



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ACTIVIDAD ANTIEDEMA Y ESTUDIO QUÍMICO DE
LA HARINA SUBPRODUCTO DEL PROCESO DE
OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE CUERPOS
FRUCTÍFEROS DE CEPAS
DE *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A
SANDRA IBETH JUÁREZ SOLÍS**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR**

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dra. Angélica Cruz Solorio

VOCAL

Dr. Gustavo Valencia del Toro

SECRETARIO

Dra. María Eugenia Garín

SUPLENTE

Mtro. David Segura Cobos

SUPLENTE

Mtra. Irene Frutis Molina

AGRADECIMIENTOS

A la **FES Iztacala UNAM** por abrirme sus puertas, ya que en este lugar gane conocimientos, enseñanzas, amigos y profesores excelentes.

A mi directora de tesis la ***Dra. María Eugenia Garín Aguilar***, por todo el apoyo que me brindó en mi estancia en el laboratorio de Farmacobiología, por compartirme sus conocimientos, por enseñarme que con buena organización y perseverancia todo se puede lograr. Le agradezco por haber mostrado empatía conmigo cuando lo necesité, por todos los consejos que me brindó y me hicieron mejorar como persona y sobre todo por su paciencia.

Al Dr. Gustavo Valencia del Toro y la ***Dra. Angélica Cruz Solorio***, por su apoyo en el suministro de material requerido para este proyecto, por sus observaciones y aportaciones al trabajo, que complementaron el escrito.

Al ***Mtro. David Segura Cobos*** y la ***Mtra. Irene Frutis Molina***, por su tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus aportaciones y observaciones en este trabajo.

Un agradecimiento especial a la ***Dra. Beatriz Vázquez Cruz*** por sus aportaciones al escrito.

A mis compañeros de laboratorio: ***Héctor, Eli, Saori y Josué***, por todo el apoyo que me brindaron durante esta etapa, por hacer el trabajo más ameno y por siempre sacarme una sonrisa y a los demás chicos que en algún momento estuvieron en el laboratorio y tuve la fortuna de trabajar con ellos.

Por último, a mis ***sujetos experimentales***.

DEDICATORIAS

A mis padres **Francisco Juárez** y **Balbina Solís**, por siempre alentarme a seguir adelante, por darme los valores y enseñanzas que me han impulsado a ser la persona que soy; por madrugar conmigo y apoyarme a lo largo de la carrera, por darme ánimos y motivarme cuando estuve a punto de rendirme. No hay palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí, ni palabras para describir el amor que les tengo. A **mi abuelita**⁺ que fue un pilar en mi vida, que me dejó demasiadas enseñanzas que me han servido a lo largo de estos años, por haberme inculcado el amor a las plantas y a la naturaleza. Este logró también es suyo porque sin ustedes no hubiera sido posible. Éste es el primero de muchos.

A mi tía **Victorina Solís** por estar presente en cada momento de mi vida y ser de una de las personas que más me han apoyado, por siempre escuchar mis historias de todo lo que pasé en la universidad, por todas sus enseñanzas, por brindarme su amor, paciencia y confianza.

A mis amigos **Edith, Jenni, Ale, Shari, Enrique, Francisco (Coyote), Héctor, Carlos y Juan** por ser una parte importante de la carrera, ya que sin ustedes la universidad no hubiera sido lo mismo, gracias por haber estado en las buenas y en las malas, por todas las aventuras, los consejos, risas y lágrimas que pasamos juntos, por ser ese equipo con el que estudié y aprendí a hacer proyectos de investigación. Fue un gusto coincidir con ustedes y haber crecido juntos en estos años.

A Memphis

"Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay otros que luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay quienes luchan toda la vida, esos son imprescindibles"

Bertolt Brecht

ÍNDICE

RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN	1
II. INFLAMACIÓN	3
II.1 Edema no inflamatorio.....	4
II.2. Edema inflamatorio.....	4
II.3. Etapas del proceso inflamatorio.....	5
II.4. Inflamación aguda.....	7
II.5. Inflamación crónica.....	8
II.6. Mediadores de la inflamación.....	9
II.6.1. Mediadores vasoactivos.....	10
II.6.2. Mediadores celulares.....	11
II.7. Tratamiento para la inflamación.....	13
II.7.1. Antiinflamatorios esteroideos.....	13
II.7.2. Mecanismo de acción de los glucocorticoides.....	13
II.7.3. Antiinflamatorios no esteroideos.....	14
II.7.2. Mecanismo de acción de los AINEs.....	15
II.8. Efectos adversos de los antiinflamatorios.....	16
III. ANTECEDENTES	19
III.1. Antecedentes experimentales con el género <i>Pleurotus</i> u hongos comestibles.....	19
IV. JUSTIFICACIÓN	22
V. HIPÓTESIS	22
VI. OBJETIVO GENERAL	22
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	22
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VIII.1. Harinas fúngicas.....	23
VIII.2. Preparación de la harinas y obtención de los extractos.....	23
VIII.3. Animales.....	23
VIII.4. Inflamación aguda en ratones inducida con 12-O-tetradecanoil-forbol-13- acetato (TPA).....	23
VIII.5. Capacidad antioxidante con DPPH.....	26
VIII.6. Pruebas químicas.....	26
VIII.6.1. Detección cualitativa de metabolitos secundarios.....	26
VIII.6.2. Fenoles totales.....	27
VIII.6.3. Flavonoides totales.....	27
VIII.6.4. Cromatografía de alta resolución (HPLC).....	27
VIII.7. Análisis estadístico.....	27
IX. RESULTADOS	28
IX.1. Edema inducido con TPA.....	28
IX.2. Detección cualitativa de metabolitos secundarios.....	31
IX.3. Capacidad antioxidante con DPPH.....	32
IX.4. Fenoles y flavonoides totales.....	32
IX.5. Cromatografía de alta resolución (HPLC).....	33
IX. DISCUSIÓN	40

X.1. Edema inducido con TPA.....	40
X.2. Análisis preliminar fitoquímico.....	42
X.3. Capacidad antioxidante con DPPH.....	42
X.4. Fenoles y flavonoides totales.....	43
X.5. Cromatografía de alta resolución (HPLC).....	43
XI. CONCLUSIONES.....	47
XII. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO.....	47
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
XIV. ANEXO 1.....	56
XV. ANEXO 2.....	58
XVI. ANEXO 3.....	60
XVII. ANEXO 4.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Células y mediadores que participan en la reacción inflamatoria aguda.....	8
Figura 2.	Principales componentes de la inflamación crónica.....	9
Figura 3.	Mecanismos de acción de los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINEs).....	16
Figura 4.	Proceso para anestésiar a los sujetos experimentales con Pentobarbital sódico.....	24
Figura 5.	Aplicación tópica de los tratamientos.....	24
Figura 6.	Proceso de obtención de biopsias para ambas orejas.....	26
Figura 7.	Porcentaje de inflamación de las orejas de ratones con la aplicación del extracto metanólico de las harinas desengrasadas de las cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> PCM, POS (parentales) y PAPO (híbrido).....	29
Figura 8.	Capacidad antioxidante del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de la cepa parental POS de <i>Pleurotus ostreatus</i>	32
Figura 9.	Cromatogramas del análisis de HPLC para ácidos fenólicos del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de <i>P. ostreatus</i> : a). Extracto MeOH de la cepa POS, b). Extracto MeOH de la cepa PCM y c). Extracto MeOH de la cepa PCMxPOS.....	35
Figura 10.	Cromatogramas del análisis de HPLC para flavonoides del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de <i>P. ostreatus</i> : a). Extracto MeOH de la cepa POS, b). Extracto MeOH de la cepa PCM y c). Extracto MeOH de la cepa PCMxPOS.....	37
Figura 11.	Cromatogramas del análisis de HPLC para terpenoides del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de <i>P. ostreatus</i> : a). Extracto MeOH de la cepa POS, b). Extracto MeOH de la cepa PCM y c). Extracto MeOH de la cepa PCMxPOS.....	39
Figura 12.	Cuerpos fructíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i>	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Media \pm ESM del edema producido con los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas de cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> PCM (colección), POS (comercial) y PAPO (híbrido). Las letras corresponden a los cuatro grupos que se formaron en la prueba post hoc de Duncan, $p < 0.05$ y porcentajes de inhibición del edema.....	30
Cuadro 2.	Preliminar fitoquímico de los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas de cepas de <i>Pleurotus ostreatus</i> PCM (colección), POS (comercial) y PAPO (híbrido).....	31
Cuadro 3.	Cuantificación de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de las cepas parentales (PCM, POS) e híbrida (PAPO) de <i>P. ostreatus</i>	33
Cuadro 4.	Contenido de ácidos fenólicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de las cepas parentales e híbrida de <i>P. ostreatus</i>	34
Cuadro 5.	Concentraciones de Flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de las cepas parentales e híbrida de <i>P. ostreatus</i>	36
Cuadro 6.	Contenido de terpenoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de las cepas parentales e híbrida de <i>P. ostreatus</i>	38
Cuadro 7.	Mecanismo de acción de antioxidantes.....	56

ABREVIATURAS

LPS	Liposacáridos	TNF	Factor de necrosis tumoral
NO	Óxido nítrico	AA	Ácido araquidónico
PG	Prostaglandinas	FL	Fosfolipasa
COX	Ciclo oxigenasa	DAG	Diaciglicerol
IL	Interleucina	ERO	Especies reactivas de oxígeno
NPM	Neutrófilos polimorfo nucleares	PCR	Proteína C reactiva
TX	Tromboxano	FNkβ	Factor de transcripción nuclear
FAP	Factor activador de plaquetas	GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
MPO	Mieloperoxidasa	MEC	Matriz extracelular
CAT	Catalasa	SOD	Superóxido dismutasa
GP	Glutación peroxidasa	ACTH	Hormona adenocorticotrófica

RESUMEN

Pleurotus ostreatus, comúnmente llamado “hongo ostra,” es un hongo comestible ampliamente comercializado por su valor nutricional y se le ha usado en la obtención de proteínas, también se ha evidenciado que presenta actividad anticancerígena, antioxidante y antiinflamatoria (Kim *et al.*, 2009; Jedinak *et al.*, 2011; Nayan *et al.*, 2004). En este estudio se evaluó el potencial antiedema y capacidad antioxidante de los extractos de las harinas subproducto del proceso de obtención de proteínas de dos cepas parentales (PCM y POS) y una híbrida (PCMxPOS).

La actividad antiedema de los extractos de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de los cuerpos fructíferos de las cepas parentales e híbrida de *P. ostreatus*, se realizó induciendo el edema auricular con TPA, la administración de los extractos fue vía tópica en las concentraciones de 250, 750 y 1000 µg/oreja. La capacidad antioxidante de la cepa parental POS se evaluó mediante la reducción del radical DPPH. Se realizó un análisis preliminar fitoquímico para detectar los metabolitos presentes en el extracto, la cantidad de fenoles y flavonoides se determinó por los métodos de Singleton (1984) y de Dowd (1959) y para la caracterización química del extracto se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cepa parental POS en las dosis de 750 y 1000 µg/oreja inhibió el edema en un 36.4 y 34.9% respectivamente, mientras que la cepa parental PCM inhibió el edema un 33.7% en la dosis de 1000 µg/oreja. La cepa parental POS mostró un porcentaje de reducción de 46.36% y una IC₅₀ de 5.2 µg/µL. El análisis preliminar fitoquímico indicó la presencia de flavonoides (flavonas y xantonas), glicosidos cardíacos, cumarinas, quinonas, alcaloides, saponinas y azúcares reductores. La mayor concentración de fenoles la presentó la cepa híbrida PCMxPOS (10.92 mgEq ac. gálico/g de extracto) y la mayor concentración de flavonoides se mostró en la cepa parental POS (1.20 mgEq Quer/g de extracto). El HPLC evidenció la presencia de ácidos fenólicos como: gálico clorogénico, siríngico, vainillínico caféico, ferúlico y p-cumárico; así como de los flavonoides: naringerina y galangina y de los terpenos: ácido ursólico, stigmasterol, ácido oleanólico, α-amirina, carnosol y β-sitosterol. El efecto antiedema conservado en las harinas subproducto de las cepas PCM y POS parece estar relacionado con el contenido de fenoles, flavonoides y terpenoides presentes en el extracto.

Los resultados de este estudio proporcionan la evidencia experimental de la actividad antiedema de los extractos metanólicos de las harinas (desengrasadas y desproteinizadas), subproducto de la obtención de proteínas de las cepas parentales de *Pleurotus ostreatus* PCM y POS y de la capacidad antioxidante del extracto de la harina de la cepa (POS).

INTRODUCCIÓN

El proceso inflamatorio esta mediado por factores humorales y celulares, que puede ser desencadenado como una respuesta a una agresión patógena o por una agresión de naturaleza biológica, química, física o mecánica, la función de esta respuesta es reparar la lesión que fue ocasionada (García, 2008). Este proceso inflamatorio se caracteriza por la producción de mediadores inflamatorios, movimiento de líquido y de neutrófilos polimorfo nucleares (NPM) desde la sangre a los tejidos extravasculares (Collins, 2003). Debido a la activación de los monocitos y de NPM, se producen radicales libres, principalmente: especies reactivas de oxígeno (ERO), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO), mieloperoxidasa (MPO) y ácido hipocloroso (HOCl). Se ha comprobado que el incremento de las ERO está relacionado con la activación del factor de transcripción nuclear (FNkB) el cual es muy importante en la inflamación por la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX_2), óxido nítrico sintasa (iNOS) y las fosfolipasas 2 (FLA2) (Loguercio, 2003).

La respuesta inflamatoria es benéfica si es breve y si solo se localiza en el sitio dañado; por el contrario, se torna patogénica, si tiene una extensión prolongada y es la causa de distintas enfermedades metabólicas y degenerativas como: la artritis reumatoide, la aterosclerosis o la fibrosis pulmonar, además de las reacciones de hipersensibilidad que ponen en riesgo la vida frente a las picaduras de insectos, toxinas o fármacos (Kumar, 2010). De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía se calcula que, en México, más de 1 millón de personas padece Artritis Reumatoide y tres de cada cuatro personas que la presentan son mujeres. Otro dato de una enfermedad inflamatoria es la colitis y se calcula que el 30 % de la población padece esta afección y la población afectada principalmente son mujeres menores de 35 años (INEGI, 2010).

Para tratar la inflamación se emplean distintos fármacos, cuya función principal es aliviar el dolor y disminuir el proceso lesivo tisular (Payán y Katzung, 1996). Estos fármacos se clasifican en: antiinflamatorios esteroideos (corticoesteroides) y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), ejemplo de estos fármacos se encuentran la Dexametasona (corticoesteroide) y la Indometacina (AINE) (Florez, 2003). El uso prologando de los fármacos antiinflamatorios puede causar efectos nocivos para la

salud, debido a los efectos secundarios que se presentan; razón por la que grupos de investigadores han continuado con la búsqueda de nuevos compuestos para tratar este padecimiento. Un recurso principal se encuentra en las plantas medicinales, sin embargo, no es el único recurso a donde se pueden obtener estos metabolitos, también se encuentran en los hongos comestibles, se ha reportado que el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* se vende en las herbolarias como un hongo medicinal, el polvo o fragmentos de la fructificación seca se colocan en cápsulas, para tomarlas en té y se utilizan entre otros fines, para disminuir los dolores en la artritis y el reumatismo; además, en la farmacopea asiática se dice que tiene propiedades antitumorales (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

El género *Pleurotus* ha sido de gran interés como objeto de investigación, evaluando sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes destacando los estudios de Kim *et al.* (2009) y Lin *et al.* (2014) quienes evidenciaron dichas propiedades utilizando los extractos metanólicos de *P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus*, y *P. eryngii* respectivamente, al igual que Nayana (2004) donde administró el extracto metanólico *Pleurotus florida*. En otros estudios Zhang *et al.* (2012) utilizaron los polisacáridos obtenidos de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* y Jedinak *et al.* (2011) emplearon un liofilizado de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus*.

Respecto al mejoramiento genético de las especies del género *Pleurotus*, se encuentran los trabajos de Wang *et al.* (2018) donde se formaron 25 híbridos a partir de *P. tuoliensis*, e indicaron que la cepa híbrida C4 mostró mayor eficiencia biológica (67.56%), respecto a la cepa parental JZB2106013 (49.4%), por otro lado, Valencia *et al.* (2007) evaluaron la eficiencia biológica de cuatro cepas híbridas coloridas y dos cepas control de *Pleurotus*, concluyendo que la cepa híbrida más productiva fue (IE2012 x IE2021), con una eficiencia biológica de 109% además de presentar características morfológicas importantes. Ramírez *et al.* (2007) reportaron que 11 cepas híbridas de los géneros *Pleurotus* x *Lentinula*, presentaron eficiencias biológicas mayores a 100% (103 a 161%).

Los hongos del género *Pleurotus* representan una alternativa viable para obtener concentrados de proteína en una cantidad aceptable (Cruz *et al.*, 2014) en la obtención

de concentrados se generan subproductos que pueden ser sometidos a una caracterización química y a ensayos biológicos para poder conocer las propiedades que conservan.

Hasta el momento no hay estudios que evalúen experimentalmente los subproductos que se generan en la obtención de concentrados proteicos de los cuerpos fructíferos de cepas parentales e híbridas de *Pleurotus ostreatus* por lo que el objetivo de esta tesis fue:

Evaluar la actividad antiedema de los subproductos del proceso de obtención de proteínas de la harina de cuerpos fructíferos dos cepas parentales de *Pleurotus ostreatus* (PCM y POS) y su cepa híbrida PCMxPOS.

II. INFLAMACIÓN

La inflamación se considera una respuesta de los tejidos a estímulos nocivos de origen externo, provenientes de infección o de daños del propio tejido. Las funciones de la inflamación son proteger contra las infecciones, eliminar un patógeno y borrar los componentes del daño hístico, para así permitir la reparación del tejido. Esto se lleva a cabo gracias a un conjunto de células y de sustancias, denominados mediadores inflamatorios (Puente, 2005). En la inflamación hay una respuesta inmune innata y solo en determinados casos hay una respuesta inmune específica (González y Fariñas, 2004). Las células efectoras de la respuesta innata (células fagocíticas y neutrófilos) tienen la función de finalizar el proceso inflamatorio (Puente, 2005).

El proceso inflamatorio se caracteriza por cuatro signos fundamentales: rubor, tumefacción, calor y dolor; además de la pérdida de la función del área lesionada, que depende del sitio y la magnitud de la lesión (García de Lorenzo *et al.*, 2000).

El neutrófilo es el tipo de célula infiltrativa de los tejidos que predomina durante las etapas iniciales de la reacción inflamatoria. La infiltración de este leucocito llega a su máximo dentro de las primeras seis horas de que inicia el proceso inflamatorio, con una producción creciente de neutrófilos en la médula ósea. Estos dejan la médula ósea y circulan en la sangre y las células endoteliales vasculares aumentan su expresión de selectinas E y P en respuesta de los mediadores de la inflamación. La trombina y la

histamina inducen un aumento de la expresión de la selectina P, por su parte citocinas como IL-1 y TNF α inducen la expresión de la selectina R (Kindt, 2007).

Quimiocinas como IL-8 actúan sobre los neutrófilos y disparan una señal activadora mediada por la proteína G, que produce un cambio en las integrinas, cuyo resultado es la adhesión de los neutrófilos y como consecuente la migración transendotelial (Kindt, 2007).

Una vez en los tejidos, los neutrófilos activados expresan mayores concentraciones de receptores para los quimioatrayentes y por lo tanto migran corriente arriba por un gradiente de quimioatrayentes. Los mediadores inflamatorios que son quimiotácticos para los neutrófilos comprenden diversas quimiocinas, producto del desdoblamiento del complemento (C3a, C5a y C5b67), fibrinopéptidos, prostaglandinas y leucotrienos (Kindt, 2007).

Aunque la inflamación ayuda a eliminar las infecciones y otros estímulos nocivos, además de permitir la reparación; cuando es constante en un tejido es causa y consecuencia de diversas enfermedades metabólicas y degenerativas como: la artritis reumatoide, bronquitis, colitis entre otras (Kumar, 2010).

II.1. EDEMA NO INFLAMATORIO

Cuando el balance de las fuerzas que regulan el transporte de líquido se altera, el flujo dentro del comportamiento extravascular o la depuración a través del sistema linfático se interrumpen. El resultado de esto es la acumulación de líquido en el espacio intersticial (edema). Este exceso de líquido expande el espacio intersticial y entre los elementos de la MEC, produce una tumefacción hística; hay varias afecciones clínicas, específicas de sistemas o de órganos que se acompañan de un edema. La obstrucción del flujo venoso (trombosis) o la disminución de la función ventricular derecha (insuficiencia cardíaca congestiva) causan presión retrograda en la vasculatura y, por tanto, incrementa la presión hidrostática. Cualquier anomalía que implique retención de sodio o agua modifica la presión osmótica y el balance de las fuerzas que actúan sobre los líquidos (Murphy y Ward, 2006).

II. 2 EDEMA INFLAMATORIO

Entre las respuestas más tempranas a la lesión hística están las alteraciones en la anatomía y la función de la microvasculatura, las cuales pueden promover la acumulación de líquido en los tejidos, estos cambios patológicos son características de la clásica “triple respuesta” (Murphy y Ward, 2006).

Esta triple respuesta se puede explicarse por los siguientes eventos:

1. La vasoconstricción transitoria de las arteriolas en el espacio dañado que es la respuesta vascular inicial a la lesión leve de la piel.
2. La vasodilatación de las arteriolas precapilares, incrementa el flujo sanguíneo, es un fenómeno que se conoce como hiperemia. La vasodilatación responde a la liberación de mediadores específicos y explica el enrojecimiento y aumento de la temperatura en el lugar dañado.
3. Un incremento en la permeabilidad de la barrera celular endotelial lo que produce el edema. La pérdida de líquidos desde el comportamiento intravascular a medida que la sangre pasa a través de las vénulas capilares determinan la estasis local y el taponamiento con eritrocitos de los pequeños vasos dilatados. Estos cambios son reversibles después de una lesión leve, cuestión de minutos a horas, el líquido extravascular es recanalizado a través del sistema linfático.

En el caso de una lesión grave directa en el endotelio, como la que causan las quemaduras y las sustancias químicas, pueden concluir en un daño irreversible. En tales casos, el endotelio vascular se separa de la membrana basal, lo que da como resultado la formación de ampollas, esto deja áreas de membrana basal descubiertas e interrumpe la barrera entre los espacios intravasculares y extravasculares (Murphy y Ward, 2006).

II.3 ETAPAS DEL PROCESO INFLAMATORIO

Después de que ocurre un daño tisular, inmediatamente los vasos sanguíneos se dilatan esto se conoce como vasodilatación, bajo la influencia del NO, y de la histamina, lo que permite que el flujo sanguíneo se incremente y el lecho capilar se expanda (Kindt, 2007).

El aumento de la permeabilidad vascular condiciona la acumulación de líquido y componentes plasmáticos en los tejidos afectados por la inflamación. El intercambio de líquido entre los espacios intravasculares y extravasculares, constituyen un hecho normal, en el que el endotelio forma una barrera a la permeabilidad. La rotura de esta barrera es una característica de la inflamación aguda (Abbas *et al.*, 2007).

Los factores quimiotácticos reclutan a los neutrófilos desde el compartimiento vascular hacia el tejido lesionado, los neutrófilos intentan la eliminación de los patógenos por medio de la fagocitosis, además de que contienen sustancias químicas con actividad antibiótica, estas reciben el nombre de defensinas. Al continuar la respuesta inflamatoria los monocitos también se dirigen al área de lesión; una vez en ella se transforman en macrófagos que tienen actividad fagocítica. Los neutrófilos predominan en las etapas iniciales de la inflamación, pero después tienden a disminuir rápidamente y es a donde entran en acción los macrófagos, cuya actividad fagocítica es mayor que la de los neutrófilos, ya que tienen el tamaño suficiente para poder engullir el tejido lesionado, los neutrófilos muertos y los patógenos. La activación leucocitaria se caracteriza por la producción de metabolitos del ácido araquidónico (AA) debido al incremento de la actividad de la fosfolipasa 2 (FLA2) por diaciglicerol (DAG) y calcio, generación ERO y liberación del contenido lisosomal a causa de la lisis celular, lo cual conduce al daño celular y tisular (Abbas, 2007).

El proceso de fagocitosis consta de tres pasos: 1) reconocimiento, se basa en la opsonización, que consiste en recubrir a la partícula por alguna proteína sérica o la fijación a la membrana celular del fagocito de anticuerpos específicos para determinado antígeno. 2) Endocitosis, emisión de pseudópodos que rodean a la partícula y se fusionan entre sí, se forma una vesícula citoplasmática limitada por la membrana (fagosoma), la movilización de los lisosomas hasta que establezcan contacto con el fagosoma, la fusión de las membranas de ambos organelos con el derrame del contenido de los lisosomas en el interior del fagosoma y la degranulación de la célula; el resultado final puede ser la digestión parcial o completa de la partícula ingerida, si la partícula no es tóxica se conserva en el citoplasma y rara vez la partícula es expulsada al exterior (Sutterwalla, 2007).

El proceso final de la inflamación es la reparación del tejido; los fibroblastos del área se dividen y empiezan a secretar colágeno, el cual dota el área de gran fuerza de tensión. El resultado final puede ser la reparación completa, la formación de un absceso o la formación de un granuloma (Pérez, 2007).

Dependiendo de la persistencia de la lesión, de los signos clínicos y de la naturaleza de la respuesta inflamatoria se clasifican en dos tipos: inflamación aguda y crónica.

II. 4 INFLAMACIÓN AGUDA

La inflamación aguda es la respuesta inmediata que se produce frente al agente lesivo, es de duración breve y persiste desde unos minutos hasta varios días. Los procesos vasculares desempeñan un papel decisivo en el proceso de la inflamación aguda, ya que los leucocitos son transportados en la sangre. Se caracteriza por acumulación de líquido y componentes del plasma en el tejido dañado, estimulación intravascular de las plaquetas y presencia de neutrófilos. Una función de dicha respuesta es suministrar NPM en el sitio lesionado a donde ayudan a depurar la bacteria y también descomponer los tejidos necrosados, si se prolonga la inflamación, se puede inducir daño tisular mediante la liberación de enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos de oxígeno (Abbas, 2007).

Estímulos de la inflamación aguda

- Infecciones (bacterianas, víricas, parasitarias) y toxinas microbianas
- Traumatismos
- Agentes físicos y químicos (lesión térmica, lesión por congelación, irradiación, agentes químicos o ambientales)
- Necrosis tisular
- Cuerpos extraños (astillas, suciedad, suturas)
- Reacciones inmunitarias

La inflamación aguda presenta tres componentes principales: a) modificación y flujo en los vasos sanguíneos; b) salida de los leucocitos; y c) migración de los NPM desde que abandonan la microcirculación hasta el sitio de lesión en el que se acumulan. Estos componentes explican tres de los cinco signos fundamentales de la inflamación calor,

rubor y tumor; los otros signos ocurren como consecuencia de los otros mediadores y la migración leucocitaria en la respuesta inflamatoria, como se observa en la Figura 1 (Kindt, 2007).

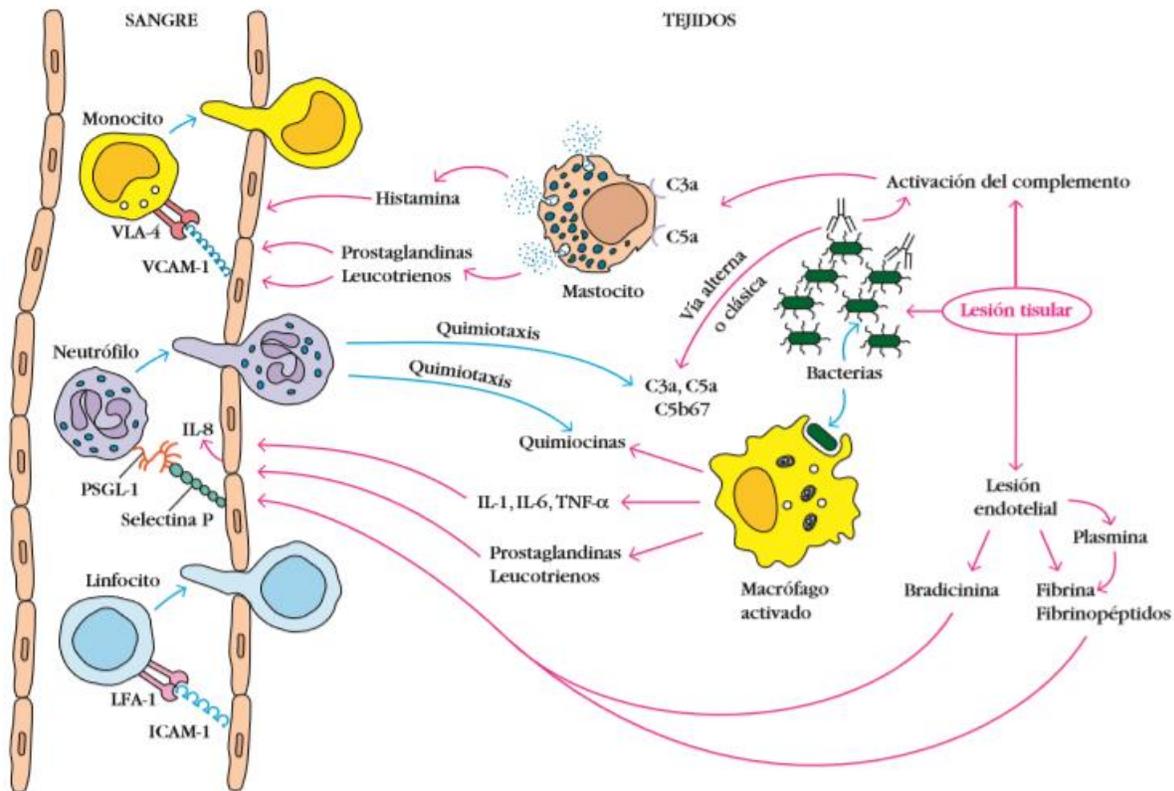


Figura 1. Células y mediadores que participan en la reacción inflamatoria aguda local (Tomada de Kindt, 2007).

II.5 INFLAMACIÓN CRÓNICA

Este tipo de inflamación es de duración prolongada semanas, meses, años y es la incapacidad de eliminar la agresión patógena o para poner fin a la respuesta inflamatoria, con la llegada continua de neutrófilos y la destrucción del tejido. La inflamación crónica se caracteriza por a) la acumulación y activación de macrófagos; b) destrucción de tejidos por células inflamatorias; c) la liberación de citocinas que estimulan la producción de fibroblastos y producción de colágena. Las células epiteloides dan la formación de un granuloma, que es una masa de tipo tumoral, con células multinucleadas por la fusión de macrófagos activados y linfocitos T, ver Figura 2 (Kindt, 2007).

La inflamación crónica es causa de diversas enfermedades metabólicas. Ejemplo de ello es, el síndrome metabólico en el que se ha propuesto, como parte de su definición, a los valores séricos de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), la interleucina-6 (IL-6) y al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Fainboim, 2005).

Inflamación crónica

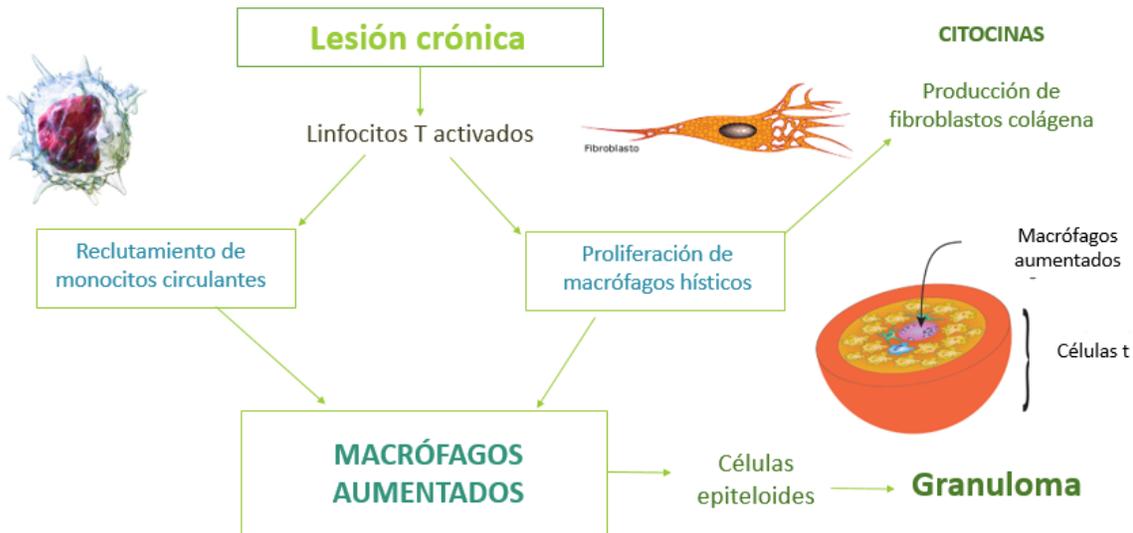


Figura 2. Principales componentes de la inflamación crónica (Modificada de Kindt, 2007).

Una diferencia entre la inflamación aguda y la crónica, es su resultado: en la inflamación aguda las lesiones celulares y tisulares son causadas por algún agente extraño con la participación mínima de los efectores endógenos dispuestos para su eliminación; mientras que, en la inflamación crónica, las células se acumulan en el tejido y provocan distintos tipos de lesión, en muchas enfermedades la inflamación crónica es el verdadero mecanismo patógeno (Pérez, 2007).

II. 6 MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

Muchos mediadores químicos son parte integral en la iniciación, amplificación y finalización del proceso inflamatorio. Los mediadores derivados de las células y el plasma actúan en la activación de las células al unirse a los receptores específicos, activando a las células, reclutándolas para lugares dañados y estimulando la liberación de mediadores solubles adicionales (Murphy y Ward, 2012).

El plasma contiene los elementos de tres cascadas enzimáticas principales, cada una compuesta de una serie de proteasas. La activación secuencial de las proteasas produce la liberación de mediadores químicos importantes. Estos sistemas interrelacionados incluyen 1) cascada de coagulación; 2) la generación de cinina; y 3) el sistema del complemento (Choyillas,2000).

II.6.1 Mediadores vasoactivos

La **histamina**, es una amina producida por basófilos y células cebadas, estimulan su liberación de la bradiquinina y las fracciones del complemento C3a y C5a. Como mediador químico del proceso inflamatorio estimula la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la adhesión leucocitaria (Choyillas, 2000).

La **serotonina**, se encuentra en las plaquetas, así como de los mastocitos de los roedores. Su liberación de las plaquetas se estimula cuando estas se agregan tras su contacto con el colágeno, la trombina, el adenosín difosfato (ADP) y los complejos antígeno-anticuerpo. Como mediador químico del proceso inflamatorio estimula la permeabilidad vascular (Choyillas, 2000).

La **bradicinina**, es un péptido que se produce a partir de dos proteínas que se sintetizan en el hígado. Como mediador químico de la inflamación estimula la vasodilatación, la permeabilidad vascular, la liberación de IL-1 y TNF por los macrófagos, síntesis de prostaglandinas y dolor (Murphy y Ward, 2012).

Las **prostaglandinas (PG)**, se producen a partir del AA, el cual es liberado de las membranas por la FLA₂. Se ha demostrado que la FLA₂ de tipo secretoria (FLA_{2s}), que es inducida, juega un papel importante en la inflamación. La expresión de esta enzima se incrementa con la activación de FNkB. Su principal efecto sobre la inflamación es incrementar la vasodilatación por la PGE₂ y la PGD (Beck, 2003).

El **factor activador de plaquetas (FAP)**, es un mediador bioactivo derivado de los fosfolípidos. Diversas células como plaquetas, basófilos, mastocitos, neutrófilos, monocitos- macrófagos y células endoteliales pueden elaborar FAP en forma extracelular e intracelular. Sus efectos en la inflamación son: vasodilatación potente y aumento de la permeabilidad (Choyillas, 2000).

El **óxido nítrico (NO)**, es un mediador pleiotrópico de la inflamación. Es sintetizado por las células endoteliales, macrófagos y grupos neuronales específicos del cerebro. El NO tiene un mecanismo de acción parácrino sobre las células dianas mediante la inducción de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) que, inicia una serie de acontecimientos intracelulares que dan lugar a una respuesta como la relajación de las células musculares lisas de la pared vascular. El NO desempeña un papel importante en la función vascular durante las respuestas inflamatorias y provoca, aumento de la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la quimiotaxis (Spitzer, 2002).

II.6.2 Mediadores celulares

Las plaquetas, basófilos, NPM, células endoteliales, monocitos/macrófagos, células cebadas, resultan en todos los casos fuentes celulares potenciales de mediadores vasoactivos. Las células inflamatorias y los tejidos dañados se metabolizan y se convierten en mediadores y reguladores homeostáticos de los derivados de los fosfolípidos y de los ácidos grasos liberados de las membranas plasmáticas. Como parte de una red reguladora, prostanoïdes, leucotrienos y lipoxinas, son derivados del ácido araquidónico, facilitan e inhiben la inflamación (Murphy y Ward, 2012).

El **ácido araquidónico**, se puede producir por dos posibles vías, una de ellas incluye la liberación del AA a partir del glicerol estructural de los fosfolípidos de la membrana celular (en especial fosfatidilcolina) por acción de la fosfolipasa A₂. La otra vía es el metabolismo del fosfato que pasa de fosfatidilinositol a diacilglicerol y fosfato de inositol por la fosfolipasa C. Entonces la lipasa de diacilglicerol separando al ácido araquidónico del diacilglicerol, una vez generado el ácido araquidónico se metaboliza de manera adicional a través de dos vías 1) ciclooxigenación, con producción de prostaglandinas y tromboxanos; y 2) lipooxigenación para formar leucotrienos y lipooxigenasas (Choyillas, 2000).

Las **ciclooxigenasas** 1 y 2 (COX-1 y COX-2), metabolizan de manera adicional el AA, de los cuales resultan los prostanoïdes. Casi todas las células expresan constitutivamente la COX₁, representa una enzima clave para la síntesis de prostaglandinas, las cuales a su vez: 1) protegen el revestimiento mucoso digestivo; 2) regulan el equilibrio hidroelectrolítico; 3) estimulan la agregación plaquetaria y 4)

mantiene la resistencia a la trombosis en las células de la superficie endotelial vascular. La expresión de COX₂ es por lo regular baja o indetectable, se incrementa sustancialmente bajo estímulos, tras la cual se originan metabolitos importantes en la inducción del dolor y de la inflamación (Murphy y Ward, 2012).

La respuesta **prostanoides** inflamatoria inicial depende de COX₁; las COX₂ ocupa su lugar como fuente principal de prostanoides a medida que la inflamación progresa. Ambas isoformas de COX producen prostaglandina H (PGH₂), la cual se convierte en sustrato para producir prostaciclina (PGI₂) PGD₂ PGE₂ PGF₂ y TX₂ (tromboxano). En la etapa en que actúa la COX se producen también radicales libres (OH y O₂), que pueden por sí mismos causar inflamación. Cuando por determinadas razones los procesos de oxidación que generan radicales libres en el organismo se incrementan o disminuyen las defensas antioxidantes, se produce lo que se conoce con el nombre de estrés oxidativo (Murphy y Ward, 2012).

Las **ERO** pueden ser liberadas al espacio extracelular por los leucocitos tras la exposición a agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o estimulación fagocitaria. Su producción depende de la activación del sistema oxidativo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y provocan aumento de la expresión de las citocinas, las quimiocinas (IL-8) y de las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial, lesión de las células endoteliales con el aumento de la permeabilidad vascular provocado por el aumento de la producción de superóxido y la inactivación de antiproteasas (Loguercio, 2003).

La interacción entre especies reactivas y ciertas enzimas aumenta el repertorio de oxidantes. La mieloperoxidasa (**MPO**) de neutrófilos produce ácido hipocloroso, a partir de peróxido de hidrógeno y anión cloruro. La MPO de eosinófilos produce ácido hipobromoso, ya que utiliza selectivamente el ion bromuro a pesar de su baja concentración plasmática. Estas especies reaccionan entre ellas produciendo nuevos compuestos: el ácido hipocloroso que reacciona con las aminas para dar lugar a diversas cloraminas, que poseen una vida media mayor y la reacción entre el ácido hipobromoso y el peróxido de hidrógeno genera oxígeno singlete (Horton, 2003). Se ha comprobado que el incremento de las **ERO** está relacionado con la activación del FNkβ

el cual es muy importante en la inflamación, ya que controla la transcripción de genes que codifican la expresión de IL-1, TNF- α , citocinas, proteínas de la fase aguda, factores de crecimiento, y la expresión COX₂, NOSi y FLA2s (Loguercio, 2003). La descripción detallada de cómo actúan los antioxidantes se encuentran en el Anexo 1.

II.7 TRATAMIENTO PARA LA INFLAMACIÓN

Para tratar la inflamación se emplean distintos fármacos, cuya función principal es aliviar el dolor y disminuir el proceso lesivo tisular (Payan y Katzung, 1996). Estos fármacos se clasifican en: antiinflamatorios esteroideos (corticoesteroides) y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

II.7.1 Antiinflamatorios esteroideos

Los glucocorticoides son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal esencial para la adaptación al estrés físico o emocional (Schimmer y Parker, 2006). En los seres humanos, el principal glucocorticoide es el cortisol que se sintetiza a partir del colesterol por las zonas fasciculada y reticular y se libera a la circulación bajo la influencia de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La secreción diaria de cortisol está controlada por el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA) (Aron *et al.*, 2007).

II.7.2 Mecanismo de acción de los glucocorticoides

A los glucocorticoides suelen atribuírseles dos mecanismos, uno genómico, lento, con latencia y persistencia del efecto por horas-meses, y otro no genómico, rápido, de inicio y persistencia fugaces. El primero se debe a proteínas modificadoras de la transcripción génica pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares; el segundo a moléculas diferentes poco caracterizadas (Buckingham, 2006).

Mecanismos genómicos: Los receptores clásicos son el glucocorticoide (GR) y el mineralocorticoide (MR), que muestran gran homología estructural pero diferente distribución tisular y afinidad por las drogas. El esteroide viaja a nivel plasmático acoplado a la globulina ligadora de cortisol (también a albumina y otras proteínas) una

vez que llega a los tejidos la fracción libre difunde a través de la membrana celular y se une al receptor de glucocorticoides. Una vez unido al receptor en el citoplasma se introduce al núcleo y dimeriza, activa el elemento de respuesta de los glucocorticoides y se desarrolla transcripción genética de diferentes factores (según tejido) parte de efectos inmunomodulares tienen que ver más con supresión de genes (Pascual *et al.*, 2005).

Los glucocorticoides tienen la propiedad de reducir de modo notable las manifestaciones de la inflamación, esto se debe a la reducción de la concentración, distribución y función de los leucocitos periféricos, así como la inhibición de la fosfolipasa A₂ (Figura 3) la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, producción de peróxido por los neutrófilos, eosinófilos e inmunoglobulinas desencadenando la apoptosis y disminuyendo los factores quimiotácticos como la IL-3 IL-5 (Jares y Piganataro, 2002). Causan vasoconstricción, lo que disminuye la permeabilidad capilar y la cantidad de histamina liberada por los basófilos (Ibáñez *et al.*, 2002). Los glucocorticoides reducen la expresión de la enzima ciclooxigenasa (COX), disminuyendo la cantidad de esta enzima para la producción de prostaglandinas, los glucocorticoides inhiben la expresión de COX₂ que es la enzima que participa en mayor medida en los efectos inflamatorios en los eicosonoides y estos glucocorticoides tienen un efecto menor sobre la expresión de COX₁. Los fármacos más empleados para tratar la inflamación son: Dexametasona, hidrocortisona, prednisolona y triamcinolona (López *et al.*, 2006).

Mecanismo no genómico: Los mecanismos no genómicos están caracterizados por el rápido inicio del efecto (menor a 15 minutos). Adicionalmente, pueden ser clasificados en mecanismos específicos (cuando los GC interactúan con el RG) y mecanismos inespecíficos (donde no hay interacción con el receptor). El mecanismo no genómico específico está medido por la vía clásica de interacción GCRG, mientras que el inespecífico se debe a la interacción directa de los glucocorticoides con la membrana celular, que se explica debido a las características lipofílicas de los GC, que hacen que se disuelvan en la membrana celular lipídica y modifiquen las propiedades físico-

químicas de ésta, afectando la actividad de las proteínas asociadas a la membrana (Jares, 2002).

II. 7.3 Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de agentes de estructura química diferente entre sí, que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (Crofford, 2005). Su principal uso es en el tratamiento leve del dolor, por ejemplo, en cefaleas, control del dolor, rigidez en los estados reumáticos y osteoartritis (Ivorra *et al.*, 2005). Una de las acciones de las prostaglandinas está relacionada con la producción de estímulos dolorosos y también son responsables de algunas de las características de la inflamación (tumefacción y enrojecimiento); los AINEs al bloquear la acción de la COX, reduce la producción de estas sustancias como las prostaglandinas, la acción de estos medicamentos es prolongada en los tejidos periféricos más que en el cerebro. Los fármacos de este tipo más empleados son: el ácido acetilsalicílico (aspirina), paracetamol, ácido mefenámico y la indometacina (Florez, 2003).

II.7.4 Mecanismo de acción de los AINEs

Los AINEs tienen múltiples efectos centrales y periféricos, su efectividad se basa en la inhibición de la COX, como consecuencia de esto, se inhibe la formación de PG particularmente PGE y PGL a partir del AA membranario de distintos tipos celulares (Figura 3) (Kindt, 2007). Las enzimas COX son bifuncionales, de modo que presentan dos actividades catalíticas diferentes. En la primera de ellas, la actividad dioxigenasa incorpora dos moléculas a la cadena de ácido araquidónico en C11 y C15, lo que da lugar al endoperóxido. Una segunda actividad peroxidasa de la enzima convierte a este intermediario en PGH₂ con un grupo hidroxilo en C15, que es transformado por una isomerasa, reductasa o una sintasa de manera específica para cada tipo celular en otros prostanoides (Rang y Dale, 2008).

Tanto como COX₁ como COX₂ contiene grupos hemo que forman homodímeros en las membranas intracelulares. Desde el punto de vista estructural, ambas isoformas son semejantes, ya que poseen un canal hidrófobo al que se anclan en el ácido

araquidónico y otros ácidos grasos para comenzar la reacción de oxigenación. La mayoría de los AINEs inhiben solamente la reacción inicial de dioxigenación. Normalmente actúan como inhibidores competitivos reversibles, por lo general estos fármacos inhiben rápidamente la enzima COX₁, la COX₂ su inhibición depende a mayor medida del tiempo. Los AINEs para inhibir estas enzimas entran en el canal hidrófobo y forman enlaces de hidrogeno con un residuo de arginina, lo que impide el acceso de los ácidos grasos que actúan como sustrato en el dominio catalítico (Rang y Dale, 2008).

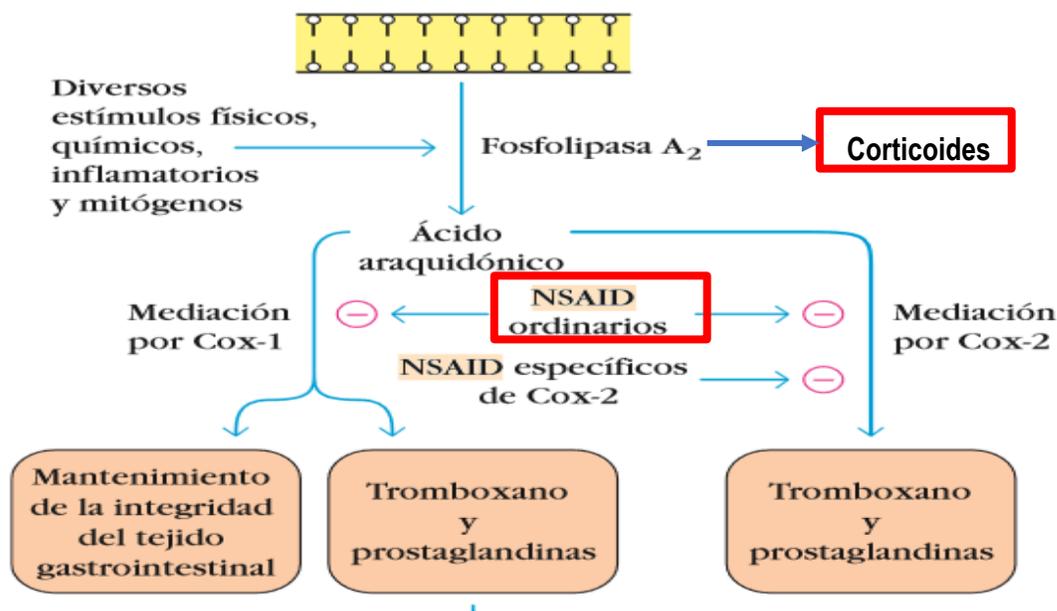


Figura 3. Mecanismos de acción de los antiinflamatorios esteroides y no esteroides (AINEs) (Modificada de Kindt, 2007).

Otro mecanismo con el que actúan los AINEs es inhibir la adherencia de los neutrófilos en el endotelio, como consecuencia de esta interferencia es la inhibición de la quimiotaxis y de la agregación de este tipo celular. Además, estos fármacos inhiben indirectamente la liberación de las mismas a través de su acción sobre TNF α (Kassian, 2002).

II. 8 EFECTOS ADVERSOS DE LOS ANTIINFLAMATORIOS

El uso prolongado de los fármacos antiinflamatorios puede causar efectos nocivos para la salud. En el caso de los AINEs uno de los órganos diana donde pueden asentar

estos efectos adversos es en el aparato digestivo. Estos efectos se relacionan con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal por la inhibición de COX-1 ya que juegan un papel importante en la protección de la mucosa gástrica, pues limitan la secreción ácida gástrica y estimulan la formación de moco. Los AINEs además de producir lesión local, reducen el flujo sanguíneo y dificultan el funcionamiento de las defensas en la mucosa del tubo digestivo. Los efectos secundarios gastrointestinales más frecuentes son: esofagitis, úlceras (siendo sus complicaciones más frecuentes hemorragia y perforación), gastroduodenitis, lesiones tóxicas y diarrea (Rang y Dale, 2008). Mientras los inflamatorios esteroideos tienen como efectos secundarios la insuficiencia adrenal aguda, puede provocar infecciones más graves ya que deprime al sistema inmunológico, dañan al tejido conjuntivo, provocan osteoporosis, ya que produce descalcificación de los huesos, disminuye la absorción de calcio renal y en los niños puede provocar retardo en el crecimiento (Ibáñez *et al.*, 2002).

Debido a los efectos adversos de estos antiinflamatorios, grupos de investigadores se han dedicado a buscar nuevos compuestos para poder tratar este padecimiento y se han interesado en el estudio de los hongos comestibles, ya que tienen un gran valor nutricional porque son ricos en carbohidratos, proteínas y lípidos, además que poseen otras biomoléculas como terpenoides, alcaloides, flavonoides y ácidos fenólicos a los que se le han reportado actividad biológica (De Silva *et al.*, 2013). Un ejemplo de esto es *Lentinula edodes* que en la medicina tradicional oriental lo usan como estimulante antitumoral y para controlar la presión baja (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Otro hongo comestible de interés son las especies del género *Pleurotus* que han sido utilizadas por sus propiedades culinarias y medicinales por diferentes civilizaciones alrededor del mundo; en México *P. ostreatus* se vende en las herbolarias como un hongo medicinal; el polvo o fragmentos de la fructificación seca se colocan en cápsulas, para tomarlas en té y se utilizan para disminuir los dolores en la artritis, el reumatismo y disminuir la inflamación intestinal; además, en la farmacopea asiática se dice que tiene propiedades antitumorales (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Otras propiedades medicinales conocidas de *P. ostreatus* está en generar

retardo en el crecimiento de tumores, disminuir los niveles de colesterol en la sangre, poseer sustancias antioxidantes e inmunomoduladoras (Sarangi, 2006). En el Anexo 2 se encuentra la descripción detallada de la especie *P. ostreatus*.

Los hongos del género *Pleurotus* representan una alternativa viable para obtener concentrados de proteína en una cantidad aceptable (Cruz *et al.*, 2014) en la obtención de dichos concentrados se generan subproductos que pueden ser sometidos a una caracterización química y a ensayos biológicos para poder conocer las propiedades que conservan.

Se ha recurrido al mejoramiento genético para incrementar la producción, la calidad, el sabor y las características fenotípicas de estas setas, además de sus propiedades alimenticias (Labarére, 1994). La hibridación, es uno de estos procedimientos de mejoramiento por el cual algunas características genéticas presentes en diferentes cepas pueden ser combinadas, por lo tanto, permite la posibilidad de obtener nuevas cepas y/o variedades con características mejoradas (Martínez *et al.* 2000).

III. ANTECEDENTES

III.1 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES CON EL GÉNERO *Pleurotus*

Diversos grupos de investigación alrededor del mundo han mostrado interés en los hongos comestibles en especial en las especies del género *Pleurotus* para poder evaluar su actividad biológica. A continuación, se presentan estudios que muestran hallazgos sobre la actividad antiinflamatoria de estas especies.

En el 2011 Jedinak *et al.* usaron el sobrenadante de hongos frescos liofilizados y molidos de *Pleurotus ostreatus*, para evaluar la actividad antiinflamatoria en diferentes modelos *in vitro*, tales como, la expresión de mediadores pro inflamatorios en células RAW264.7, estimulados con LPS, así como la producción citocinas. Los resultados mostraron que el liofilizado de *P. ostreatus* tenía actividad antiinflamatoria, ya que suprimió la secreción del factor de necrosis tumoral inducida por LPS e inhibió la producción de prostaglandinas E2 (PGE2) inducida por LPS y óxido nítrico (NO) a través de la regulación de la expresión de COX₂.

Rivero *et al.* (2016) evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* cultivados en diferentes sustratos enriquecidos con plantas medicinales, en el modelo de edema auricular inducido con TPA. Los resultados mostraron que el extracto acuoso de *P. ostreatus* que fue cultivado solo con paja presentó un porcentaje de inhibición del edema de un 43.5% ± 6.6.

En el 2017 Souilem *et al.* evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico del micelio de una cepa silvestre de *P. eryngii* en el modelo de estimulación de macrófagos con LPS para la liberación de NO. Los compuestos fenólicos (ácido hidroxibenzoico, p-cumarico, cinámico) y el ergosterol presentes en el extracto metanólico, suprimieron la producción de NO en células RAW264.7. En ese mismo año, Baskran *et al.* usaron el extracto etanólico de *P. giganteus*, para evaluar la actividad antiinflamatoria, en diferentes modelos *in vitro* tales como, la expresión de mediadores pro inflamatorios en células RAW264.7 y la estimulación de células con LPS. El extracto de *P. giganteus* mostró una reducción en la producción de NO, además de suprimir la expresión iNOS y de COX₂ cuando las células fueron estimuladas con LPS.

Qiuhui *et al.* (2018) evaluaron la actividad del extracto acetónico de *P. eryngii* en el método de Griess que trata sobre la producción de NO en células RAW264.7 inducidas por LPS. Los polifenoles (ácido gálico, siríngico, elágico, catequina, monohidrato propanpico y galato de metilo) presentes en el extracto acetónico de *P. eryngii*, inhibieron la sobreproducción de mediadores pro inflamatorios, incluyendo NO y las ROS en macrófagos, además de que se demostró que el extracto está asociado con la inhibición de la expresión de iNOS y la inhibición de la expresión del ARNm de NF-κB.

Empleando el método de estimulación de macrófagos con LPS Vetvicka *et al.* (2018) demostraron que el liofilizado de extracto de glucanos y β-glucanos de *P. eryngii*, mostró actividad antiinflamatoria, ya que hubo una reducción significativa (~50%) de la secreción de TNF-α cuando se agregó el extracto a una concentración de 0.000025% después de 4 horas de la inducción del LPS.

Zhang *et al.* (2012) aislaron un polisacárido de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (PSPO) y obtuvieron fracciones de este (PSPO-1a y PSPO-4), evaluaron la actividad antioxidante con tres tipos de radicales: anión superóxido, hidroxilo y radicales DPPH. Los resultados indicaron que las fracciones PSPO-1a redujo el radical DPPH un $62.5 \pm 1.03\%$ y la fracción PSPO-4 un $54.9 \pm 0.8\%$ ambas a una concentración de 2.1 mg/mL, y con una IC₅₀ de 1.43 y $2.3 \pm$ mg/mL respectivamente.

Sulistiany *et al.* (2016) evaluaron la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de los cuerpos fructíferos y los micelios de una cepa silvestre de *Pleurotus* empleando el método de DPPH, además de la cuantificación de fenoles totales. Los resultados muestran que en los extractos de los cuerpos fructíferos tenían una mayor actividad de captación del radical DPPH que los extractos a partir de los micelios, encontrándose en un intervalo entre 49.31% y 77.82%. El IC₅₀ de los extractos de los cuerpos fructíferos y del micelio fue de 0.45 ± 0.04 y 2.76 ± 0.36 mg/mL respectivamente. El extracto metanólico de los cuerpos fructíferos presentó la mayor cantidad de fenoles totales (4.62 ± 0.08 mgGAE/gramo de extracto) en comparación al del micelio (2.02 ± 0.02 mgGAE/gramo de extracto). La capacidad antioxidante del extracto es atribuida a los fenoles presentes. En otra investigación Gaoxing *et al.* (2016) obtuvieron fracciones de polisacáridos de *Pleurotus eryngii* mediante ultrafiltración (CPPS-1 y CPPS-2) y

demonstraron su capacidad antioxidante, a una dosis de 4000µg/mL CPPS-1 presentó la mayor actividad (65.60 ±0.87%) y para CPPS-2 fue de 39.50±1.91%%

En el 2017 Yanan *et al.* aislaron un polipéptido del micelio de *Pleurotus eryngii* (PEMP) con actividad antitumoral y antioxidante, además de las propiedades inmunológicas, con respecto a la actividad antioxidante, el PEMP logró eliminar el radical de DPPH al incrementar su concentración, la mayor captación del radical fue de 60%. Estos resultados sugieren que contiene sustancias que pueden reaccionar con los radicales libres para convertirlos en moléculas diamagnéticas estables.

Respecto a la obtención de concentrados proteicos (CP) de *P. ostreatus* se encuentra el trabajo de Cruz *et al.* (2014), donde obtuvieron estos CP a partir de los cuerpos fructíferos de dos cepas parentales de *P. ostreatus* (PCM y POS) y del híbrido (PCM x POS). Realizaron un análisis químico de las harinas y los CP y determinaron la cantidad de proteínas solubles en función del pH. El contenido de proteínas en las tres cepas aumentó dos veces en el concentrado de proteínas en un intervalo de 48.56 a 49.94% de proteína. La mayor solubilidad de la proteína de los cuerpos fructíferos y concentrados proteicos se encontró a pH=12 (0.20-0.24 y 2.25-2.68 g/L respectivamente). Era de esperarse que la mayor concentración de proteína soluble se encontrara en los concentrados proteicos que en los cuerpos fructíferos.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los estudios descritos anteriormente reportan de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de extractos de las harinas de los carpóforos de algunas especies del género *Pleurotus* dichas actividades biológicas son atribuidas a la presencia de numerosos compuestos activos. Sin embargo, existen pocos estudios utilizando extractos de cepas híbridas del género *Pleurotus*. Por lo que es importante investigar si el mejoramiento genético de estas cepas híbridas, también ocurre en sus propiedades terapéuticas. Del mismo modo, es importante evaluar los subproductos que se generan en el proceso de obtención de concentrados proteicos de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* para conocer qué propiedades biológicas conservan.

V. HIPÓTESIS

Si la **hibridación** ha mejorado las características comerciales y la eficiencia biológica de las cepas parentales de *Pleurotus ostreatus*, se esperaría que la harina obtenida como subproducto del proceso de obtención de concentrados proteicos a partir de cepas híbridas, también mejore su actividad biológica.

VI. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antiedema de los extractos obtenidos de los subproductos del proceso de obtención de proteínas de los cuerpos fructíferos de dos cepas parentales de *Pleurotus ostreatus* (PCM y POS) y su cepa híbrida PCMxPOS.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el extracto metanólico de las harinas obtenidas a partir del cuerpo fructíferos de las cepas de *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar la actividad antiedema del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteïnizada de las cepas de *Pleurotus ostreatus* usando el modelo de edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA).
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto metanólico de harina desengrasada y desproteïnizada de la cepa de *Pleurotus ostreatus* que presente mayor actividad antiedema.
- Determinar por HPLC el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteïnizada de *Pleurotus ostreatus*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1 Harinas fúngicas

La harina desengrasada y desproteinizada de las cepas parentales PCM y POS y el híbrido PCMxPOS de *Pleurotus ostreatus* que se utilizó en este estudio, fue donada por el Dr. Gustavo Valencia responsable del Laboratorio de Cultivos Celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional.

VIII.2 Preparación de las harinas y obtención de los extractos

La harina se desengrasó con hexano en una proporción 1:5 (p/v), manteniéndola en agitación continua a temperatura ambiente, por un período de 8 horas para después filtrarla. La harina desengrasada se procesó para la precipitación de proteínas. Obtenido el concentrado proteico, la harina subproducto se sometió a extracción con metanol a temperatura ambiente y agitación, haciendo cambios de disolvente cada tres días, durante dos semanas. Posteriormente, el exceso de disolvente se retiró por presión reducida y los extractos metanólicos permanecieron en refrigeración hasta su uso en el ensayo biológico.

VIII.3 Animales

Se emplearon ratones macho CD1 (25-35 g) que fueron obtenidos del Bioterio de la FES Iztacala UNAM. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico transparente dentro del laboratorio L-514 de la Facultad, bajo condiciones controladas de temperatura de 22 °C ± 3, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y agua y alimento *ad libitum*.

VIII.4 Inflamación aguda en ratones inducida con 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)

Los sujetos fueron pesados y distribuidos al azar en grupos independientes (n=5-7). Cada uno fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 31.5 mg/kg por vía intraperitoneal (Figura 4).



Figura 4. Proceso para anestesiarse a los sujetos experimentales con Pentobarbital sódico.

Una vez anestesiados, todos los animales recibieron en la oreja derecha la aplicación tópica de $10 \mu\text{L}$ de solución etanólica de TPA ($2.5 \mu\text{g}/\text{oreja}$) y en la oreja izquierda $10 \mu\text{L}$ de etanol (vehículo). Diez minutos después de la aplicación del TPA, la oreja derecha de los animales recibió $10 \mu\text{l}$ de uno de los siguientes tratamientos: extracto MeOH de la harina desengrasada y desproteínizada de las cepas PCM, POS y PCMxPOS (dosis 250, 750 y $1000 \mu\text{g}/\text{oreja}$). Las harinas fueron previamente disueltas en agua-etanol (3:1). Otro grupo recibió en la oreja derecha el fármaco de referencia Indometacina ($0.8 \text{ mg}/\text{oreja}$) y un último grupo, sólo permaneció con la aplicación TPA en la oreja derecha (Figura 5).



Figura 5. Aplicación tópica de los tratamientos.

Cuatro horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. De cada uno de ellos se obtuvieron secciones circulares de cada oreja (7 mm) empleando un sacabocados (Figura 6). Cada biopsia de la oreja tratada y de la no tratada fueron pesadas. Para calcular el edema en mg, el porcentaje de inflamación y de inhibición se emplearon las siguientes ecuaciones (En el Anexo 3 se encuentra el fundamento de este método).

Para calcular el edema:

$$\text{Edema} = W_t - W_0$$

Donde: W_t corresponde al peso de la oreja tratada (derecha) y W_0 corresponde al peso de la oreja no tratada (izquierda).

Para calcular el porcentaje de inflamación:

$$\% \text{ Inflamación} = [(W_t - W_0) / W_0] * 100$$

Donde: W_t corresponde a la oreja tratada (derecha) y W_0 corresponde al peso de la oreja no tratada (izquierda).

Para calcular el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ inhibición} = [(\Delta w \text{ control} - \Delta w \text{ tratamiento}) / (\Delta w \text{ control})] * 100$$

Donde:

Δw tratamiento corresponde al delta de peso de cada uno de los individuos dentro de cada tratamiento y Δw control corresponde a la media aritmética de los deltas de peso del grupo control.

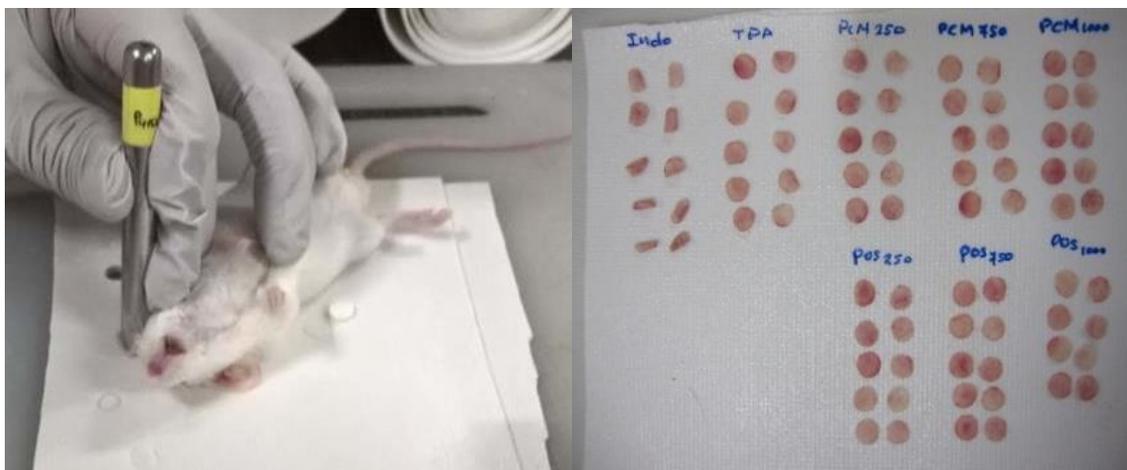


Figura 6. Proceso para obtener biopsias para ambas orejas.

VIII. 5 Capacidad antioxidante con DPPH

La capacidad antioxidante del extracto metanólico de *P. ostreatus* se evaluó siguiendo el método descrito en Rivero y Betancort (2006) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones acuosas del extracto metanólico de *P. ostreatus* con las siguientes concentraciones 0.5305, 1.061, 2.122, 4.244, 5.305 y 10.61 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a las que se les agregaron 2 mL de solución metanólica de DPPH. Treinta minutos después, la absorbancia se determinó a 515 nm para calcular la concentración resultante de DPPH. En el Anexo 4 se encuentra el fundamento de este método.

VIII.6 Pruebas químicas

VIII.6.1 Detección cualitativa de metabolitos secundarios

Para la detección de compuestos presentes en el extracto metanólico de *P. ostreatus*, se realizó el análisis preliminar fitoquímico de acuerdo con el método descrito en Valencia y Garín (2010).

- Test de alcaloides: Dragendorff.
- Flavonoides: Reacción de Shinoda y reacción de hidróxido de sodio al 10%.
- Glucósidos cianogénicos: Reactivo de Grignard.
- Azúcares reductores: Reacción de Fehling y reacción de Benedict.
- Saponinas: Prueba de altura.
- Taninos: reacción de cloruro férrico y Ferricianuro de potasio al 1%.

- Quinonas: Reacción de hidróxido de amonio y reacción de ácido sulfúrico.
- Cumarinas: Reacción de Erlich y reacción con hidróxido de amonio.
- Glucósidos cardiacos: Reacción de Legal y reacción de Baljet.
- Sesquiterpenlactonas: Reacción con Hidroximato férrico.

VIII.6.2 Fenoles totales

El contenido de fenoles totales se cuantificó por el método de Singleton (1984) con algunas modificaciones. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico con una solución estándar de 200 µg/mL. A partir de esta solución se tomaron alícuotas para poder obtener soluciones seriadas (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL). Dos horas después, la absorbancia se determinó a 760 nm. Los resultados se expresaron como µg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (µg EG/g de extracto).

VIII.6.3 Flavonoides totales

El contenido de flavonoides se determinó siguiendo el método de Dowd (1959) que emplea una solución de AlCl₃ al 2%. Se preparó una curva de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 µg/mL). Diez minutos después, se determinó la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresaron como µg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (µg EQ/g de extracto).

VIII.6.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El análisis por HPLC para determinar ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en los extractos se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100, equipado con un inyector automático marca Agilent modelo 1200 y un detector de arreglo de diodos.

VIII.7. Análisis estadístico

Los resultados del incremento de peso fueron expresados como la media ± el error estándar de la media (ESM) y se analizaron usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) en el programa SPSS y la prueba post-hoc de Duncan (*p<0.05).

IX. RESULTADOS

IX.1 Edema inducido con TPA

Los porcentajes de inflamación del ensayo de edema auricular inducido con TPA, se presentan en la Figura 7. El ANOVA de una vía indicó que hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(10,59)} = 4.253$, $p = 0.0001$) y la prueba post hoc de Duncan formó cuatro subconjuntos: el subconjunto “a” integrado por TPA, PCMxPOS₂₅₀ y PCMxPOS₁₀₀₀. El subgrupo “b” lo constituyen PCM₂₅₀₋₁₀₀₀, POS₂₅₀ y POS₇₅₀ y PCMxPOS₇₅₀. En el subconjunto “c” quedó ubicado POS₁₀₀₀. Finalmente, el grupo “d” quedó conformado por Indometacina.

Se observa que el mayor porcentaje de inflamación lo presentaron TPA, PCMxPOS₂₅₀ y PCMxPOS₁₀₀₀ (153.36, 160.1 y 147.58% respectivamente); y como era de esperarse, el menor porcentaje de inflamación lo presentó el grupo que recibió Indometacina (41.09%). Por otro lado, los porcentajes de inflamación de los extractos de PCM₂₅₀₋₁₀₀₀, POS₂₅₀ y POS₇₅₀ y PCMxPOS₇₅₀ (119.29-110.95; 129 y 106.8; 136.02 % respectivamente) fueron menores al de TPA. Sin embargo, a pesar de reducir el edema, estos valores estuvieron por arriba del porcentaje de inflamación del antiinflamatorio de referencia Indometacina. En contraste, POS₁₀₀₀ presentó el porcentaje de inflamación más bajo (94.94%), es decir, este subproducto conserva cierta actividad antiinflamatoria, pues fue capaz de inhibir el edema en un 34.9%.

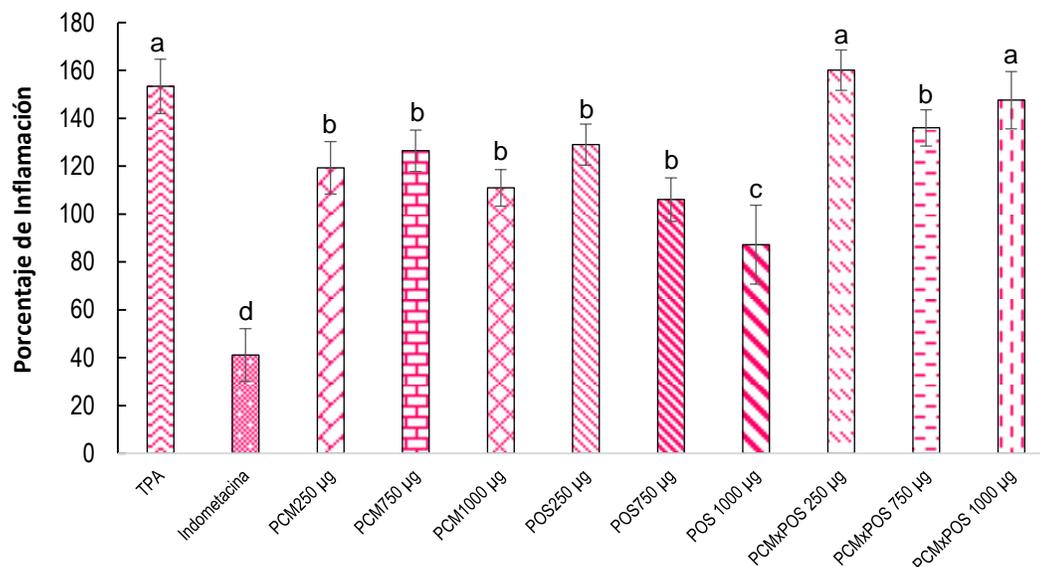


Figura 7. Porcentaje de inflamación de las orejas de ratones con la aplicación del extracto metanólico de las harinas desengrasadas de las cepas de *Pleurotus ostreatus* PCM, POS (parentales) y PCMXPOS (híbrido).

El efecto de los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de las cepas PCM, POS y PCMXPOS sobre el edema auricular inducido con TPA, se presenta en el Cuadro 1. El ANOVA de una vía indicó que hay diferencias significativas entre los grupos ($F_{(10,59)} = 12.766$, $p = 0.0001$) y la prueba post hoc de Duncan formó cuatro subconjuntos: el subconjunto “a” integrado por Indometacina que presentó un edema de 4.08 ± 1.3 mg. El subgrupo “b” lo constituyen PCM₂₅₀, PCM₁₀₀₀, POS₇₅₀, y POS₁₀₀₀ con edema de 11.0 ± 0.67 , 9.85 ± 0.71 , 9.45 ± 0.95 y 9.66 ± 1.60 mg respectivamente. En el subconjunto “c” quedaron ubicados los grupos de POS₂₅₀, PCM₇₅₀ y PCMXPOS₁₀₀₀ con un edema de 11.79 ± 0.84 , 11.82 ± 0.79 y $14.32 \pm$ mg respectivamente. Finalmente, el grupo “d” quedó conformado por TPA, PCMXPOS₇₅₀ y PCMXPOS₂₅₀ que generaron edemas que van de los 14.85 ± 1.01 , 14.93 ± 0.56 y 15.82 ± 0.71 mg, respectivamente.

Cuadro 1. Media \pm ESM del edema producido con los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas de cepas de *Pleurotus ostreatus* PCM (colección), POS (comercial) y PCMxPOS (híbrido).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{oreja}$)	Edema \pm ESM (mg)	Inhibición del edema (%)
TPA	2.5	14.84 \pm 1.02 ^d	----
Indometacina	800	4.08 \pm 1.13 ^a	72.5
PCM	250	11.00 \pm 0.67 ^b	25.9
	750	11.82 \pm 0.78 ^c	20.4
	1000	9.84 \pm 0.70 ^b	33.7
POS	250	11.78 \pm 0.83 ^c	20.6
	750	9.44 \pm 0.94 ^b	36.4
	1000	9.66 \pm 1.60 ^b	34.9
PCMxPOS	250	15.81 \pm 0.71 ^d	----
	750	14.93 \pm 0.56 ^d	----
	1000	14.32 \pm 0.83 ^d	3.5

Nota: Las letras corresponden a los cuatro grupos que se formaron en la prueba post hoc de Duncan, $p < 0.05$ y porcentajes de inhibición del edema y porcentaje de inhibición del edema.

Indometacina (0.8 mg/oreja) inhibió un 72.49%, mientras que los extractos metanólicos de la cepa PCM en la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ y los de la cepa POS en las dosis de 750 y 1000 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ inhibieron el edema en un 33.67, 36.38 y 34.94%, respectivamente (Cuadro 1). También se observa que la inhibición del edema fue menor con las dosis más bajas (250 y 750 $\mu\text{g}/\text{oreja}$) de la cepa PCM y en la dosis de 250 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ de la cepa POS, donde los porcentajes de inhibición oscilaron entre 20.38-25.87%. Con respecto a la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ de la cepa híbrida PCMxPOS, se observa que presentó una inhibición del edema del 3.52%, mientras que las dosis de 250 y 750 $\mu\text{g}/\text{oreja}$ no presentaron un porcentaje de inhibición.

IX.2 Detección cualitativa de metabolitos secundarios

El análisis preliminar fitoquímico de los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de las cepas de *Pleurotus ostreatus* PCM, POS y PCMxPOS reveló la presencia de flavonoides (flavonas y xantonas), glicósidos cardíacos, cumarinas, quinonas, alcaloides, saponinas y azúcares reductores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Preliminar fitoquímico de los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas de cepas de *Pleurotus ostreatus* PCM (colección), POS (comercial) y PCMxPOS (híbrido).

METABOLITO	PRESENCIA/AUSENCIA		
	PCM	POS	PAPO
Alcaloides (Reactivo de Dragendorff)	++	++	++
Flavonoides-Auronas (Reactivo de Shinoda)	-	-	-
Flavonoides-xantonas y flavonas (Reacción de Hidróxido de sodio)	+	+	+
Glicósidos cianogénicos (Reactivo de Grignard)	-	-	-
Saponinas esteroidales (Reactivo de Liberman Bouchard)	+	++	+
Taninos-Derivados de ácido gálico (Reacción con Cloruro férrico)	-	-	-
Taninos-Derivados de catecol	-	-	-
Taninos-Compuestos fenólicos	-	-	-
Cumarinas (Reacción de Erlich)	+++	+++	+++
Glicósidos cardíacos (Reactivo de Pridina)	-	-	-
Glicósidos cardíacos (Reactivo de Baljet)	-	+	+
Sesquiterpenlactonas	-	-	-

Nota: + Presencia escasa, ++ Presencia relativamente abundante, - No detectado.

IX.3 Capacidad antioxidante con DPPH

La capacidad antioxidante se evaluó en el extracto metanólico de harina desengrasada y desproteinizada de la cepa de *Pleurotus ostreatus* (POS) que fue la que presentó mayor actividad antiedema. El porcentaje de reducción de radicales libres de este extracto fue de 46.36% y una IC_{50} de $5.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 8).

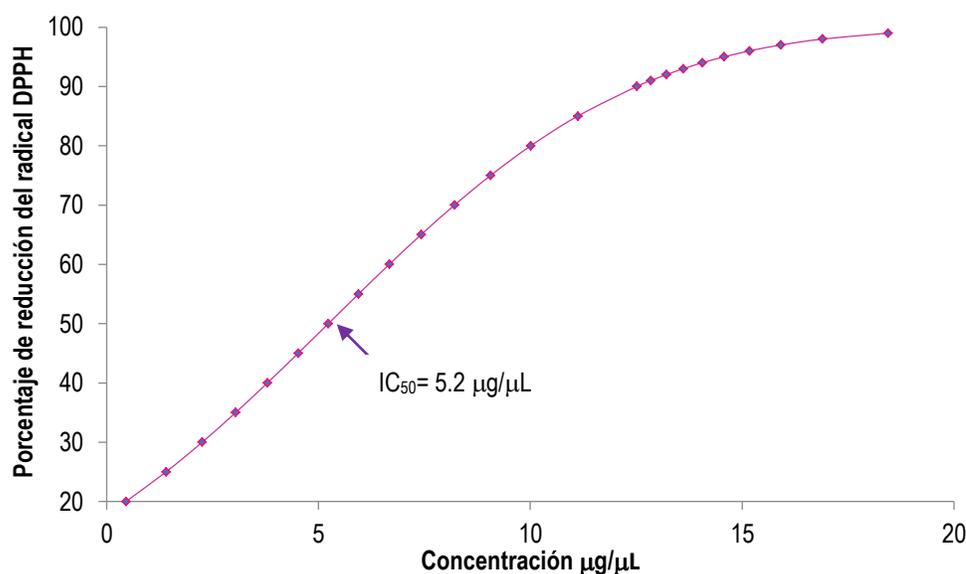


Figura 8. Capacidad antioxidante del extracto metanólico de la harina desengrasadas y desproteinizada de la cepa parental POS de *Pleurotus ostreatus*.

IX.4 Fenoles y flavonoides totales

El contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteinizada de las cepas parentales e híbrida de *P. ostreatus* se presenta en el Cuadro 3. Se observa que la cepa híbrida PCMxPOS presentó la mayor concentración de ácidos fenólicos ($10.92 \text{ mgEq ac. gálico/g}$ de extracto) en contraste de la cepa POS con menor concentración ($3.84 \text{ mgEq ac. gálico/g}$ de extracto), pero justo esta cepa parental POS, presentó el mayor contenido de flavonoides totales (1.20 mgEqQuer/g de extracto), y la menor cantidad de flavonoides (0.98 mgEqQuer/g de extracto) estuvo en la otra cepa parental PCM (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteinizada de las cepas parentales (PCM, POS) e híbrida (PCMxPOS) de *P. ostreatus*.

Extracto metanólico/Cepa		Fenoles totales mgEq ac. gálico/g de extracto	Flavonoides totales mgEq Quer/g de extracto
PCM	parental	5.33	0.98
POS	parental	8.84	1.20
PAPO	híbrida	10.92	1.06

IX.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El contenido de ácidos fenólicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de cada una de las harinas, fue calculado a partir de la información obtenida por el análisis de HPLC se muestran en el Cuadro 4. Los cromatogramas obtenidos, se presentan en la Figura 9.

En la cepa parental POS, se detectó la presencia de los ácidos fenólicos gálico, clorogénico, siríngico, vainillínico, caféico y p-cumárico. Siendo los ácidos clorogénico y vainillínico los más abundantes ($3.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto y $1.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto, respectivamente) Figura 9a.

En las cepas parental PCM e híbrida PCMxPOS, se detectó la presencia de los ácidos fenólicos gálico, clorogénico, siríngico, vainillínico, caféico, ferúlico y p-cumárico en ambos extractos, uno de los ácidos más abundantes en ambos extractos fue el clorogénico ($2.61\text{-}3.33 \mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) como se observa en el Cuadro 4 y Figura 9 b.y 9 c.

Cuadro 4. Contenido de ácidos fenólicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de la harina desgranzada y desproteinizada de las cepas parentales e híbrida de *P. ostreatus*.

Extracto metaólico	Ácido gálico	Ácido clorogénico	Ácido siríngico	Ácido vainillínico	Ácido caféico	Ácido ferúlico	Acido p-cumárico
POS	0.31	3.16	0.45	1.16	0.35	ND	0.27
PCM	0.26	2.61	0.30	0.92	0.42	0.71	0.04
PCMxPOS	0.13	3.33	0.45	1.21	0.59	0.81	0.05

ND – no detectado

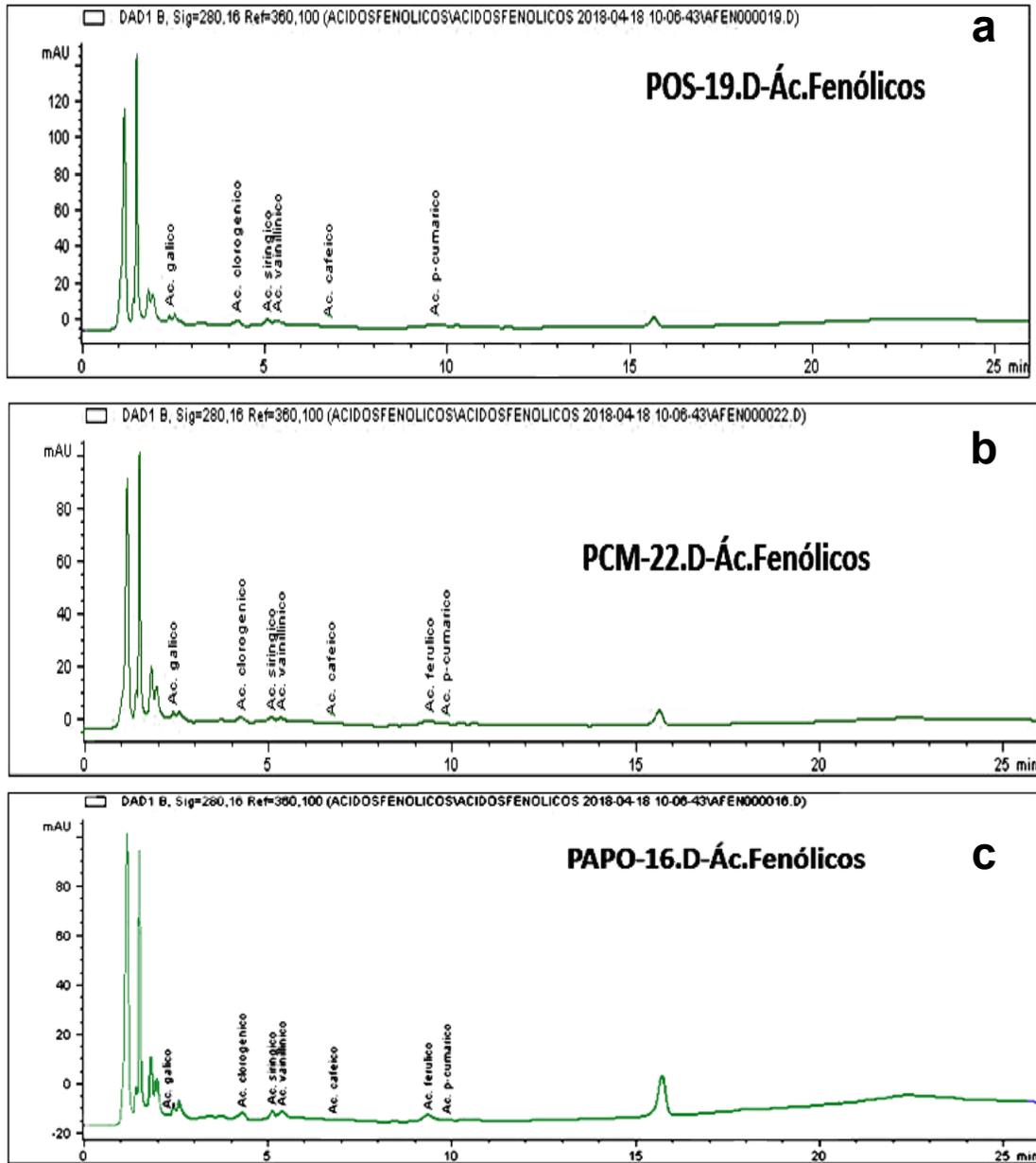


Figura 9. Cromatogramas del análisis de HPLC para ácidos fenólicos del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de *P. ostreatus*: a). Extracto MeOH de la cepa POS, b). Extracto MeOH de la cepa PCM y c). Extracto MeOH de la cepa PCMxPOS.

Los flavonoides Naringerina y Galangina estuvieron presentes en los extractos metanólicos de las 3 cepas analizadas.

En el extracto de la cepa parental POS, el flavonoide Galangina fue el flavonoide que se encontró en mayor concentración (1.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) y la Naringerina en una concentración de 1.85 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto, en el extracto de la cepa parental PCM. Con respecto al extracto de la cepa híbrida PCMxPOS, presentó una concentración de Naringerina de 1.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto, en cambio la Galangina se detectó en una mayor concentración de 1.59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto (ver Cuadro 5 y Figura 10).

Cuadro 5. Concentraciones de Flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de la harina desgranzada y desproteinizada de las cepas parentales e híbrida de *P. ostreatus*.

Extracto metanólico	Naringerina	Galangina
POS	0.74	1.34
PCM	1.85	1.34
PCMxPOS	1.22	1.59

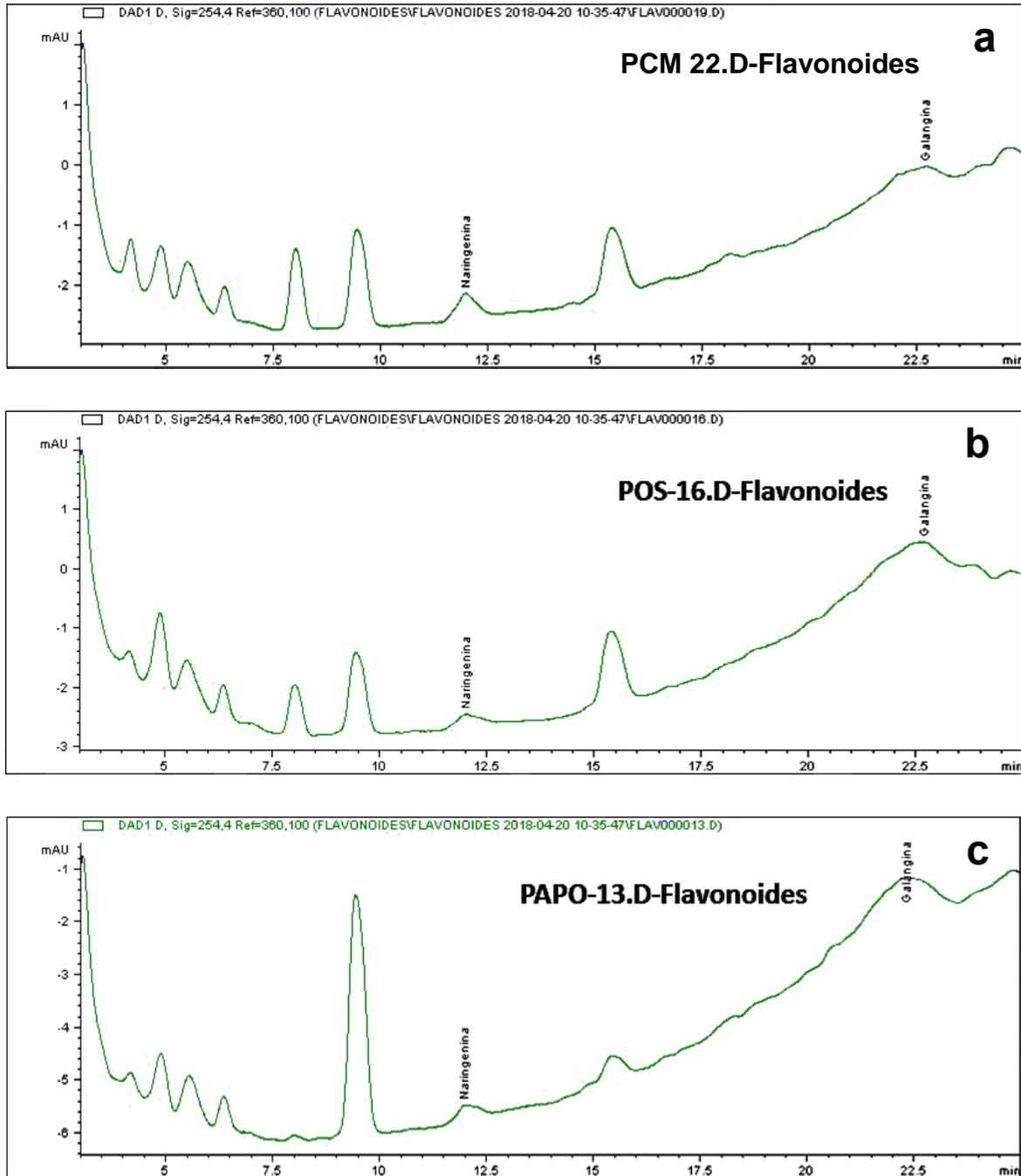


Figura 10. Cromatogramas del análisis de HPLC para flavonoides del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteínizada de *P. ostreatus*: a). Extracto MeOH de la cepa POS, b). Extracto MeOH de la cepa PCM y c). Extracto MeOH de la cepa PCMxPOS

En los extractos de las cepas parentales PCM y POS se detectó la presencia de los siguientes Terpenoides: ácido ursólico, stigmasterol, ácido oleanólico y α -amirina, en ambos extractos los terpenoides que se encontraron en mayor cantidad fueron el ácido ursólico y α -amirina. Para el caso del extracto de PCM presentó 27.55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto de ácido ursólico y 62.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto de α -amirina, en cambio el extracto POS contiene 12.19 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto y 73.42 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto, respectivamente (ver Cuadro 6 y Figura 11a y 11b).

En el extracto metanólico de la cepa híbrida PCMxPOS se encontraron los siguientes terpenoides: ácido ursólico, stigmasterol, ácido oleanólico, α -amirina, carnosol y b-sitosterol, estos últimos no se encuentran en los extractos de las cepas parentales, el ácido ursólico (19.35 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) y α -amirina (71.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) fueron los más abundantes como se muestra en el Cuadro 6, Figura 11 c.

Cuadro 6. Contenido de terpenoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) presentes en el extracto metanólico de la harina desgranada y desproteinizada de las cepas parentales e híbrida de *P. ostreatus*.

Extracto metaólico	Carnosol	Ácido Ursólico	Stigmasterol	Ácido Oleanólico	α -amirina	B-sitosterol
POS	ND	12.19	10.64	11.40	73.42	ND
PCM	ND	27.55	12.98	9.15	62.05	ND
PCMxPOS	3.82	19.35	12.70	12.62	71.28	1.08

ND - no detectado

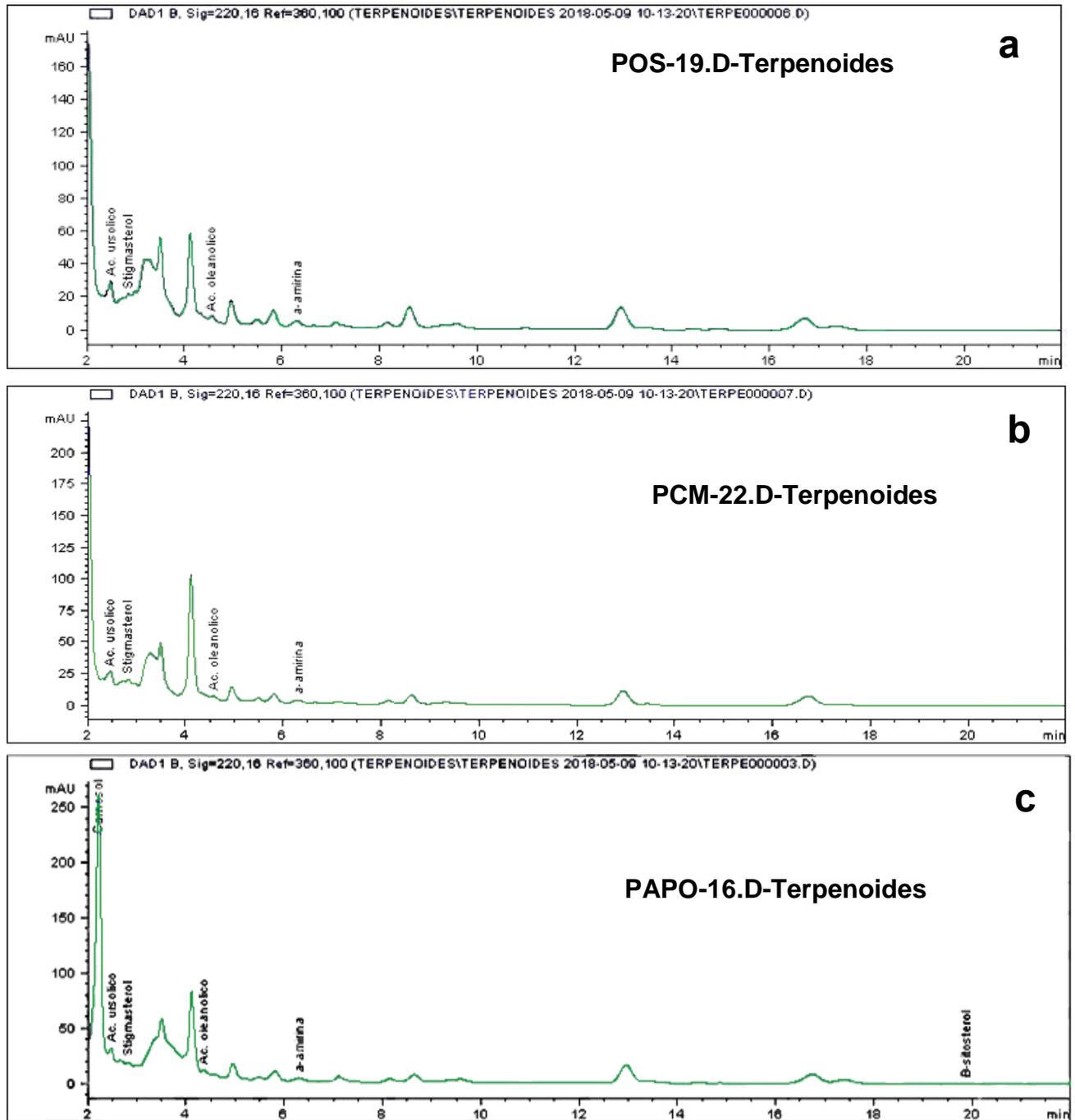


Figura 11. Cromatogramas del análisis de HPLC para terpenoides del extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteinizada de *P. ostreatus*: a). Extracto MeOH de la cepa POS, b). Extracto MeOH de la cepa PCM y c). Extracto MeOH de la cepa PCMxPOS

X. Discusión

Pleurotus ostreatus es un hongo ampliamente cultivado por su sabor y valor nutricional y se le ha usado en la obtención de proteínas con alto valor biológico. También se ha evidenciado su actividad antiinflamatoria y capacidad antioxidante (Kim *et al.*, 2009; Jedinak *et al.*, 2011; Nayan *et al.*, 2004). En este estudio se evaluó el potencial antiedema y capacidad antioxidante de las harinas subproducto del proceso de obtención de proteínas de dos cepas parentales y una híbrida.

X.1. Edema inducido con TPA

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los subproductos de ambas cepas parentales PCM₁₀₀₀ y POS₇₅₀₋₁₀₀₀ inhibieron el edema un 33.7, 36.4 y 34.9% respectivamente. González *et al.* (2011) consideran como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 a 65 % y como buen efecto antiinflamatorio un valor de inhibición mayor al 65%; con base en este criterio, los extractos metanólicos de POS (750 y 1000 µg/oreja) y PCM (1000 µg/oreja) presentan actividad antiinflamatoria moderada. Estos datos evidencian que las harinas de PCM y POS subproducto del proceso de obtención de concentrados proteicos aún conservan moderado potencial antiinflamatorio. Rivero *et al.* (2016) reportaron que la aplicación de 4 mg/oreja del extracto acuoso de la harina de cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* inhibió el edema auricular en un 43.5%±6. Esta información robustece la propuesta del potencial antiinflamatorio que conservan los subproductos de las cepas PCM y POS ya que con dosis de 750 µg y 1.0 mg/oreja se alcanzó una inhibición moderada.

Por lo que respecta al subproducto de la cepa híbrida PCMxPOS, las dosis de 250 y 750 µg/oreja no inhibieron el edema y con la dosis más alta de 1000 µg/oreja, la inhibición fue sumamente baja (3.52%). La formación de cepas híbridas de *Pleurotus* se realiza a partir de los monocariontes (Isikhuemhen, *et al.*, 2000), que se obtienen por desdicarionización del micelio. La desdicarionización implica la homogenización del micelio dicariótico y su posterior crecimiento en una solución peptona-glucosa para la recuperación de los monocariontes o neohaplontes (Aguilar *et al.*, 2018). La cepa híbrida (PCMxPOS) que se utilizó en este estudio se obtuvo a partir de neohaplontes

compatibles de las cepas parentales PCM y POS. El hecho de que no se presentará inhibición del edema con la cepa híbrida PCMxPOS, podría deberse a que las nuevas cepas híbridas que se obtienen con el método de desdicariorización no siempre superan las características de las cepas progenitoras (Guadarrama, 2013), pero existe la probabilidad de que alguno de los otros híbridos formados no solo posea, sino que incremente esta propiedad. Por lo tanto, es recomendable probar la actividad antiinflamatoria de los otros híbridos obtenidos.

Por otro lado, se ha señalado que el TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa C (PKC), dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La PKC activada actúa a diferentes niveles, incluyendo la liberación de AA, formación de prostanoídes, incremento de radicales libres y síntesis de diversas proteínas proinflamatorias, como las citocinas, además de la expresión de iNOS (Young, *et al.*, 1989; Payá *et al.*, 1993). Lo que sugiere el posible mecanismo a nivel bioquímico, que explicaría el efecto antiinflamatorio, estaría basado en la inhibición de algunos mediadores inflamatorios. Dentro de los cuales se encontrarían NO, ROS, PG y la iNOS.

Con respecto a lo anterior, ya figuran en la bibliografía, estudios *in vitro* que demuestran que las especies del género *Pleurotus* inhiben algunos mediadores inflamatorios como NO, ROS, PG. Jendínak *et al.* (2011) evaluaron el liofilizado de *P. ostreatus*, que suprimió la secreción de $TNF\alpha$ inducida por LPS e inhibió la producción de PGE_2 inducida por LPS y la producción de NO a través de la regulación de la expresión de COX-2; mientras que Qihui (2018) reportó que los polifenoles (ácido gálico, siríngico, elágico, catequina, monohidrato propáncico y galato de metilo) presentes en el extracto acetónico de *P. eryngii* inhibieron la producción de mediadores pro inflamatorios, como el NO y las ROS en macrófagos RAW264.7, además se demostró que dicho efecto antiinflamatorio está asociado con la inhibición de la expresión de iNOS y la inhibición de la expresión del ARNm de NF- κ B. En otro estudio, el extracto etanólico de *P. giganteus* mostró una reducción en la producción de NO, además de suprimir la expresión iNOS y de COX-2 cuando las células fueron estimuladas con LPS (Baskaran

et al. 2017). Souilem *et al.* (2017) reportaron que el extracto metanólico del micelio de *P. eryngii* mostró actividad antiinflamatoria al suprimir la producción de NO en células RAW264.7. Así mismo, Vetvicka *et al.* (2018) señalaron que el liofilizado de extractos de glucanos de *P. eryngii*, mostró una reducción de la secreción de TNF- α cuando las célula fueron estimuladas por LPS.

Las diferencias que presentaron los extractos de las cepas parentales PCM y POS con su capacidad antiedema, pueden explicarse en términos de los metabolitos secundarios presentes en el extracto. En este caso, a la cantidad y tipo de ácido fenólico, flavonoide o terpenoide (Moreira, 2000; Zhu *et al.*, 2014; Najid *et al.*, 1992).

X.2. Análisis preliminar fitoquímico

El análisis preliminar fitoquímico de los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de las cepas de *Pleurotus ostreatus* PCM, POS y PCMxPOS reveló la presencia de flavonoides (flavonas y xantonas), glicósidos cardíacos, cumarinas, quinonas, alcaloides, saponinas y azúcares reductores. Estos datos son consistentes con los reportados por Kalac (2013) quien señala la presencia de polisacáridos, ácidos fenólicos, polifenoles, y compuestos volátiles para el género *Pleurotus*. Nayana *et al.* (2004) evidenció en el extracto metanólico de *Pleurotus florida*, la presencia polisacáridos unidos a proteínas como el componente principal, además de trazas de flavonoides y terpenoides.

X.3. Capacidad antioxidante con DPPH

La acción captadora de radicales libres generados en los procesos inflamatorios, se considera uno de los tantos mecanismos de acción mediante los cuales una sustancia puede ejercer un efecto antiinflamatorio (Vaidya, 2011). Es por eso que se decidió evaluar la capacidad antioxidante de la cepa parental POS, ya que fue la presentó el mayor porcentaje de inhibición al edema (34.9%).

Los resultados indican que el extracto metanólico de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de la cepa parental POS de *Pleurotus ostreatus* tienen la capacidad de reducir el radical del DPPH un 46.36% y un $IC_{50} = 5.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sulistany *et al.* (2017) reportaron que el extracto metanólico de los cuerpos fructíferos de una cepa silvestre

de *Pleurotus* presenta una IC₅₀ igual a 0.45 ±0.04 mg/mL y el extracto metanólico del micelio fue de 2.76 ±0.36 mientras que Arbaayah y Umi (2013) reportaron que los extractos etanólicos de los cuerpos fructíferos de *P. pulmonarius*, *P. djamor*, y *P. ostreatus* tienen una IC₅₀ igual a 4.20, 5.50 y 7.50 mg/mL, respectivamente. Se conoce que los compuestos con actividad antioxidante deben tener al menos un grupo hidroxilo (Grotewold, 2006), y el APFQ de la harina de POS se detectaron compuestos fenólicos como los flavonoides (flavonas y xantonas) a los cuales se les podría atribuir esta capacidad antioxidante (Groot *et al.*, 1998).

X.4. Fenoles totales y flavonoides totales

El contenido de fenoles totales en las harinas subproducto de PCM, POS y PCMxPOS fue de 5.33, 8.84 y 10.92 mgEq ac. gálico/g de extracto, respectivamente. Sulistiany *et al.* (2017) reportaron que el contenido de fenoles totales en una cepa silvestre de *Pleurotus* fue de 4.62 mgEq ac. gálico/g de extracto; mientras que Qihui (2018) reportó 0.11 mgEq ac. gálico/g de extracto metanólico de *P. eryngii*. Babu *et al.* (2012) reportaron 36.0 mgEq ac. gálico/g de extracto metanólico de *P. florida*, así mismo Arbayaah y Umi (2013) reportaron el contenido de fenoles totales para el extracto etanólico de *P. ostreatus* fue de 42.83 mgEq ac. gálico/g de extracto. Es evidente que el tipo de sustrato y las condiciones de cultivo podrían influir en la producción de metabolitos, además de la especie de hongo (Zhong *et al.*, 2009).

El contenido de flavonoides de las cepas PCM, POS y PCMxPOS fue de 0.98, 1.20 y 1.06 mgEqQuer/g de extracto respectivamente. Babu *et al.* (2012) reportaron en contenido de flavonoides totales del extracto metanólico de *P. djamor* y este fue de 2.1 mgEqQuer/g de extracto y para el extracto metanólico de *P. florida* fue de 2.9 mientras que Arbayaah y Umi (2013) reportaron un contenido de 11.57mgEqQuer/g de extracto etanólico de *Pleurotus ostreatus*. Como se ha mencionado anteriormente, el tipo de sustrato y las condiciones de cultivo podrían influir en la producción de metabolitos, además del método de extracción de los flavonoides (Vamanu, 2014).

X.5. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El análisis HPLC a los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas y desproteinizadas detectó la presencia en la cepa parental POS, los siguientes ácidos fenólicos: gálico, clorogénico, siríngico, vainillínico, caféico y p-cumárico. Mientras en las cepa parental PCM e híbrida PCMxPOS, se detectó la presencia de los ácidos fenólicos gálico, clorogénico, siríngico, vainillínico, caféico, ferúlico y p-cumárico. Estos ácidos fenólicos estuvieron presentes en el extracto metanólico de *P. eryngii*, además del ácido p-hydroxybenzoico, sinápico y p-anísico (Lin *et al.*, 2014). Sin duda, otros ácidos fenólicos estarán presentes en las muestras de PCM, POS y PCMxPOS ya que en los cromatogramas se encuentran picos que no fueron identificados y estos deben ser identificados por HPLC acoplado a masas.

Estudios científicos han reportado que el ácido caféico posee propiedades antioxidantes y contribuye a reducir el incremento de ERO, el cual es un mediador que causa daño celular y estimula la expresión de otros mediadores inflamatorios, inhibe la producción de óxido nítrico (NO), sustancia responsable del incremento en la vasodilatación (Fernández, 1998). En el caso del ácido gálico se ha reportado que inhibe la liberación de histamina (Yamada, 1999) y regula la producción de citocinas e interleucinas (Alves *et al.*, 2006). Mientras que al ácido p-cumárico se le ha detectado propiedad antioxidante, ya que puede implicar directamente en la eliminación de ROS como los OH (Lun *et al.*, 2000). El ácido clorogénico, es el ácido fenólico que se encuentra en mayor concentración (2.61-3.33 µg/mg de extracto) en las cepas estudiadas. Se ha reportado que este ácido fenólico tiene propiedades antiinflamatorias inhibiendo a la enzima ciclooxigenasa 2 (COX₂) y la liberación de óxido nítrico (NO), también se ha reportado que tiene propiedades antioxidantes (Shi *et al.*, 2013). Otro ácido fenólico que estuvo presente en los tres extractos metanólicos, fue el ácido vainillínico (0.92-1.21 µg/mg de extracto). Se ha documentado que este ácido, en modelos *in vitro*, como la expresión de mediadores pro inflamatorios en células RAW264.7, y es capaz de reducir la formación de mediadores inflamatorios, además de inhibir a las enzimas COX-1 y COX₂ y la formación de NO (Liu, 2002).

El ácido ferúlico estuvo presente en el extracto de la cepa parental PCM y en el extracto de la cepa híbrida PCMxPOS y no se detectó en el extracto de la cepa parental POS. Se ha demostrado que el ácido ferúlico inhibe la liberación de NO (Yamada, 1999).

Los ácidos fenólicos ejercen su acción antiinflamatoria, debido a que muchos de estos compuestos pueden inhibir la síntesis de prostaglandinas (Moreira, 2000).

Los flavonoides detectados con el HPLC en los extractos metanólicos de las cepas parentales y la cepa híbrida de *P. ostreatus* fueron: naringerina y galangina. En el extracto etanólico de *P. eryngii*, detectaron la presencia de catequina, epicatequina, mirecetina, hesperidina y quercetina (Lin *et al.* 2014). No se descarta la posibilidad de que estos flavonoides estén presentes en los extractos metanólicos de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de *P. ostreatus*, ya que en los cromatogramas se registran picos que requieren ser identificados y estos deben ser identificados por HPLC acoplado a masas.

Entre las actividades reportadas para galangina se encuentra la actividad antitumoral y antiinflamatoria, ya que reduce los niveles de interleucinas y citosinas (Zhu *et al.*, 2014). El flavonoide naringerina se le ha reportado que puede mejorar el metabolismo de la glucosa y los lípidos, además de ser beneficioso para las complicaciones de la diabetes (Henrique *et al.*, 2009); asimismo, se ha documentado que presenta actividad antioxidante (Oliveira *et al.*, 2017).

Se ha señalado que los flavonoides ejercen su acción farmacológica inhibiendo la producción de diferentes mediadores químicos del proceso inflamatorio, como la liberación de histamina, además de presentar actividad analgésica debido a su propiedad de inhibir el metabolismo del ácido araquidónico (Moreira, 2000).

Con respecto al análisis HPLC de los extractos metanólicos de las cepas parentales (PCM y POS) de *P. ostreatus* se detectó la presencia de los siguientes terpenoides: ácido ursólico, stigmasterol, ácido oleanólico y α -amirina. Mientras que en el extracto de la cepa híbrida (PCMxPOS) se detectaron dos terpenoides más que en las cepas parentales y estos son: carnosol y β -sitosterol. Entre las actividades reportadas para que el ácido ursólico es que inhibe las vías de las ciclooxigenasas, las lipooxigenasas y

las elastasas de los leucocitos (Najid *et al.*, 1992). En el caso del ácido oleanólico, se le atribuye la propiedad antitumoral, ya que inhiben la proliferación celular e inducen la apoptosis (Feng *et al.*, 2009). Al carnosol se le ha reportado actividad antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria, ya que inhibe la producción del NO (Ai-Hsiang *et al.*, 2002). Con respecto a Stigmasterol y β -sitosterol, se ha indicado que tienen actividad antiinflamatoria y antipirética, ya que inhibe la migración de los neutrófilos en los tejidos inflamados por alguna lesión (Bouic, 1999).

En otros estudios se han aislado el stigmasterol y β -sitosterol de *Achillea ageratum* e inhibieron el edema inducido con TPA en el modelo de inflamación aguda y crónica (Gómez *et al.*, 1999). Para las actividades biológicas descritas para el carnosol se encuentran, diurético, antiulcerogénico y antioxidante (Bruneton, 2001). La α -amirina, aislada de la especie vegetal *B. resinosa* se ha descrito que presenta actividad antiinflamatoria, ya que inhibió el edema inducido con TPA (Matulevich *et al.*, 2016). El ácido ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico que está presente en numerosas especies vegetales, generalmente junto a su isómero, el ácido oleanólico. Se ha demostrado que estos terpenoides aislados de *Glechoma hederacea*, inhiben el crecimiento del tumor inducido por TPA sobre la piel de ratón (Tokuda *et al.*, 1986), esto permite proponer que estos compuestos que están presentes en el hongo *P. ostreatus* podrían participar en la actividad anti-edema observada en este estudio.

Aun cuando, la actividad anti-edema y la capacidad antioxidante de las setas comestibles se ha atribuido a polisacáridos y beta-glucanos (Vetvicka *et al.* 2018; Yasukawa *et al.*, 1996), el efecto anti-edema conservado en las harinas subproducto de las cepas PCM y POS parecen estar completamente relacionado con el contenido de compuestos antiinflamatorios y antioxidantes presentes en el extracto, tales como ácidos fenólicos: ácido gálico, clorogénico, siríngico, vainillínico, caféico, ferúlico y p-cumárico; los flavonoides: galangina y narangerina y los terpenoides: ácido ursólico, stigmasterol, ácido oleanólico, α -amirina, carnosol y β -sitosterol. Lo anterior, no excluye la participación de otros principios activos presentes en el extracto metanólico de la harina desengrasada y desproteinizada de *P. ostreatus*, tales como los alcaloides. Ya en 2008, Ribeiro *et al.* comparando la composición de ácidos orgánicos, ácidos

fenólicos y el contenido total de alcaloides de hongos los silvestres comestibles enteros: *Russula cyanoxantha*, *Amanita rubescens*, *Suillus granulatus* y *Boletus edulis*, y de sus correspondientes sombreros y estípites; reportaron que todas estas especies presentaron ácidos oxálico, cítrico, málico y fumárico; mientras que el ácido fenólico p-hidroxibenzoico solo se encontró en *A. rubescens* y *S. granulatus*, en cantidades muy bajas. Las cuatro especies analizadas presentaron un potencial antioxidante, especialmente alto para *B. edulis*, que también fue la especie más rica en alcaloides.

Finalmente, podemos señalar que los hallazgos de esta tesis proporcionan evidencia experimental del potencial anti-edema de los extractos metanólicos de las harinas (desengrasadas y desproteinizadas), subproducto de la obtención de proteínas de las cepas de *Pleurotus ostreatus* PCM y POS (cepas parentales) y su posible uso en la preparación de fitofármacos.

XI. Conclusiones

- La harina subproducto del proceso de obtención de proteínas de cuerpos fructíferos de dos cepas parentales de *Pleurotus ostreatus* (PCM y POS) aún conserva su potencial antiedema.
- La harina subproducto del proceso de obtención de proteínas de cuerpos fructíferos de la cepa parental POS de *Pleurotus ostreatus* presenta capacidad antioxidante.
- La revisión bibliográfica permite proponer que los ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides detectados por el HPLC son algunos metabolitos, responsables de la actividad observada.

XII. Perspectivas del estudio

- Analizar la composición de los extractos por medio de Espectrometría Líquida de Alta Resolución acoplado a masas.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de cepas silvestres de *Pleurotus ostreatus*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y la capacidad antioxidante de los demás híbridos de *Pleurotus ostreatus*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las harinas desengrasadas y desproteinizadas de *Pleurotus ostreatus* usando otros modelos de inflamación en animales o en pruebas *in vitro*.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2007). *Cellular and molecular immunology* 6^a edición. Philadelphia: Elsevier.
- Aguilar, L., Zárate, P., Villanueva, R., Yáñez, J., Garín, M., Guadarrama, P., Valencia, G. (2018). Utilización de marcadores ITS e ISSR para la caracterización molecular de cepas híbridas de *Pleurotus djamor*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35 (1), 49-55.
- Ai-Hsiang, L., Yu-Chih, L., Shoei-Yn, L., Chi-Tang, H., Jen, L. (2002). Carnosol, an antioxidant in Rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear Factor-Kb in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23(6), 983-991.
- Apers, S., Baronikova, S., Sindambiwie, B., Witvrouw, M., Clercq, E., Berghe, V., Marck, E., Vlietink, A., Pieters, L. (2001). Antiviral, Haemolytic and Molluscicidal Activities of Triterpenoid Saponins from *Maesa lanceolata*: Establishment of Structure-Activity Relationships. *Planta Médica*. 67, 528-532.
- Arbaayah, H. y Umi, K. (2013). Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere*, 4(4), 661-673
- Aron, D., Findling, J. y Tyrrell, J. (2007). Glucocorticoids & adrenal androgens. En Gardner, D., Shoback, D. (Eds). *Greenspan's basic & clinical endocrinology* 8^o ed. (pp 346-395). New York. McGraw Hill.
- Babu, D., Pandey, M., Rao G. (2012). Antioxidant and electrochemical properties of cultivated *Pleurotus* spp. and their sporeless/low sporing mutants. *Journal Food Science Technology*, 51(11), 3317-3324.
- Baskaran, A., Heng Chua, K., Sabaratnom, V., Ravishankar, R., Kuppusamy, U. (2017). *Pleurotus giganteus* (Berk. Korun & Hyde), the gigant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H₂O₂ stimulated RAW264.7 cell via STAT-3 and COX-2 pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(40), 1-10.
- Beck, G. (2003). Secreted phospholipases A₂ induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(3), 731-737.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Consultado 08 de noviembre de 2018 en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Seta&i d=8047>
- Bouic, P., Clark, A., Lamprecht, J. (1999). The effects of B-stosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of maratón runners: inhibition of post maratón immune suppression and inflammation. *International Journal Sports Medicine*, 20(4), 258-262.
- Brand. Williams. W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antiooxidant activity. *Food Sciencie and Technology*, 22, 25-30.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica. Plantas medicinales* 2^a ed. Acribia.
- Buckingham, J. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal Pharmacology*, 147(1), 258-268.
- Choyillas, T. (2000). Inflamación aguda y crónica. En Ranz, C. (Ed). *Patología Estructural y Funcional*. 6ta ed. (pp 53-93) Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Collins, T. (2003). Inflamación aguda y crónica. En: Cotran, Kuman, R., Collins, V. (Eds). *Patología Estructural y Funcional*. 6ta ed. (pp 53-93) Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Crofford, L. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. En: Budd, E., Firestein, G., Genovese, M., Sargent, J., Ruddy, S. y Sledge, C. (Eds). *Textbook of Rheumatology* 7^o ed. (pp 839-858). Philadelphia. Elsevier.
- Cruz, A., Garín, M., Leal, H., Ramírez, M., Valencia, G. (2014). Proximate composition of *Pleurotus* fruit body flour and protein concentrate. *Journal of Chemical, Biological and Physical sciences*, 4(5), 52-60.
- De Silva, D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62, 1-40.
- Dowd, L. E. (1959). Spectrophotometric determination of quercetin. *Analogy Chemical.*, 31(7), 1184-1187.
- Fainboim, L., Geffner, J. (2005). *Introducción a la inmunología humana* 5^a Edición. Argentina: Panamericana.
- Fengi, J., Chen, W., Zhao, Y., Ju, X. (2009). Anti-tumor activity of oleanolic, ursolic and glycyrrhetic Acid. *The Open Natural Products Journal*, 2, 48-52.
- Fernández M., Sáenz M., García M. (1998). Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal Pharmacology*, 50(10), 15-25.
- Florez, J. (2003). Esteroides corticales y antiinflamatorios esteroideos. En Florez, J. (Ed). *Farmacología humana*. (pp. 923). España.
- Gaoxing, M., Wenjion, Y., Young, F., Ning, M., Fei, P. y Liyan, Z. (2016). Antioxidant and citotoxicities of *Pleurotus eryngii* residue polysaccharides obtained by ultrafiltration. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 108-116.
- García de Lorezo, A., López, J., Sánchez, M. (2000). Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva*, 24(53), 360-363.
- García, P. (2008). Inflamación. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 102(1), 91-159.
- Gómez, M., Sáenz, M., García, D., Fernández, A. (1999). Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Journal of Biosciences*, 54(11), 937-941.

- González, J., Fariñas, C. Inflamación. (2004). En García, J., Merino, J. y González, J. (Eds). *Patología General Semiología Clínica y Fisiopatología*. (pp 127-136). España
- González, K. y Medina J. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica*, 10(3), 182–217.
- González, T., Betancourt, M. y Ortiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3-9.
- Groot, H. y Raunen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Clinical Pharmacology*, 3, 249-255.
- Grotewold, E. (2006). *The science of flavonoids*. New York: Springer.
- Guadarrama, M. (2013). Productividad y caracterización de cepas parentales e híbridas provenientes de neohaplontes compatibles de *Pleurotus* spp. de la región Mixteca. Tesis de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
- Henrique, A., Lourenzini, E., Fernandes, A., Machado, C. (2009). Effect of naringerin on biochemical parameters in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, (1), 51-59.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos, Micología básica y aplicada*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Horton, J. (2003). Free radicals and lipid mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*, 15(189), 75-88.
- Ibáñez, A., Berrocal, A. y Calvo, A. (2002). Terapia con glucocorticoides. *Diagnóstico*, 41(4), 177-182.
- INEGI. (2010). Consultado el 22 de febrero de 2019 en <https://www.inegi.org.mx/datos/?t=0220000000000000>
- Isikhuemhen, O., Moncalvo, F., Nerud, R., Vilgalys R. (2000). Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberregium*. *Mycology Research*, 104(20), 732-737.
- Ivorra, J., Rosas, J., Santos, G. y García, M. (2005). Antiinflamatorios no esteroideos. En Ramón, C., García, M. y Rosas, J. (Eds). *Enfermedades autoinmunes sistémicas y reumatológicas*. (pp 775.792). Barcelona: Masson.
- Jares, E. y Pignataro, O. (2002). Mecanismos moleculares de acción de los corticoides. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*, 33(9), 21-26.
- Jedinak, A., Dudhgaonkar, S., Simon, J. (2011). Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-kB and AP-1 signaling. *Nutrition Journal*, 10(52), 26-34.
- Kassian, R. (2002). Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. *Dolor, Clínica y Tratamiento*, 2, 5-10.

- Kalac, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2(93), 209-218.
- Kim J., Kim S., Park H, Choi J, Ju Y, Nam K, Kim Sand Lee S. (2009). The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1016-1020.
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. (2007). *Inmunología de Kuby* 6ª edición. México: Mc Graw Hil.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Aster, J. (2010). *Patología estructural y funcional* 8ª edición. Madrid, España: Elsevier.
- Labarére, J. y Iracabal, B. (1994). Restriction site and length polymorphism of the rDNA unit in the cultivated basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Theoretical and applied Genetics*, 88, 824-830.
- Lin, J., Liu, C., Chen, Y., Hu, C., Juang, L. y Yang, D. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties for ethanolic extracts from *Pleurotus eryngii* fruiting bodies harvested at different time. *LWT Food Science and Technology*, 55(33), 74-82.
- Liu, B. (2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Academy of Science*, 962(1), 318-331.
- Lun, Z., Cosma, G., Gardner, H., Shi, X., Castranova, V., Vallyathan, V. (2000). Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidatio. *American Journal of Physiology*, 279, 954-960.
- Loguercio, C. (2003). Oxidative stress in viral alcoholic hepatitis. *Free Radical Biological Medical*, 34(1), 1-10.
- López, A., Moreno, L., Villagrasa, V. (2006). *Manual de Farmacología: guía para el uso racional del medicamento*. España: Elsevier. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=N6Ps8u0zHtQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Martínez D., Larqué A., Aliphat M., Aguilar A., Bonilla M., Martínez W. (2000). Biotechnology of edible mushrooms in the food security and sovereignty of Mexico. II *National Forum on Food Security and Sovereignty*. Mexican Academy of Sciences, CONACYT, Mexico, D. F. 193-207.
- Matulevich, J., Gil, E., Ospina, L. (2016). Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* Mutis ex. L. (Pegamosco). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 332-345.
- Moreira A., Spitzer V., Schapoval E., Schenkel E. (2000). Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytotherapy Research*, 14(8), 638-640.
- Murphy, H., Ward, P. (2006). Inflamación. En Rubin, E., Gosrtein, F., Schwarting, R., Rubin, R., Strayer, D. *Patología estructural Fundamentos Clínico patológicos en Medicina*. (pp. 44-81). España.

- Najid, A., Simon, A., Cook, J., Rabinovitch, C., Delage, H., Chulia, C., Riguid, M. C (1992). Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS Letters*, 299(3), 213-217.
- Nayana, J., Ajith, T. y Janardhanan, K. (2004). Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytotherapy Research*, 18, 43-46.
- Oliveira, R., Jain, S., Candido, A., Dos Santos, L., Araújo, E. (2017). Screening for quality indicators and phenolic compounds of biotechnological interest in honey samples from six species of stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Food Science Technology*, 37(4), 552-557.
- Pascual, L., Tallec, L. y Lombés, M. (2005). The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology*, 19(22), 11-21.
- Patel, Y., Narayan, R. y Singh. (2012). Medicinal properties of *Pleurotus* Species (Oyster mushroom): a review world. *Journal of Fungal and Plant Biology*, 3(1), 01-12.
- Payá, M., Ferrándiz, M., Sanz, M., Bustos, G., Blasco, R., Ríos J., Alcaraz, M. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranea coast in mice. *Phytotherapy Research*, 7, 159-162.
- Payan, D., Katzung, B. (1996). Antinflamatorios no esteroideos; analgésicos no opioides: anti urémicos. En Bertman (Ed). K. *Farmacología básica y clínica*. (pp. 651-677). México.
- Pérez, R. (2007). Patología general de la inflamación. En Pérez, R., López E. (Eds), *Principios de patología* (pp 37-47). Buenos Aires.
- Pineda, D. (1995). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición*, 13(2), 104-111.
- Pokorny, J. (2001). Introducción. En Nedyalka, Y. (Ed), *Antioxidantes de los alimentos: Aplicaciones prácticas* (pp 1-3). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Puente, J. (2005). Inflamación e inmunología. En Ferrereira, A., Afani, P., Lanza. J. y Sepúlveda (Eds). *Inmunología Básica y clínica*. (pp 151-165). Chile: Mediterráneo.
- Qiuhui, H., Biao, Y., Hong, X., Liyon, Z., Xion, W., Kanyasiri, R., Lei, Z., Yanhui, H., Bernand, M. y Wenjian, Y. (2018). Polyphenols-rich extract from *Pleurotus eryngii* with growth inhibitory of HCT116 colon cancer cell and anti-inflammatory function RAW264.7 cells. *Food & Function*, 9, 1601-1611.
- Ramírez, R., Hernández, O., Galván, F., Leal, H. (2007). Productividad de cepas híbridas de *Pleurotus x Lentinula*. En Sánchez, J. y Martínez, D. (Eds). El cultivo de setas *Pleurotus* spp. en México. (pp 171-195). México.
- Rang, H. y Dale, M. (2008). *Farmacología*. España: Elsevier.

- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P., Seabra, R., Goncalves, R., Baptista, P., Quelhas, I., Valentaño, P. (2008). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 110, 47-56.
- Rivero, N., Ayala, M., Zepeda, A., Meneses, M. (2016). Anti-inflammatory effect of aqueous extract of spent *Pleurotus ostreatus* substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(2), 141-144.
- Rivero, A. y Betancurt, J. (2006). Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marina. *Medical Chemistry*, 1, 1-9.
- Royse, D., Sánchez, J. (2017). Producción mundial de setas *Pleurotus spp.* con énfasis en países iberoamericanos. En Sanchez, J. y Royse, D. (Eds). *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* (pp 17-25). México.
- Salmones, D. y Mata, G. (2017). Recursos genéticos del género *Pleurotus*. En Sánchez, J., Royse, D. (Eds). *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus*. (pp 29-52). México.
- Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK (2006). Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*, 6, 1287-1297.
- Schimmer, B., Parker, K. (2006). Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. En Brunton, L., Lazo J. y Parker K. (Eds). *Goodman & Gilman's the pharmacological basic of therapeutics* 11° edición (pp 1587-1612). New York: Mc Graw Hill.
- Sharma, J., Al-Omran, A., Parvathy, S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15, 252-259.
- Shi, H., Dong, L., Jiang, J., Dang, X., Lu, X. (2013). Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of aqueous extract of *Erythrina senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 275-280.
- Singleton, L., Hames, B., Payne, C. (1984). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2, 1980-1985.
- Souilem, F., Fernandes, A., Calhelha, R., Joao, C., Barreira, M., Barnes, L., Skhiri, F., Mortins, A. y Ferreira, I. (2017). Wild mushroom and their mycelia as sources of bioactive compounds antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chemistry*, 230, 40-48.
- Spitzer, J. (2002). Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo. *Frontiers in Bioscience*, 7, 99-108.

- Stamets, P. (2003). *Mycomedicinal: an information booklet on medicinal mushroom*. Olympia.
- Sulistiany, H., Lisdor, I., Sctyawati, O. (2016). Production of fruiting body and antioxidant activity of wild *Pleurotus*. *Journal of Biosciences*, 23, 191-195.
- Sutterwalla, F., Ogura, Y., Flavell, R. (2007). The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 82, 259-264.
- Tokuda, H., Ohigashi, H., Koshimizu, K., Ito, Y. (1986). Inhibitory effects of ursolic and oleanolic on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Letters*, 33, 279-285.
- Vaidya, A., Vaidya, R. (2011). Reactive oxygen species, anti-oxidant enzymes and smoldering chronic inflammation: Relevance to diabetes mellitus, atherosclerosis, and menopausal metabolic syndrome. *Journal Midlife Health*, 2(2), 49-55.
- Valencia, G. y Garín M. (2010). *Manual de Prácticas de Productos Naturales*. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- Valencia, G., Tepechco, M., Ramírez, R., Leal, H. (2007). Productividad de cepas híbridas coloridas del género *Pleurotus*. En Sánchez, J. y Martínez, D. (Eds). *El cultivo de setas Pleurotus spp. en México*. (pp 152-169). México.
- Vamu, E. (2014). Antioxidant properties of mushroom mycelia obtained by batch cultivation and tocopherol content affected by extraction procedures. *BioMed Research International*, 10, 947-804.
- Vetvicka, V., Gover, O., Hayby, H., Danay, O., Ezov, N., Hadar, Y., Schwartz, B. (2018). Spatial distribution of glucan type and content between caps and stalks in *Pleurotus eryngii* impact on the anti-inflammatory functionality. *International Journal of Molecular Science*, 19(3371), 1-13.
- Wang, S., Zhao, S., Huang, Z., Yin, L., Hu, J., Li, J., Liu, Y. (2018). Development of a highly productive strain of *Pleurotus tuoliensis* for commercial cultivation by crossbreeding. *Scientia Horticulturae*, 234, 110-115.
- Yamada K. (1999). Structure-activity relationship of polyphenols on inhibition of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*, 35(53), 169-174.
- Yasukawa, K., Kannon, H., Kaminaga, T. y Takido, M. (1996). Inhibitory effect of methanol extracts from edible mushroom on TPA-Induced ear oedema and tumour promotion in mouse skin. *Phytotherapy Research*, 10, 367-369.
- Young, J. y Young L. (1989). Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agent *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*, 3(4), 215-231.
- Zamaro, S. (2007). Antioxidantes Micronutrientes en la Lucha por la Salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1), 17-26.

- Zhang, Y., Dai, L., Kong, X. y Chen, L. (2012). Characterization and in vitro activities of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*. *Biological Macromolecules*, 51(25), 259-265.
- Zhong, J. y Xiao, H. (2009). Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 113, 79-150.
- Zhu, L., Luo, Q., Bi, J., Ding J., Chen, F. (2014). Galangin inhibits growth of human head and neck squamous carcinoma cells in vitro and in vivo. *Chemical-Biological Interactions*, 224, 149-156.

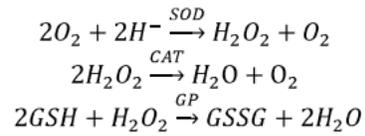
XIV. ANEXO 1

Los antioxidantes son captadores de radicales libres y por ello retrasan o inhiben la etapa de iniciación del proceso de oxidación, lo que disminuye la formación de productos de descomposición volátiles (por ejemplo, aldehídos y cetonas). Estos se clasifican dependiendo del mecanismo de acción que realice en el proceso de oxidación de la siguiente forma Cuadro 7. (Pokorny, 2001).

Cuadro 7. Mecanismo de acción de antioxidantes (Tomado de Pokorny, 2001).

Tipo de antioxidante	Mecanismo de acción	Ejemplo de antioxidante
Antioxidante	Inactivando radicales libres lipídicos	Compuestos fenólicos
Estabilizadores de hidropéroxidos	Preveniendo la descomposición de hidropéroxidos en radicales libres	Compuestos fenólicos
Sinergistas	Promoviendo la actividad de antioxidantes	Ácido cítrico
Quelantes de metales	Ligando metales pesados a compuestos inactivos	Ácido fosfórico
Extinguidores de oxígeno singulete	Transformando oxígeno singulete en oxígeno triplete	Carotenos
Sustancias que reducen hidropéroxidos	Reduciendo hidropéroxidos por vías no radicalarias	Proteínas

Otra clasificación de los antioxidantes, desde un punto de vista celular, agrupa estos compuestos en un sistema enzimático o endógeno y en otro sistema no enzimático o exógeno, los cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular (Zamaro, 2007). El primer sistema son enzimas creadas por la misma célula que actúan sobre determinadas especies reactivas, las principales son la superóxido dismutasa (SOD) que se encarga de transformar el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, la catalasa (CAT) continua con la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y la glutatión peroxidasa (GP) que actúa con el selenio como cofactor, ya que la forma activa de esta enzima, es de glutatión reducido (GSH), reaccionando con el peróxido de hidrógeno transformándolo en agua y alcohol, esto se puede observar en la siguiente ecuación:



El otro sistema no enzimático está conformado por antioxidantes que se unen a los radicales libres, y los transfieren a sitios donde no pueden provocar graves daños, o bien, los transforman en radicales menos agresivos. A este grupo de antioxidante pertenecen: el α -tocoferol (vitamina E), el β -caroteno, el ascorbato (vitamina C), el glutatión, el urato, la bilirrubina y los flavonoides entre otros (González *et al.*, 2000).

XV. ANEXO 2

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



Figura 12. Cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*

Nombres comunes

Oreja blanca, oreja de caahuate, oreja de izote, oreja de palo, oreja de patancán (todos en diversas partes del país) hongo ostra, seta este último nombre comercial aplicado a los hongos cultivados (Salmones y Mata, 2017).

Generalidades

Las especies del género *Pleurotus* pertenecen al Phylum Basidiomycota, se caracterizan por producir basidiocarpos (Patel *et al.*, 2012). Este género comprende alrededor de 40 especies y son comúnmente referidos como “oyster mushroom” (hongo ostra). *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprófito o parásito débil, descomponedor del grupo de la podredumbre blanca que crece de manera natural en árboles. *Pleurotus* viene del griego “pleuro” que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo y la palabra *ostreatus* en latín quiere decir en forma de ostra y en este caso se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Stamets, 2003).

Morfología

Pleurotus ostreatus está formada por un sombrero o píleo liso convexo, raramente redondo, casi siempre en forma de ostra o concha. Su color es muy variable según la especie va desde grisáceo, café hasta rosado y blanco. Sus laminillas son muy decurrentes, anchas, blancas por lo que el himenóforo es lamelado y de consistencia típicamente carnosa. Sus láminas son poco unidas entre sí en la base, generalmente son decurrentes. Pueden carecer de estípite o bien el estípite es corto, excéntrico o

lateral, engrosado gradualmente hacia el lado del píleo (Herrera y Ulloa, 1998). Su carne es blanda y correosa con olor y sabor agradables (Royse, *et al.*, 2017) Figura 12.

Hábitat y ecología

Crece en grupos de 3 a 6 o más fructificaciones, crece sobre árboles caducifolios, como hayas (*Fagus sylvatica*), chopos (*Populus nigra*), olmos (*Ulmus*), robles (*Quercus*), tilos (*Tilia*) y saucos (*Sambucus nigra*). Esta dentro de los bosques subtropicales o mesófilo de montaña. Se desarrolla en la época de lluvias (Herrera y Ulloa, 1998).

XVI. ANEXO 3

Modelo de inflamación aguda en ratones inducido con 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)

El TPA es un potente agente inflamatorio y promotor de tumores. Su administración tópica provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria. El TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa C (PKC), dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La enzima es activada por diacilglicerol (DAG), mediador liberado a partir de los fosfolípidos de la membrana. El TPA y otros ésteres del forbol cuando se intercalan en la membrana pueden actuar como sustitutos del DAG, activando la PKC de forma más permanente que el mediador endógeno, ya que el TPA es difícilmente degradable. La PKC activada actúa a diferentes niveles, incluyendo la liberación de AA, formación de prostanoïdes, incremento de radicales libres y síntesis de diversas proteínas proinflamatorias (Young, 1989).

Tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación entre 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor como consecuencia de la extravasación de líquido, siendo el edema máximo a las 6-8 h. Transcurridas 12-14 h el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 h. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de leucocitos PMN a las células endoteliales entre 4-6 h, y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las 6 h. Al cabo de 6-24 h comienza el acúmulo de leucocitos en la dermis. Por último, tras 48-96 h se observa hiperplasia en la membrana basal epidérmica, debida al incremento del número de células en división. El estudio bioquímico demuestra un incremento de AMPc, PGE2 y PGE2 α (Young, 1989).

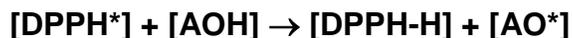
Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como indometacina, aunque los inhibidores de la COX, LOX y PLA2 dan buenos resultados, además de corticoides y antihistamínicos.

XVII. ANEXO 4

Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

El radical del DPPH es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la donación de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante, se produce su forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto la pérdida de absorbancia (Pineda, 1995).

Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo. Esta medición permite observar una fase muy rápida, seguida por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de esta reacción o las reacciones de los productos de esta. Esta reacción la podemos representar de la siguiente manera:



Los resultados experimentales se expresan como el valor IC_{50} , es decir, la concentración de la muestra problema que produce una inhibición del 50% del radical libre del DPPH. Podemos considerar que el valor de IC_{50} es dependiente de la concentración del DPPH, así como de la naturaleza del compuesto