en cultivo sumergido evaluando su efecto en la producción de biomasa y metabolitos bioactivos, con la finalidad de incrementar su producción y reducir el tiempo de producción. Se han evaluado medios de cultivo que contienen cereal como única fuente de carbono y nitrógeno para incrementar la producción de enzimas como lacasas y peroxidasas en *Coriolopsis gallica* y *Bjerkandera adusta*, obteniendo resultados positivos (Pickard *et al.*, 1999).

Trabajos desarrollados en el grupo del laboratorio de Micología del CIB han utilizado cereal (All-Bran®) como única composición del medio para la producción de *Ganoderma* spp., (Núñez Urquiza, 2017; Mundo Ocampo, 2016) y *Pleurotus* spp. (Tello *et al.*, 2016). Núñez Urquiza menciona que debido a la interferencia de partículas no disueltas, optó en simplificar el medio de cultivo a través de un método de separación por filtración, ya que éstas partículas interfirieron para determinar la producción de biomasa de *Ganoderma lucidum*. Este método se realizó para el cultivo de las especies en este trabajo, obteniendo resultados más confiables en cuanto a la producción de biomasa fúngica. Por otro lado, Tello y colaboradores (2016) reportan altas producciones de biomasa en *P. ostreatus* y *P. djamor*, de 14.13 g/L y 8.50 g/L respectivamente utilizando All-Bran®, en comparación con el medio enriquecido solo con extracto de malta, teniendo producciones de 3.69 g/L y 1.12 g/L de biomasa respectivamente. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron producciones menores de 5.40 g/L en *P. ostreatus* y 4.27 g/L en *P. djamor*; respecto a los que ellos reportan cuando utilizaron las mismas condiciones de crecimiento con All-Bran®, por el hecho de que ellos no especifican si el peso reportado corresponde a la biomasa seca o húmeda, o no eliminaron las partículas no disueltas del medio y en efecto esos valores no reflejan la producción real de biomasa. Por otro lado, para *Pleurotus agaves* es la primera vez que se transfiere su crecimiento en cultivo sumergido a pequeña escala.

Por lo tanto, el medio de cultivo no convencional utilizado en el crecimiento de las especies de *Pleurotus* resultó ser una buena opción para la obtención de biomasa fúngica en cultivo sumergido a pequeña escala, ya que se logró incrementar la producción de *P. ostreatus* y *P. djamor* en comparación con trabajos anteriores realizados en el grupo de trabajo del laboratorio. Además, fue posible reducir el tiempo

de producción (días), asegurando una producción homogénea de productos del metabolismo, obteniendo resultados similares a los que se reportan con el uso de medios complejos sintéticos. A pesar de que algunos otros estudios reportan producciones de biomasa superiores a las descritas en este trabajo, los factores pueden ser diversos asociando esas diferencias al distinto comportamiento de las cepas estudiadas, ya que incluso entre mismas especies existen diferencias.

En el caso particular de *Pleurotus agaves* aún se sabe muy poco de este hongo debido a que su estudio es aún escaso; debido a la restricción de su hábitat, su presencia de manera natural llega a ser una amenaza. En este sentido, al trabajar con nuevas especies son mayores los desafíos a enfrentar para una eficiente producción de biomasa la primera vez. Sin embargo, también representa un avance y un aporte al conocimiento el estudiar especies novedosas, las cuales pueden ser excelentes recursos biológicos para su aprovechamiento en distintos enfoques, por ejemplo para la producción de metabolitos bioactivos. En este contexto, la producción de estos hongos a través del cultivo sumergido representa una buena opción para disminuir la estirpe de las especies silvestres cuando se requieren cantidades considerables de estos recursos.

8.2. Actividad biológica de los extractos de *Pleurotus*

Al evaluar los extractos de acetato de etilo de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* en la línea celular de macrófagos murino RAW 264.7, nuestros resultados mostraron un efecto negativo en el crecimiento de las células a la concentración de 100 µg/mL para los extractos del medio agotado, mientras que en los extractos de la biomasa, el efecto fue mayor en las tres especies a la misma concentración con una viabilidad menor al 30%. Efectos similares en el crecimiento celular se presentaron en el extracto de la biomasa de *Pleurotus giganteus* evaluado a 100 µg/mL, teniendo una viabilidad de células del 40%; los autores manifiestan que este efecto podría deberse a la sobresaturación de compuestos en esa concentración en particular, y en consecuencia llevar a una reducción del crecimiento de las células (Baskaran *et al.*, 2017). Sin embargo, el efecto citotóxico de los extractos de la biomasa en este estudio es aún mayor; y esto posiblemente a la diferencia en el contenido metabólico. Por otro lado, los extractos de *Pleurotus* disminuyeron la respuesta pro-inflamatoria en

macrófagos estimulados con LPS, al disminuir la secreción de NO, citocinas como IL-6 y TNF, así como la activación de NF- κ B.

Los extractos o compuestos aislados de *Pleurotus* han mostrado diversos efectos biológicos en varios modelos *in vitro* e *in vivo*. La actividad antiinflamatoria en este género de hongos ha sido demostrada en *P. florida* y *P. eryngii* (Paul *et al.*, 2017); reportándose tal efecto sin profundizar en los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción. De reciente interés se han desarrollado estudios abarcando éstos aspectos en otras especies como *Pleurotus giganteus*, *P. ostreatoroseus*, *P. citrinopileatus*, midiendo la expresión de mediadores biológicos involucrados en el proceso inflamatorio (Baskaran *et al.*, 2017; Lin Liu *et al.*, 2014; Corrêa *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta ahora no habían sido estudiadas *Pleurotus djamor* y *Pleurotus agaves*. Los datos mostrados en este estudio son la primera evidencia que se reporta del efecto antiinflamatorio que poseen estas especies mexicanas sobre la línea celular de macrófagos.

Los macrófagos juegan un papel importante en el mecanismo de defensa del organismo, ya que al activarse secretan diferentes mediadores, y la sobreproducción de éstos está implicada en diversos escenarios inflamatorios. Se han encontrado niveles elevados de NO y citocinas en patologías como artritis reumatoide, inflamación crónica intestinal, shock séptico, por mencionar algunas enfermedades; esto fundamenta el interés en la búsqueda de agentes terapéuticos que modulen selectivamente la concentración elevada de estos y otros mediadores inflamatorios. Aunque el óxido nítrico es responsable del mecanismo de defensa del organismo, las concentraciones elevadas de esta molécula se asocian a procesos inflamatorios y además causan un efecto tóxico en las células. En este contexto, los extractos de *Pleurotus* fueron capaces de disminuir la producción de ON de manera dependiente de la concentración, mostrando un efecto importante los metabolitos fúngicos intracelulares de las tres especies evaluadas, similar al de la indometacina. Este efecto fue semejante al reportado en extractos metanólicos del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* y *P. eryngii* (Taofiq *et al.*, 2015), pero fue mayor en comparación con estudios en otras especies de hongos como *Ganoderma lucidum*, un hongo medicinal muy conocido, donde el mayor efecto inhibitorio del extracto etanólico se observó a la concentración de 1 mg/mL en células microgliales BV2; y en otras especies

comestibles evaluadas a 0.5 mg/mL en macrófagos murino de la línea celular RAW 264.7 (Moro *et al.*, 2012).

En este estudio evaluamos también la secreción de IL-6 y TNF en los macrófagos estimulados con LPS, mostrando un mayor efecto inhibitorio en TNF por parte de los extractos de la biomasa de *Pleurotus*. Los extractos de *Pleurotus agaves* disminuyeron la secreción de IL-6 en comparación con *P. ostreatus* y *P. djamor*, teniendo un mayor efecto inhibitorio a la concentración de 12.5 µg/mL y 25 µg/mL en la biomasa y el medio agotado, respectivamente. Sin embargo, IL-6 puede adoptar un papel tanto pro-inflamatorio como antiinflamatorio al ejercer un control parcial sobre la producción de IL-1 y TNF. A diferencia de IL-6, las citocinas IL-1 y TNF poseen acciones pro-inflamatorias y juegan un papel importante en la iniciación y amplificación de procesos inflamatorios; son las responsables de producir las reacciones inflamatorias entre las que incluyen la fiebre y son de los blancos moleculares donde actúan los antiinflamatorios biológicos. Sus concentraciones elevadas se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, y por ello se consideran marcadores biológicos para determinar el estado fisiopatológico de enfermedades inflamatorias. Moro y colaboradores (2012) al evaluar la actividad antiinflamatoria de diferentes especies de hongos comestibles, entre ellas *Pleurotus ostreatus*, reportan que *Agaricus bisporus*, *Cantherellus cibarius* y *Lactarius deliciosus* inhibieron la expresión de mRNAs de IL-1β e IL-6 y la producción de NO en respuesta a la estimulación con LPS. Sin embargo, *P. ostreatus* no mostró un efecto en la disminución de NO y las citocinas TNF, IL-1β e IL-6. En contraste, los extractos de micelio y de cuerpo fructífero de *P. pulmonarius* inhibieron la producción de TNF, IL-6 y NO en macrófagos estimulados con LPS (Jedinak *et al.*, 2011).

Si bien la activación en los macrófagos tras la estimulación con LPS desencadena diversas vías de señalización intracelular, nuestros resultados demuestran que los extractos de *Pleurotus* podrían modular la respuesta inflamatoria en macrófagos activados por LPS a través de la supresión en la activación del factor nuclear kappa B, resultando en una disminución de la expresión de genes que codifican para la producción de estos mediadores pro-inflamatorios. Sin embargo, para confirmar esta premisa es necesario evaluar la expresión de los genes para estos mediadores inflamatorios. En este contexto, la inhibición en la producción de NO puede atribuirse por la desregulación de la expresión de iNOS por parte de los extractos en

los macrófagos. Este evento se ha evidenciado en diversos estudios *in vitro*, evaluando extractos de productos naturales, donde hay una relación directa en la inhibición de NF- κ B y la expresión de iNOS en macrófagos RAW 264.7, pues se sabe que la expresión de iNOS está regulada en parte por el factor de transcripción NF- κ B, el cual es activado por LPS u otros estímulos inflamatorios en macrófagos RAW 264.7 (Dudhgaonkar *et al.*, 2009; Moro *et al.*, 2012)).

A diferencia de nuestros resultados otros estudios han mostrado un aumento en la producción de interleucinas, TNF, y ON en modelos *in vitro* con macrófagos murino, mostrando un efecto inmunomodulador de los compuestos evaluados con activación de diversas células del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo. Sin embargo, al igual que en este trabajo, la mayoría de los estudios que evaluaron extractos de acetato de etilo o de compuestos aislados de hongos sobre el efecto antiinflamatorio han mostrado una disminución significativa en la producción y expresión de genes en ON, IL-1, IL-6, TNF, COX-1, COX-2 y PGE₂ (Lull *et al.*, 2005).

De igual forma extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de diferentes hongos han mostrado que inhiben la producción de mediadores pro-inflamatorios en macrófagos estimulados por LPS (Elsayed *et al.*, 2014). Por lo tanto, esto representa una variedad de compuestos que participan en la modulación del proceso inflamatorio. Al trabajar con extractos los efectos esperados pueden atribuirse a la acción de más de una molécula que lo constituye, resultando en un efecto potenciado. Cuando se desea caracterizar los componentes responsables del mecanismo de acción, al momento de obtener los compuestos aislados y evaluarlos nuevamente de forma independiente, el resultado puede tener dos vertientes 1) que los compuestos aislados mantengan la actividad biológica, donde el efecto puede ser potenciado en el compuesto aislado comparado con el extracto total o 2) que el efecto deseado se vea disminuido incluso se pierda, tratándose entonces de un efecto sinérgico o aditivo con otras moléculas.

No obstante los polisacáridos representan la mayor clase de compuestos bioactivos encontrados en hongos y especialmente su estudio farmacológico se ha enfocado al efecto inmunomodulador, pero también ha resultado interesante estudiar su efecto antiinflamatorio en diversos modelos biológicos. Por lo contrario, existen otros metabolitos en los hongos que también ejercen efectos biológicos interesantes pero no se ha mostrado profundo interés en su estudio como en los polisacáridos. La búsqueda de otros metabolitos con propiedades antiinflamatorias se ha incrementado en los

últimos años, evaluando diversas especies de hongos que incluyen en su mayoría especies comestibles (Moro *et al.*, 2012, Taofiq *et al.*, 2015). El interés en su estudio puede atribuirse a la baja presencia de compuestos tóxicos en comparación con otros hongos.

En este estudio se evaluó el extracto de *Pleurotus* spp. del cual los compuestos mayoritarios encontrados pertenecen a una familia de ácidos grasos poliinsaturados. Ésta clase de moléculas han mostrado tener efectos benéficos como antiinflamatorios, por ejemplo se ha mostrado que alivian la sintomatología de la inflamación en personas que padecen de artritis reumatoide (Arita *et al.*, 2005).

Dentro de la familia de los ácidos grasos poliinsaturados existen dos grupos: los ácidos grasos omega 3 y los ácidos grasos omega 6, donde a partir de los primeros derivan resolvinas y protectinas, moléculas que ejercen acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Por otro lado, a partir de la serie omega 6 se sintetizan 1) el ácido dihomogammalinólico, del cual derivan las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos de la serie 1, que poseen acción antiinflamatoria, anticoagulante y antivasoconstrictora; y 2) el ácido araquidónico del que derivan las prostaglandinas de la serie 2, y los tromboxanos y leucotrienos de la serie 4, que por el contrario ejercen funciones pro-inflamatorias, procoagulantes y vasoconstrictoras.

En este contexto, podríamos asumir que de acuerdo a los compuestos mayoritarios presentes en los extractos de acetato de etilo de *Pleurotus*, los ácidos grasos ejercen el efecto antiinflamatorio en los macrófagos al modificarse el sustrato para producir moléculas antiinflamatorias.

8.3. Análisis químico de los extractos de *Pleurotus*

El interés de este estudio fue obtener metabolitos de tipo estatinas y por tal motivo para la extracción de los metabolitos extracelulares e intracelulares se utilizó acetato de etilo, pues se ha reportado que este disolvente resulta eficiente para la extracción de este tipo de compuestos (Nieto Ramírez *et al.*, 2013). Debido a que en estos hongos las estatinas pueden existir tanto en su forma abierta hidroxil-ácida, así como en su forma lactona; en los cultivos sumergidos y para el caso de la lovastatina, se ha observado que la forma hidroxil-ácida se encuentra en mayor proporción en el caldo

fermentado. También se ha determinado que las extracciones desde medios acuosos son más eficientes a pH bajos (Alarcón y Águila, 2006); esto justifica el uso de soluciones ácidas en este paso.

Durante la extracción de los metabolitos extracelulares se tuvo el inconveniente de la formación de emulsiones en todos los casos. Casas-López (2004) reporta que durante la extracción de lovastatina en *Aspergillus terreus*, usando acetato de etilo como disolvente extractor se presentó la formación de emulsiones, y éstas junto con una miscibilidad parcial del acetato de etilo en agua, dieron lugar a bajos rendimientos y volúmenes finales de acetato de etilo ligeramente inferiores a los iniciales, y también pérdidas de volumen y rendimientos en la extracción de lovastatina.

De acuerdo a los análisis realizados de CCF se encontró que los extractos difieren en el contenido metabólico intra e interespecie, pero también poseen compuestos que se comparten tanto en la biomasa y el medio agotado. Entre estos encontramos la presencia de compuestos de baja y mediana polaridad como terpenos, ácidos grasos, saponinas y posibles iridoides. De los metabolitos extracelulares *P. ostreatus* y *P. djamor* presentan similar contenido metabólico en comparación con *P. agaves*. A diferencia de los metabolitos intracelulares donde *P. agaves* y *P. djamor* muestran mayores similitudes. Sin embargo, para determinar la presencia de los compuestos mayoritarios y de estatinas, de acuerdo a los espectros obtenidos de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el contenido metabólico de los extractos de acetato de etilo de las especies estudiadas, corresponde en su mayoría a moléculas de baja polaridad ácidos grasos, entre los que destacan el ácido linoleico y el ácido palmítico, los cuales pertenecen a una familia de ácidos grasos poliinsaturados, descartando la presencia de estatinas.

Los hongos comestibles producen diversos compuestos bioactivos como polisacáridos, proteoglucanos, terpenoides, compuestos fenólicos, esteroides y lectinas. De los metabolitos intracelulares y extracelulares que se han encontrado presentes en fermentaciones en cultivo líquido pertenecen a varios grupos funcionales orgánicos como ácidos, ésteres, aldehídos, alcoholes y fenoles, compuestos que son sintetizados a través de las vías metabólicas de los hongos y que no son en su totalidad extraídos del medio de cultivo (Schnürer *et al.*, 1999).

En particular, se reporta que en los extractos de acetato de etilo los principales componentes corresponden a moléculas de mediana polaridad como los terpenos, los cuales representan el grupo más grande de compuestos antiinflamatorios presentes en los productos naturales tanto en los hongos como en las plantas. De los compuestos presentes en extractos de hongos, se reportan que en su mayoría corresponden a etílicos derivados de ácidos grasos. Entre los principales se encuentran el palmitato de etilo, oleato de etilo, linoleato de etilo, estereato de etilo; compuestos que han sido previamente reportados ser sintetizados por los hongos y, principalmente su biosíntesis está más asociada con los micelios que con los medios agotados (Chegwin *et al.*, 2012).

Particularmente en *Pleurotus ostreatus*, se han aislado compuestos puros de la biomasa producto del proceso de fermentación sumergida en biorreactor; entre los compuestos actualmente elucidados corresponden a ácidos grasos, metabolitos fenólicos, nucleótidos y alcaloides (Lefki *et al.*, 2012). En las fracciones no polares se identificaron ácidos grasos y sus derivados, que corresponden al ácido oleico, ácido linoleico, ácido palmítico y sus correspondientes ésteres de metil. Para los hongos en general, y en particular del género *Pleurotus*, algunos autores mencionan que los ácidos grasos insaturados componen el 52 y el 87% de la composición grasa total y que el ácido oleico es el mayoritario (Kalac, 2009; Smiderle *et al.*, 2012).

De igual manera, en el grupo de trabajo del laboratorio de Micología se encontró en el extracto de acetato de etilo de *Pleurotus agaves* la presencia de dos compuestos mayoritarios identificados como ácido-n hexadecanoico o ácido palmítico y el ácido 9,12-octadecanoico o ácido linoleico. De acuerdo con los resultados obtenidos en ese estudio y en el nuestro, no se logró determinar la presencia de metabolitos de tipo estatinas tanto en el medio agotado como en la biomasa.

Las estatinas son sintetizadas como metabolitos secundarios de varios hongos filamentosos principalmente de hongos micromicetos, pero también se ha confirmado su presencia en especies de macromicetos como es el caso de *Pleurotus* (Osman *et al.*, 2011). Cabe mencionar que la producción de estatinas se asocia en diferente grado tanto al micelio como al medio extracelular y esto puede variar entre cepas incluso de la misma especie. Por ejemplo, Gunde-Cimermann (1993) mencionan que no separan el producto biotecnológico para hacer el estudio, mientras que Wasser y Reshetnikov (2002) mencionan que el metabolito no fue detectado en los filtrados del caldo de

fermentación después de separar el micelio. El-Shami y Hamed (2007) reportan la presencia de lovastatina en el caldo de cultivo; y Alarcón *et al.*, (2003) determinaron su presencia en los caldos filtrados pero no en el micelio obtenido.

Existen diversos factores que pueden asociarse a la ausencia del metabolito en las especies utilizadas en este estudio; ya sea a las condiciones de crecimiento de los hongos, que posiblemente el medio suplementado sea pobre en nutrientes, o bien a las diferencias entre las especies utilizadas creyendo que éstas especies no sean productoras del metabolito. Sin embargo, para ello será necesario dirigir los esfuerzos en modificar las condiciones de crecimiento de las especies en cultivo líquido para dirigir la producción de los metabolitos secundarios de particular interés, en este caso de estatinas.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo, los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* evaluados en la línea celular de macrófagos murino 264.7 estimulados con LPS, inhibieron la producción de diferentes mediadores biológicos que participan en el proceso inflamatorio como el óxido nítrico y las citocinas TNF e IL-6, efecto que se demostró está regulado en parte por el factor de transcripción NF-kB. Este efecto se atribuyó en parte a los ácidos grasos, los cuales son compuestos mayoritarios de metabolitos intracelulares y extracelulares presentes en los extractos de acetato de etilo. Por lo cual, las especies de *Pleurotus* son una fuente prometedora de compuestos con actividad antiinflamatoria.

Se logró cultivar en medio sumergido las especies *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* utilizando sustratos no convencionales para la producción de biomasa fúngica y de compuestos bioactivos.

El presente estudio aportó conocimiento de dos especies mexicanas estudiadas por primera vez en un enfoque farmacológico y biotecnológico, *Pleurotus djamor* y *P. agaves*, donde ésta última se realizó el cultivo micelial *in vitro* por primera vez.

10. PERSPECTIVAS

Realizar repeticiones de los ensayos de ELISA, TNF e IL-6, para realizar el análisis estadístico y corroborar nuestros resultados preliminares.

Realizar un estudio químico de los extractos de acetato de etilo, del cultivo sumergido de los hongos de *Pleurotus*, con la finalidad de evaluar sus compuestos aislados en el modelo de inflamación *in vitro*, y caracterizar los metabolitos con actividad antiinflamatoria. Además, determinar el mecanismo de acción de los compuestos que presenten actividad antiinflamatoria.

Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos y los compuestos aislados del cultivo sumergido en otros modelos biológicos, por ejemplo, en cultivos celulares primarios de humano o en un modelo *in vivo*.

Realizar un escalamiento del crecimiento micelial de las especies de *Pleurotus*, para incrementar la producción tanto de biomasa y de metabolitos funcionales.

Realizar un perfil químico de los extractos del cuerpo fructífero y del cultivo sumergido, de las especies mexicanas *Pleurotus djamor* y *P. agaves*, para comparar su contenido metabólico y determinar metabolitos con otros posibles efectos farmacológicos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Ajith, T. A., y Janardhanan, K.K. 2007. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 40: 157-162.

Alarcón, J., Águila, S., Arancibia-Ávila P, Fuentes, O, Zamorano-Ponce, E y Hernández, M. 2003. Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus*. Z. Naturforsch. 58c, 62-64.

Alarcón, J. y Águila, S. 2006. Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*. Effects of the C:N ratio. Z. Naturforsch. 95-98.

Almuti K., Rimawi R., Spevack D., Ostfeld R.J. 2006. Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. International Journal of Cardiology. 109 (1): 7-15.

Antonopoulos, A. S., Margaritis, M., Lee, R., Channon, K., Antoniades, C. 2012. Current Pharmaceutical Design, 2012. 18 (11): 1519-1530.

Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis N.A, Serhan CN. 2005. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med* 201: 713 - 722.

Athyros V.G., Kakafika A.I., Tziomalos K., Karagiannis A., Mikhailidis D.P. Pleiotropic effects of statins-clinical evidence. *Curr Pharm Des.* 2009 Jan;15(5):479-89.

Ayala Sánchez.N., Portillo López A., Villareal Gómez L., Rico Mora R., Soria Mercado I. 2016. Los hongos como fuente de recursos farmacológicos: *Ganoderma lucidum*; *Grifola frondosa*; y *Pleurotus ostreatus*. *Temas de Ciencia y Tecnología*, Vol. 20 (58): 25-36.

Badole, S. L., y S. L. Bodhankar. 2007. Interaction of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.-Champ with acarbose in alloxan induced diabetic mice.

Baskaran A., Heng Chua K., Sabaratnam V., Revishankar M., Rani K.U. 2017. *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H₂O₂ stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. 2017. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:40.

Calabrese, V., C. Cornelius, M. Cavallaro, M. Cambria, y M.A. Toscano. 2009. Medicine Clinical Journal of Mycology 3: 2-4.

Paul C., Roy T. and Das N. 2017. Potentiality of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) in medicine –A Review. *Ann Food Process Preserv.* 2(2): 1014.

Chang, S.T. 2008. Mushrooms as Functional Foods. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, Nueva Jersey, EUA.

Chang, S.T, & Wasser S.P. 2012. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14: 95-134.

Chen J.N., Mejia E.G., Wu J.S. 2011. Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) on the lipopolysaccharide – induced inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage. *J Agric. Chem.* 2011; 59: 7092-7097.

Chen S.Y., Ho K.J., Hsieh Y.J., Wang L.T., Mau J.L. Contents of lovastatin, gamma-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *Food Sci Technol.* 2012; 47 (2): 274-8.

Cheng S.M., Lai J.H., Yang S.P., et al. Modulation of human T cells signaling transduction by lovastatin. *Int. J. Cardiol.* 2010; 140(1): 2433.

Chegwin Angarita, C., Nieto-Ramírez, I.J., Atehortúa, L. y Sepúlveda A., J. 2012. Las estatinas: actividad biológica y producción biotecnológica. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. 14 (2): 157-178.

Choi, D., W. Cha, S. Kang, y B. Lee. 2004. Biotechnology and Bioprocess Engineering 9: 356-361.

Confortirn F.G., Marchetto R., Salvador M., Dillon A.J. 2008. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. 2008; 35 (10): 1149-55.

Dalonso, N., R. Souza, M. L. L. Silveira, A.A. Ruzza, T. M. Wagner, E. Wisbeck, and S.A. Furlan. 2009. *Applied Biochemical and Biotechnology* 160: 2265-2274.

- Demain, A. L., y S. Sánchez. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62:5–16.
- Devaraj S, Chan E, Jialal I. 2006. *J. Clin Endocrinol Metab.* 2006 Nov; 91(11):4489-96.
- El-Shami A.R., Hamed E.R. 2007. Production of lovastatin by *Pleurotus ostreatus*. *Egyptian Journal of Biotechnology*. 25: 102110.
- Elsayed A.E, Enshasy H., Wadaan M., Azis R. 2014. Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2014. pp 15.
- Fonarow G.C., Wright R.S., Spencer F.A., Fredrick P.D., Dong W., Every N., et al. 2005. *Am J Cardiol.* 2005 Sep 1; 96(5):611-6.
- Fujiwara N. & Kobayashi K. 2005. Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation & Allergy*, 2005, 4: 281-286.
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez, M., Mata, G. 2006. Manual práctico del cultivo de setas. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Ver., México. pp. 37
- Gern R.M., Wisbeck E., Rampinelli J.R., Ninow J.L., Furlan S.A. 2008. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresour Technol.* 2008 Jan; 99(1):76-82.
- Gómez Estrada H.A., González Ruiz K.N., Medina JD. 2011. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 10 (3): 182-217.
- Gómez-Velázquez, S. 2015. Caracterización morfodescriptiva y molecular del género *Pleurotus* en la zona norte del estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México.
- Gregori A., Svagelj M. and Pohleven J. 2007 Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp., *Food Technol. Biotechnol.* 2007; 45 (3): 238–249.

- Gricelda K. Guillén-Navarro, Facundo J. Márquez-Rocha y José E. Sanchez-Vázquez. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 1998; 15: 302-306.
- Goswami, S., Vidyarthi, A.S., Bhunia, B. y Mandal, T. 2012. *J. Biochem. Tech.* (2012) 4 (1): 581-587.
- Gunde-Cimerman N., Friedrich J., Cimerman A., Benicki N. 1993. *FEMS Microbiology Letters.* 111(2-3): 203-206.
- Gunde-Cimerman N., Cimerman, A. 1995. *Experimental Mycology.* 19 (1): 1-6.
- Guzmán, G. 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2: 95-123.
- Guzmán M., Zúñiga N., Santafé G., Torres O., Angulo A. 2009. Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en Córdoba. *Revista Biotecnología Agro.* Vol 7, No.2 .
- Horincar V.B., Popa A., Parfene G., Balaes T. 2014. Study of preliminary biotechnological conditions for *Pleurotus ostreatus* cultivation on submerged system. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, (2014) 15: 58–62.
- Huerta G., D. Martínez-Carrera, J. E. Sánchez, H. Leal-Lara y R. Vilgalys. 2010. Genetic relationships between Mexican species of *Pleurotus* analyzing the ITS-region from rDNA. *Micología Aplicada Internacional*, 22: 15-25.
- Jedinak A., dudhgaonkar S., Wu Q., Simon J., Silva D. 2011. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-kB and AP-1 signaling. *Nutrition Journal* 2011, 10:52.
- Jose, N., Ajith T.A. and Janardhanan K.K. 2004. Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytotherapy Research.* 2008; 18:43–46.
- Kalac P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry.* 113 (1): 9-16.

- Kanagasabapathy G., Malek S.N.A., Kuppusamy U.R., Vikineswary S. 2011. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (6): 2618-2626.
- Kim, J. H., S. J. Kim, H. R. Park, J. I. Choi¹, Y. C. Ju¹, K. C. Nam, S. J. Kim, and S. C. Lee. 2009. The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1016-1020
- Kowalewska M., Nowak R., Chechlinska M. 2010. *Biochimical et Biophysica Acta* 1806 (2010): 163-171.
- Labonte A.C., Tosello-Trampont A.C., Hahn Y.S. 2014. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Molecules and Cells* 2014; 37 (4): 275-285.
- Lizzerini P.E., Lorenzini S., Selvi E., Capecchi P.L., Chindamo D., Bisogno S., et al. 2007. *Clin Exp Rheumatol*. (2007) 25(5):696-700.
- Lavi I., Levinson D., Peri I., Tekoah Y., Hadar Y., Schwartz B. 2010. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1977-1990.
- Li W-M, Liu W, Gao C, Zhou B-G. 2006. *Immunol Cell Biol*. 2006 Jun; 84(3):274-80.
- Liao J.K, Laufs U. 2005. *Rev Pharmacol*. 2005 Aug; 45: 89-118.
- Lindequist U., Niedermeyer T.H. and Jülich W.D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2005; 2(3): 285-299.
- Liu G.Q., Han W.J., Zhang H.Y., Jin X.C. 2010. Polysaccharides extraction from submerged-cultured mycelium of *Grifola frondosa*. ICBBT 2010. *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology*, Art. No. 5478998. P. 11-114.
- Loppnow H., Zhang L., Buerke M., et al. 2011. Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J Cell Mol Med* 2011; 15(4): 994-1004.
- Mach F. Statins as immunomodulators. *Transpl Immunol*. 2002 May;9(2-4):197-200.

- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, P. Morales *et al.* 2004. Los hongos comestibles: propiedades nutricionales, medicinales, y su contribución a la alimentación mexicana. COLPOS-BUAP-UPAEP-IMINAP, Puebla.
- Martínez-Carrera, D. y J. Ramírez Juárez. 2016. Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México. Editorial del Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México. 856 pp.
- Menolli N., Asai T., Capelari M., Doretto L. 2010. Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. *Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal*, Vol. 53, 2: 397-408.
- Moro C., Palacios I., Lozano M., D'Arrigo M., Guillamón E., Villares A., Martínez J.A. y García-Lafuente A. 2012. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Food Chemistry* 130 (2012): 350-355.
- Mulder C.L., Mulinari F., Franco O.L., Soares S.F., Magalhaes B.S., Parachin N.S. Lovastatin production: from molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnology Advances* (2015) 33: 648-665.
- Mundo Ocampo E. Mariana. 2016. Efecto inmunomodulador de los frutos de *Physalis peruviana* y el caldo de cultivo de *Ganoderma subamboinense* en un modelo de hipertensión arterial. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos.
- Nieto-Ramírez, I. J., Chegwin-Angarita, C., Atehortúa, L., Sepúlveda, L. 2013. Las estatinas: química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Vol. 20 (1): 49-63.
- Nirogi R., Mudigonda K., Kandikere V. 2007. *J Pharm Biomed Anal.* 44 (2): 379-387.
- Nosál'ová V., Bobek P., Cerná S., Galbavý S., Stvrtina S. 2001. Effect of pleuran (-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiology Research.* 2001; 50: 575-581.

- Núñez Urquiza Verónica. 2017. Obtención de polisacáridos con actividad neuroprotectora en cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Okin D. y Medzhitov R. 2012. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol.* 2012 September 11; 22 (17): R733–R740.
- Oneissi Martínez F., Sica A., Mantovani A., Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience* 13, 453-461.
- Osman, M.E., Khattab, O.H., Zaghlol, G.M., Abd El-Hameed, R.M. 2011. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(6): 698-703, 2011.
- Papaspyridia L.M., Katapodis P., Gonou-Zagou Z., Kapsanaki-Gotsi E., Christakopoulos P. 2010. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochem. Eng. J.* 2010; 50 131-138.
- Pansuriya R.C., Singhal R.S. Supercritical fluid extraction of lovastatin from the wheat bran obtained after solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 2009; 47 (2): 159-65.
- Phipps R.P. and Blumberg N. 2009. Statin islands and PPAR ligands in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29(5): 620-1.
- Poucheret P., F. Fons and S. Rapior. 2006. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. *Cryptogamie, Mycologie* 27:1-23.
- Proudfoot AE, Power CA, Schwarz MK. 2010. Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2010; 19:345–355.
- Rezaie-Majd A., Maca T., Bucek R.A., et al. 2002. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22(7): 1194-9.

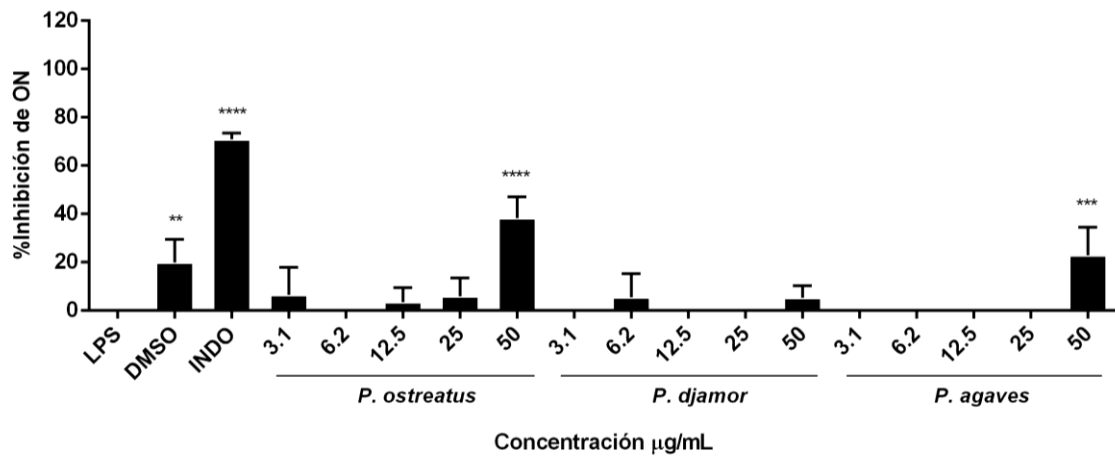
- Rizki M, Tamai Y. 2011. Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 27 1695-1702.
- Rodríguez Perea AL., Montoya Guarín CJ y Velilla Hernández PA. 2011. *Iatreia* Vol. 24 (3): 287-298, septiembre 2011.
- Rosado F.R., Germano S., Carbonero E.R., Da Costa S.M., Iacomini M, Kimmelmeier C. 2003. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. *J Basic Microbiol.* 2003; 43 (3):230-7.
- Sano M., Yoshino K., Matsuzawa T., Ikekawa T. 2001. Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy. *Int J. Med. Mush.* 2002; 4: 37-41.
- Sánchez J. E. y Royse D. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. 1ª. Edición. UTEHA: Noriega Editores. ECOSUR. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.
- Sassano A, Plataniás LC. 2008. *Cancer Lett.* 2008 Feb 18; 260(1-2): 11-9.
- Setty AR, Sigal LH. 2005. *Seminars Arthritis Rheum* 34: 773 – 784.
- Shi H, Chow BW, Chen CC, Wu JY, Hsieh C. 2008. Study of mycelia growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technol.* 2008; 99: 785-93.
- Smiderle F.R., Olsen L.M., Carbonero E.R., Baggio C.H., Freitas C.S., Marcon R. 2008. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3), (1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 597: 86-91.
- Smiderle F.R., Olsen L.M., Ruthers A.C., Czelusniak P.A., Santana Filho A.P., Sasaki G.I., Gorin P.A.J., Iacomini M. 2012. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. 87 (2012): 368-376.

- Stajic M., Persky L., Friesem D., Hadar Y., Wasser S.P., Nevo E., Vukojevic J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus species*. *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 65–73.
- Suárez A.C y Jeannette N.I. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2013; 30(1); 1-8.
- Taofiq O., Calhelha R.C., Heleno S., Barros L., Martins A., Santos-Buelga C., Queiroz M.J.R.P. y Ferreira I.C.F.R. 2015. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Journal of Food Research International*, 76 (2015): 821-827.
- Taofiq O., Martins A., Barreiro M.F., Ferreira I. 2016. Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends in Food Science & Technology*, 50 (2016): 193-210.
- Tello I., Romero O., Portugal D., León I., Mora V. M., Acosta-Urdapilleta L., Villegas E., Montiel E. 2012. Importancia del quehacer tradicional en el estudio de los hongos silvestres comestibles y medicinales del estado de Morelos, México. En: Las unidades productivas tradicionales frente a la fragmentación territorial. Universidad Autónoma del estado de Morelos (ed). Morelos México, pp. 95-110.
- Tello, I., Montiel E., Romero O., Nava E. y León I. 2016. Comparative micelial growth of *Pleurotus djamor* and *Pleurotus ostreatus* in culture media. *Journal of pure and applied microbiology*, 2016; 10 (4): 2563-2568.
- Tousoulis, D., Psarros, C., Demosthenous, M., Patel, R., Antoniadis, C., Stefanadis, C. 2014. Innate and adaptative inflammation as a therapeutic target in vascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 63(23): 2491-2505.
- Ungprasert P., Srivali N., Thongprayoon C. 2016. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of incident heart failure: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin. Cardiol.* 39, 2, 111-118.

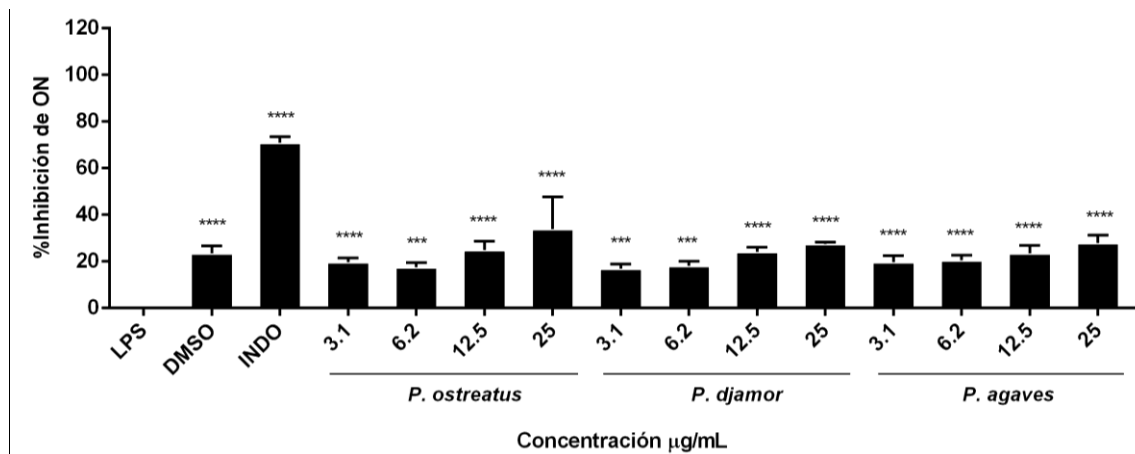
- Vamanu E. 2012. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. ID 565974.
- van de Veerdonk F.L., Lauweys B., DiPadova F., Marijnissen R.J., Koenders M.I., Gutierrez-Roelens I., Durez P., Netea M.G., van der Meer J.W.M., van den Berg W.B., Joosten L.A. 2009. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 response. *Cytokine*. 2009; 48:98.
- Varol C., Mildner A., Jung S. 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 2015, 33: 643-75.
- Veillard NR, Braunersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, et al. 2006. Atherosclerosis. 2006 Sep; 188(1):51-8.
- Wang J.C., Hu S.H., Liang Z.C., Yeh C.J. 2005. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 759–766.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258-274.
- Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Brinkmann V., Kamata T., Kallen J., Bruns C., et al. 2001. *Nat Med*. 2001 Jun; 7(6):687-92.
- Wu J.Z., Cheung P.C.K., Wong K.H., Huang N.L. 2003. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer-Part 1: Physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chem.* 81 (2003) 389–393.
- Wu C.Y., Mau J.L., Liang Z.C. 2008. The influence of cultivation conditions on mycelial growth and exopolysaccharide production of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus citrinopileatus* singer (Agaricomycetideae). *Int. J. Med. Mushrooms*. 2008; 10: 279-92.

- Zaidman, B. Z., M. Yassin, J. Mahajna, and S. P. Wasser. 2005. *Applied Biochemical and Biotechnology* 67: 453-468.
- Zeiser R, Maas K, Youssef S, Dürr C, Steinman L, Negrin RS. 2009. Regulation of different inflammatory diseases by impacting the mevalonate pathway. *Immunology*. 2009 May; 127(1):18-25.
- Zhang BB, Cheung PC. 2011. A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelia growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber regium*. *Bioresour Technol*. 2011; 102: 8323-6.

ANEXO 1

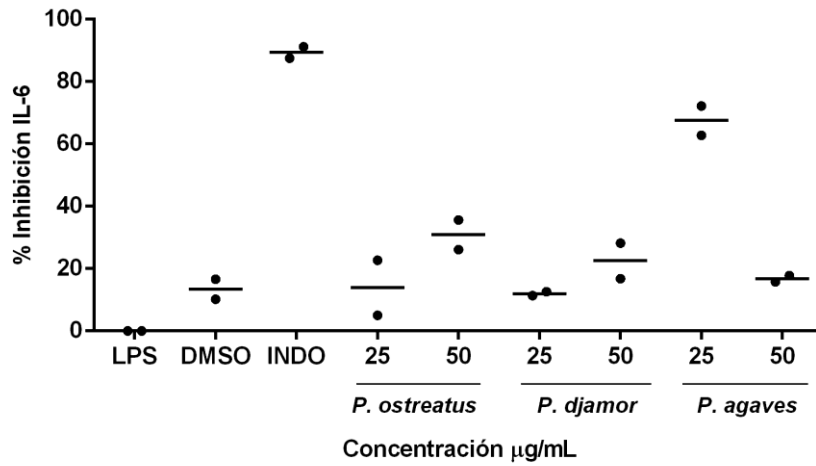


Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de ON. Macrófagos RAW 264.7 pretratados con los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, comparados con el LPS.

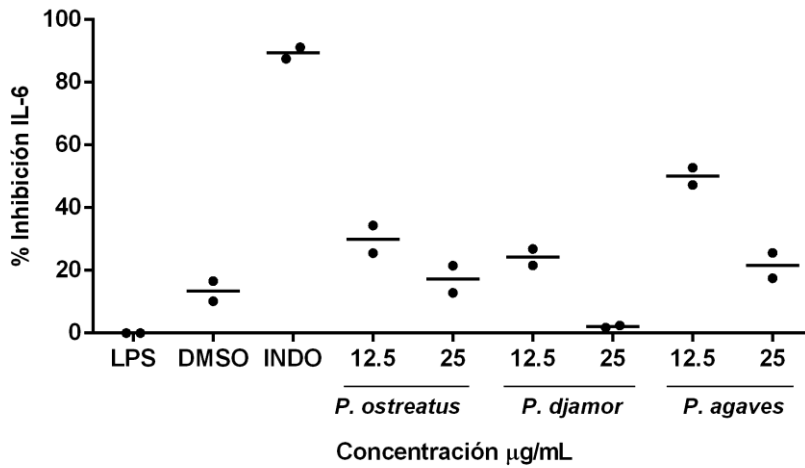


Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de ON. Macrófagos RAW 264.7 pretratados con los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, comparados con el LPS.

ANEXO 2

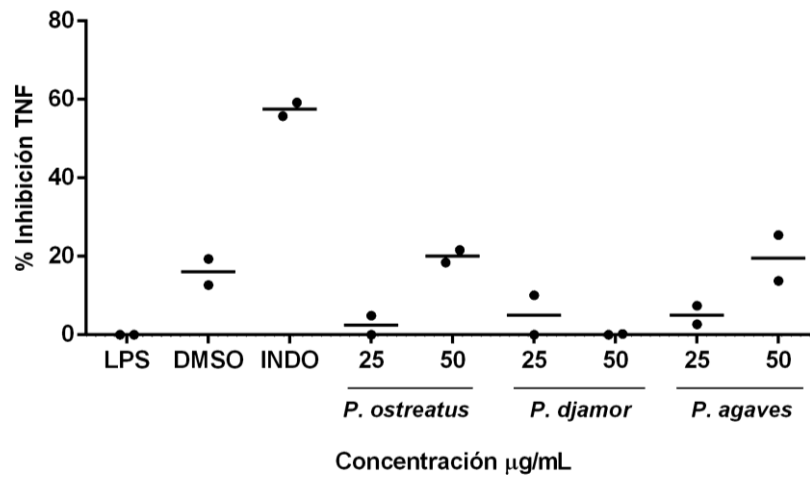


Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de IL-6. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

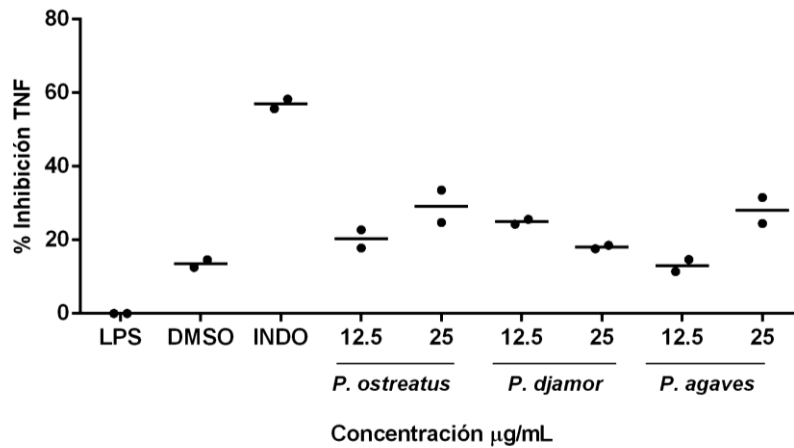


Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de IL-6. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

ANEXO 3

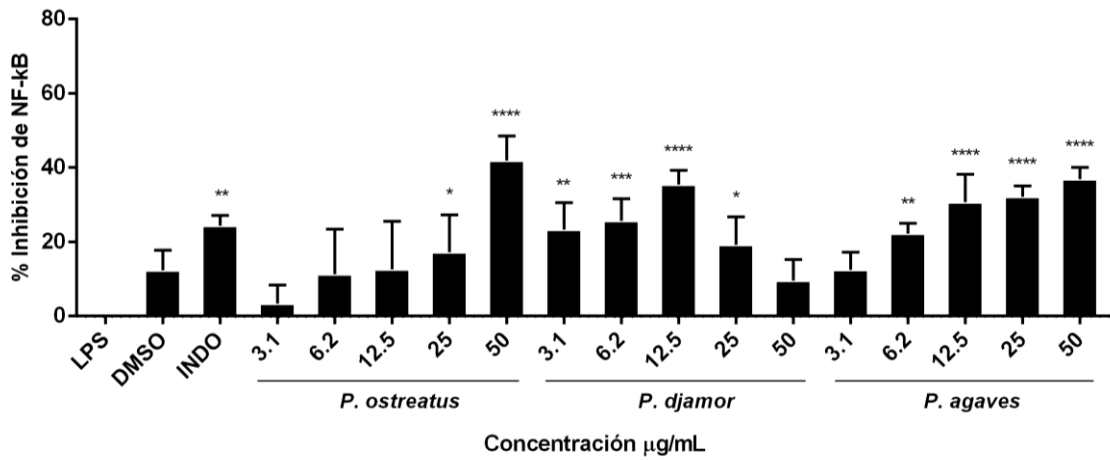


Efecto de los extractos del medio agotado en la producción de TNF. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 25 y 50 µg/mL). Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

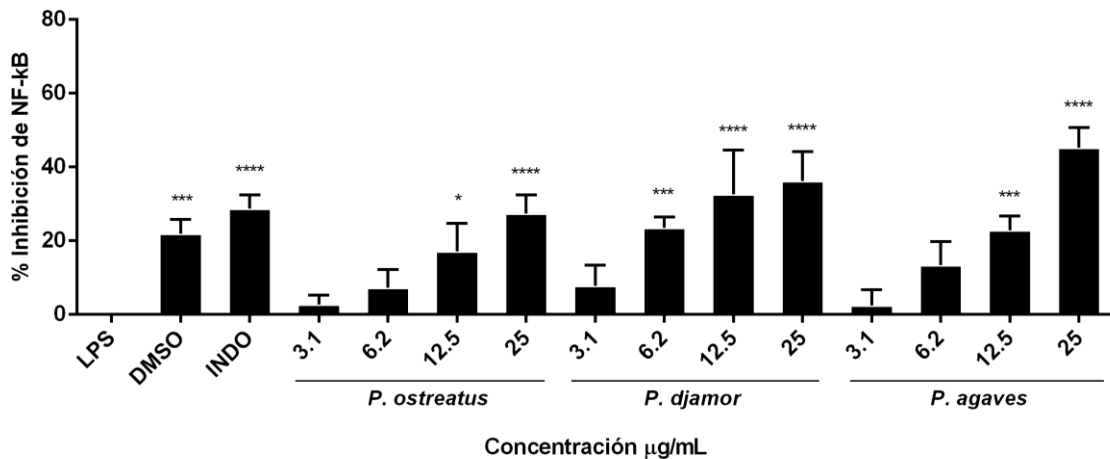


Efecto de los extractos de la biomasa en la producción de TNF. Macrófagos RAW 264.7 pre-tratados con los extractos de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a concentraciones de 25 y 50 µg/mL). Los gráficos representan la media de un ensayo por duplicado.

ANEXO 4



Efecto de los extractos del medio agotado en NF-kB. Macrófagos pre-tratados con *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a diferentes concentraciones (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, comparados con el grupo control (MOCK).



Efecto de los extractos de la biomasa en NF-kB. Macrófagos pre-tratados con *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* y *P. agaves* a diferentes concentraciones (3.1 a 50 µg/mL). Los gráficos representan la media ± DE, n=3. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, comparados con el grupo control (MOCK).