

## Efecto de un producto nutracéutico de setas *Pleurotus* sobre la respuesta inmune de ratones inmunocompetentes de ambos sexos

Effect of a nutraceutical product from *Pleurotus* mushroom on the immune response of immunocompetent mice of both sexes

Gabriel Llauradó<sup>I</sup>  
Humberto Joaquín Morris<sup>I</sup>  
Yamila Lebeque<sup>I</sup>  
Asel Guilarte<sup>II</sup>  
Adrián Guiérrez<sup>I</sup>  
Yaixa Beltrán<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>II</sup> Instituto Superior Minero Metalúrgico de Moa, Facultad de Geología y Minas, Centro de Estudios del Medio Ambiente. Holguín, Cuba.

---

### RESUMEN

**Introducción:** Las setas comestibles *Pleurotus* son consideradas actualmente como fuente de obtención de nutracéuticos y micoquímicos con potencial bioterapéutico. Aunque diversos estudios destacan los efectos inmunomoduladores de biopreparaciones derivadas de este género en ratones inmunodeficientes, aún existen aspectos no esclarecidos en estudios preclínicos con relación a la influencia del sexo en la función inmunitaria de ratones inmunocompetentes.

**Objetivos:** Evaluar el efecto de un biopreparado seco derivado de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. sobre parámetros metabólicos y de la respuesta inmune de ratones inmunocompetentes de ambos sexos.

**Métodos:** La administración del biopreparado nutracéutico se realizó durante 14 días por vía oral (1000 mg/kg) y se determinaron, posteriormente, marcadores hematológicos y bioquímicos en suero y se evaluó la respuesta inmune innata y adaptativa mediante el conteo de células fagocíticas y la respuesta de hipersensibilidad retardada, respectivamente.

**Resultados:** El biopreparado incrementó el conteo de leucocitos totales, con una respuesta polarizada que evidenció diferencias significativas en las poblaciones de linfocitos y polimorfonucleares en ratones machos y hembras, respectivamente. Se apreció, igualmente, efectos moduladores a nivel de la celularidad esplénica y un aumento en el número de macrófagos peritoneales en las hembras tratadas. También, aunque no se detectaron resultados significativos en los niveles de hemoglobina y proteínas séricas totales, se evidenció un comportamiento diferencial que favorece la síntesis de la fracción globulínica en las hembras que recibieron el nutraceutico. El suplemento estimuló, además, la respuesta inmune celular *in vivo* en ratones machos.

**Conclusiones:** El presente estudio proporciona nuevas evidencias del efecto nutraceutico e inmunomodulador de un biopreparado de *Pleurotus* sp. en ratones inmunocompetentes de ambos sexos. Ello sugiere la estimación de los marcadores de inmunomodulación tanto en estudios preclínicos como en intervenciones nutricionales en humanos y considerar, además, la influencia del sexo en dichos estudios.

**Palabras clave:** Setas comestibles *Pleurotus*; nutraceutico; inmunomodulador.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** The edible mushrooms *Pleurotus* are currently considered as a source of obtaining nutraceuticals and mycochemicals with biotherapeutic potential. Although several studies highlight the immunomodulatory effects of biopreparations derived from this genus in immunodeficient mice, there are still aspects not clarified in preclinical studies regarding the influence of sex on the immune function of immunocompetent mice.

**Objectives:** To evaluate the effect of a dry biopreparation derived from fruiting bodies of *Pleurotus* sp. on metabolic parameters and the immune response of immunocompetent mice of both sexes.

**Methods:** The administration of the nutraceutical biopreparation was carried out for 14 days orally (1000 mg / kg) and serum hematological and biochemical markers were subsequently determined and the innate and adaptive immune response was evaluated by counting phagocytic cells and delayed hypersensitivity response, respectively.

**Results:** The biopreparation increased the total leukocyte count, with a polarized response that showed significant differences in lymphocyte and polymorphonuclear populations in male and female mice, respectively. We also observed modulating effects at the splenic cellular level and an increase in the number of peritoneal macrophages in the treated females. Also, although no significant results were detected in the levels of hemoglobin and total serum proteins, a differential behavior was observed that favors the synthesis of the globulin fraction in the females that received the nutraceutical. The supplement also stimulated the cellular immune response *in vivo* in male mice.

**Conclusions:** The present study provides new evidence of the nutraceutical and immunomodulatory effect of a *Pleurotus* sp. in immunocompetent mice of both sexes. This suggests the estimation of immunomodulation markers both in preclinical studies and in nutritional interventions in humans and also consider the influence of sex in these studies.

**Keywords:** Edible mushrooms *Pleurotus*; nutraceutical immunomodulator.

---

## INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales o nutraceuticos son productos que se encuentran entre la frontera de los alimentos y los fármacos.<sup>1</sup> En este sentido, los nutraceuticos que se consumen como suplementos nutricionales, son derivados, mayoritariamente, de diversas fuentes naturales como las plantas, algas y las setas comestibles.<sup>2</sup>

En el caso particular de las setas comestibles, éstas han sido catalogadas recientemente como una bio-fábrica natural de sustancias y metabolitos secundarios con efectos biológicos; y se consideran, además, una atractiva fuente para la elaboración de suplementos dietéticos y bionutrientes.<sup>3,4</sup>

Sus preparaciones, tales como extractos crudos y semipurificados, así como productos secos, contienen diferentes moléculas bioactivas como polisacáridos, proteínas, polifenoles, etc.<sup>5,6</sup> El amplio espectro de propiedades biofarmacéuticas atribuidas a estas sustancias incluyen, principalmente, los efectos antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, antitumorales e inmunomoduladores.<sup>7</sup> Dentro de los géneros estudiados con mayor potencial bioterapéutico se destacan especies de *Lentinus*, *Grifola*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Agaricus*, entre otros.<sup>8</sup>

*Pleurotus* es uno de los géneros de setas más importantes atendiendo a su producción y consumo a nivel mundial y que cuenta, además, con un elevado número de especies. Entre las más estudiadas se incluyen: *P. tuber-regium*, *P. pulmonarius* (= *P. sajor-caju*), *P. ostreatus* (= *P. florida*), *P. eryngii* y, mientras se describen otras menos estudiadas como *P. abalonus*, *P. cornucopiae*, *P. eous* y *P. sapidus*.<sup>9</sup> Además, de su alto valor nutricional, este género exhibe importantes propiedades medicinales, dentro de las que se destacan la acción anticancerígena, la posibilidad de combatir procesos oxidativos en el organismo y su capacidad de modular la respuesta inmunitaria.<sup>10</sup>

Diversos estudios han demostrado que los extractos derivados tanto del micelio como de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* ejercieron propiedades inmunomoduladoras al incrementar la producción de especies reactivas del oxígeno en neutrófilos.<sup>11</sup> En adición, otros autores destacan el efecto inmunopotenciador de una fracción hidrosoluble derivada de *P. tuber-regium* y rica en polisacáridos a nivel de la inmunidad innata y en linfocitos T auxiliares en ratones.<sup>12</sup>

Sin embargo, poco es conocido acerca de los efectos de suplementos nutraceuticos elaborado a partir de la biomasa seca de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. en ratones inmunocompetentes de ambos sexos. En este sentido, diversos estudios han referido la influencia del sexo en la función inmunitaria y la respuesta diferencial dependiente del sexo ante las infecciones, procesos autoinmunes y la acción de fármacos anti-inflamatorios.<sup>13,14</sup> Este aspecto, en consecuencia, podría ser tomado en consideración tanto en las evaluaciones preclínicas, como en la estimación de los marcadores de inmunomodulación en las intervenciones nutricionales en humanos. Por otro lado, no existe uniformidad en la mayoría de la literatura científica consultada con respecto al uso de los biomodelos y el sexo propuesto. Estos elementos, por tanto, dificultan la comparación de resultados obtenidos en estudios enfocados en evaluar el potencial inmunomodulador de preparados bioactivos.

Por tal motivo, la presente investigación evalúa el efecto de un biopreparado seco como nutracéutico, derivado de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. sobre parámetros bioquímicos y la respuesta inmune de ratones BALB/c inmunocompetentes de ambos sexos. Esta investigación, además, aporta evidencias que soportan el uso de bioformulaciones como suplementos nutricionales a partir de las setas *Pleurotus* en el tratamiento complementario y la profilaxis en grupos poblacionales con riesgo a las inmunodeficiencias.

## MÉTODOS

### Material biológico y método de obtención del biopreparado nutracéutico de *Pleurotus* sp

Se utilizó la cepa de *Pleurotus* sp. (CCEBI 3024), depositada en la Colección de Cultivos Microbianos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI).

Los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. se obtuvieron por fermentación en estado sólido utilizando como sustrato pulpa de café, previamente pasteurizadas. Una vez cosechados, los cuerpos fructíferos se fragmentaron en pequeñas porciones y se incubaron en estufa (Venticelli, Alemania) durante 24 h a 45°C. El polvo resultante del molinado de los cuerpos fructíferos secos fue conservado en bolsas de nylon, protegido de la luz y la humedad hasta su utilización (biopreparado seco, SN).

### Animales y diseño experimental

Se utilizaron 20 ratones BALB/c de ambos sexos (8 semanas de edad), con un peso corporal de 18-25 g, libres de patógenos, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Habana). En el cuidado de los ratones se emplearon condiciones sanitarias convencionales, y se mantuvieron a temperatura y humedad ambiental controladas. A los animales se les suministró agua y pienso peletizado para ratones (ALYco®, CENPALAB) *ad libitum*. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Oriente y el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Universidad de Ciencias Médica de Santiago de Cuba y se desarrollaron considerando las legislaciones cubanas y la Directiva Europea 2010/63/EU para la protección de animales usados con fines científicos.

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales (dos correspondientes a cada sexo, n= 5). A los grupos designados como SN-*Pleurotus* Hembras y SN-*Pleurotus* Machos, se les administró por vía oral durante 14 días 0,2 mL de una suspensión del biopreparado seco (1000 mg/kg) en solución salina fisiológica. Dicha administración se realizó diariamente en las mañanas y a la misma hora. Los grupos controles (Control Hembras y Control Machos) se alimentaron con pienso peletizado para ratones durante la investigación. La observación clínica de los animales se realizó diariamente durante 14 días.

### Parámetros hematológicos en sangre periférica

Se tomaron muestras de sangre por el plexo retroorbital de cada animal empleando capilares heparinizados y se colectaron en viales que contenían anticoagulante (20  $\mu$ L). Se determinó el contenido de hemoglobina en sangre con el empleo de reactivo comercial Hemotest (EPB Carlos J. Finlay, Ciudad de La Habana).

Para el conteo total de leucocitos se tomaron 20  $\mu$ L de sangre, los que se añadieron a viales que contenían 0,4 mL de ácido acético (2 %). Se homogeneizaron y se procedió al conteo en cámara de Neubauer (Alemania) en microscopio óptico (NOVEL, China). El resultado se expresó en  $10^9$  células/L.

Para el conteo diferencial se realizaron extensiones de una gota de sangre fresca y a continuación las preparaciones se fijaron con etanol absoluto y se tiñeron con solución de Giemsa. El conteo se realizó en base a 100 células, diferenciando las mismas según sus características morfológicas con el empleo del microscopio óptico.

### Análisis bioquímicos en suero

Se determinó la concentración de proteínas séricas totales por el método de Biuret.<sup>15</sup> Se estimó la concentración de albúmina en suero mediante el juego diagnóstico Albumin-ELITech (Francia) basado en la reacción con el verde de bromocresol. Los niveles de globulinas se determinaron a partir de la diferencia de la concentración de albúmina de las proteínas totales. Se calculó, además, la relación albúmina/globulinas (A/G).

### Celularidad esplénica

La suspensión de células esplénicas se preparó triturando suavemente el bazo con solución de Hanks helada, filtrándola luego a través de una gasa antiséptica (Johnson & Johnson Medical, EUA). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer en un microscopio óptico.

### Celularidad en el exudado peritoneal

Luego del sacrificio de los ratones, se inoculó por vía intraperitoneal (i.p) 5 mL de solución salina de Hanks. Se realizó una incisión y se colectaron las células de la cavidad con pipeta Pasteur. Luego de centrifugar (5 000 rpm/10 min), las células fueron resuspendidas en 1 mL de solución de Hanks y se estimó la celularidad en cámara de Neubauer al microscopio óptico.

### Ensayo de estimulación de la inmunidad celular (Reacción de hipersensibilidad retardada, HR)

La respuesta inmune celular se evaluó mediante el ensayo de hipersensibilidad retardada.<sup>16</sup> Los grupos experimentales se conformaron según se describió previamente (2.3). El día 15 los ratones fueron sensibilizados por la inoculación intradérmica (i.d.) de 50  $\mu$ L de una solución de seroalbúmina bovina (BSA) 5 mg/mL en Adyuvante Completo de Freund (Sigma, EUA) en dos sitios del abdomen. A los ocho días los animales se retaron por vía i.d. en el cojinete de la pata trasera izquierda con 20  $\mu$ L de la solución de BSA 5 mg/mL. En el cojinete de la pata derecha se inoculó un volumen similar de solución salina fisiológica (SSF). La medición de la induración se realizó con un micrómetro (K1972r, Rusia) a las 24, 48 y 72 h del reto. La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSF.

## Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de los datos (DE). Se utilizó el análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, de conjunto con la prueba de Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Efecto del biopreparado nutracéutico de *Pleurotus* sp. sobre parámetros bioquímicos y hematológicos

La presente investigación evaluó el efecto de la administración oral de un biopreparado seco de setas *Pleurotus*, en calidad de suplemento nutricional, en parámetros metabólicos y la respuesta inmune innata y adaptativa en ratones inmunocompetentes de ambos sexos.

En el estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con relación a los niveles de hemoglobina en sangre entre los diferentes grupos experimentales estudiados (SN-*Pleurotus* y Control Hembras  $145 \pm 20$  y  $140 \pm 14$  g/L, vs SN-*Pleurotus* y Control Machos  $150 \pm 18$  y  $136 \pm 15$  g/L, respectivamente) ( $p < 0,05$ ).

De igual forma, tampoco se reflejan resultados significativos en cuanto al efecto de la suplementación con el biopreparado seco de *Pleurotus* en los niveles de proteínas séricas totales y albúmina (tabla).

**Tabla.** Efecto en los niveles de proteínas séricas de ratones BALB/c de ambos sexos suplementados con setas *Pleurotus*.

	SN- <i>Pleurotus</i> Hembras	Control Hembras	SN- <i>Pleurotus</i> Machos	Control Machos
Proteínas séricas totales (g/dL) <sup>ns</sup>	7,32 $\pm$ 2,36	6,36 $\pm$ 1,25	5,72 $\pm$ 2,07	4,84 $\pm$ 0,97
Albúmina (g/dL) <sup>ns</sup>	3,62 $\pm$ 1,02	3,54 $\pm$ 0,45	3,99 $\pm$ 0,83	3,00 $\pm$ 0,95
Globulinas (g/dL) <sup>*</sup>	4,67 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	2,06 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>	2,73 $\pm$ 1,29 <sup>ab</sup>	1,92 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>
Relación Albúmina/Globulinas (A/G) <sup>ns</sup>	0,80 $\pm$ 0,46	2,12 $\pm$ 0,98	1,92 $\pm$ 0,92	2,35 $\pm$ 0,89

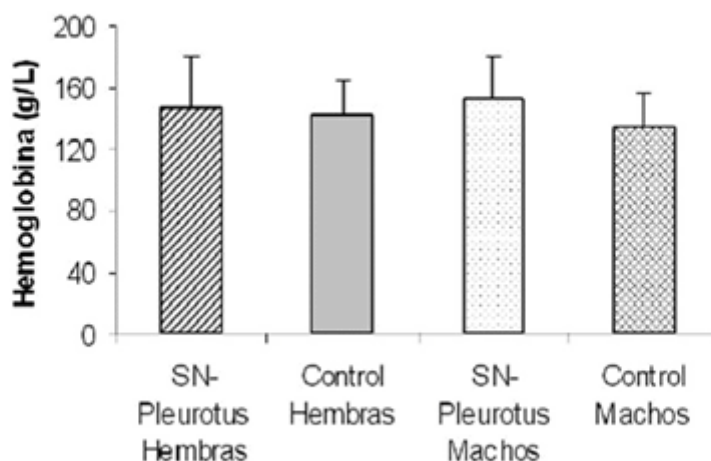
A los grupos designados como SN-*Pleurotus* Hembras y SN- *Pleurotus* Machos se les administró por vía oral durante 14 días 0,2 mL de una suspensión del suplemento de *Pleurotus* (1000 mg/kg) en solución salina fisiológica. Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) ns: no hay diferencias significativas.

Sin embargo, se observó un incremento diferenciado en la concentración de la fracción globulínica en las hembras tratadas con el suplemento nutricional ( $p < 0,05$ ). Los ratones machos en cambio, mostraron valores comprendidos estadísticamente entre las hembras tratadas y los grupos controles. De esta forma, las hembras que recibieron el nutracéutico de setas *Pleurotus* mostraron los valores inferiores en la relación Albúmina/Globulina, lo cual apoya la posible estimulación de la síntesis de globulinas séricas.

La administración oral del suplemento nutricional de *Pleurotus* sp., con independencia del sexo, conllevó a un incremento estadísticamente significativo en el conteo de leucocitos totales respecto a los controles ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1). Los valores de este parámetro se encontraron dentro del intervalo referido para la especie ( $8-17 \times 10^9/L$ ).<sup>17</sup>

Los resultados, expresados en  $10^9$  células/L, se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Los resultados, expresados en  $10^9$  células/L, se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Fig. 1.** Efecto de la suplementación con setas *Pleurotus* sp en el conteo de leucocitos en sangre periférica de ratones BALB/c.

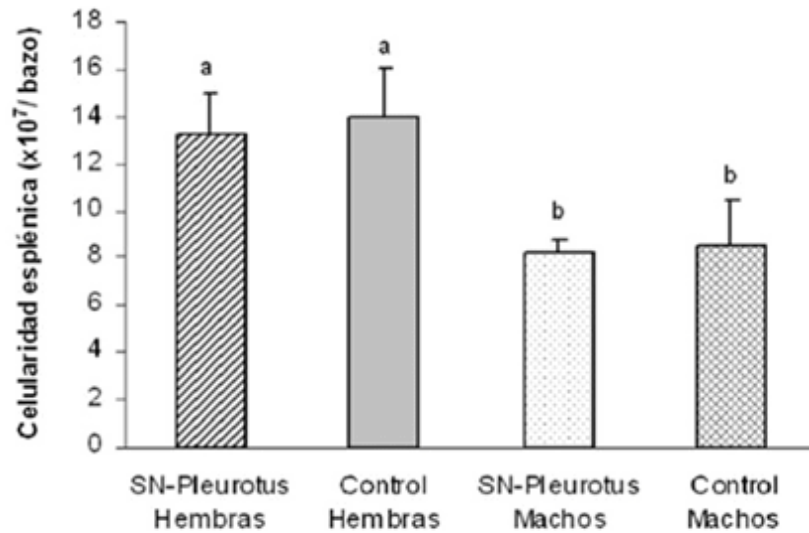
No obstante, en el caso específico de las poblaciones leucocitarias (linfocitos y polimorfonucleares) en los animales que recibieron como complemento de la dieta el biopreparado seco de *Pleurotus* sp., se apreció un comportamiento diferencial dependiente del sexo. En este sentido, los conteos linfocitarios fueron superiores en los machos tratados con el suplemento nutricional ( $p < 0,05$ ), y el de polimorfonucleares en las hembras tratadas con dicho producto ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1).

#### Efectos del biopreparado nutracéutico de *Pleurotus* sp. sobre la respuesta inmune innata

Con independencia del tratamiento, la celularidad esplénica resultó estadísticamente superior en las hembras suplementadas con el nutracéutico con respecto a los machos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2).

Los resultados ( $\times 10^7$ /bazo) se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Los resultados ( $\times 10^7/\text{bazo}$ ) se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n=5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

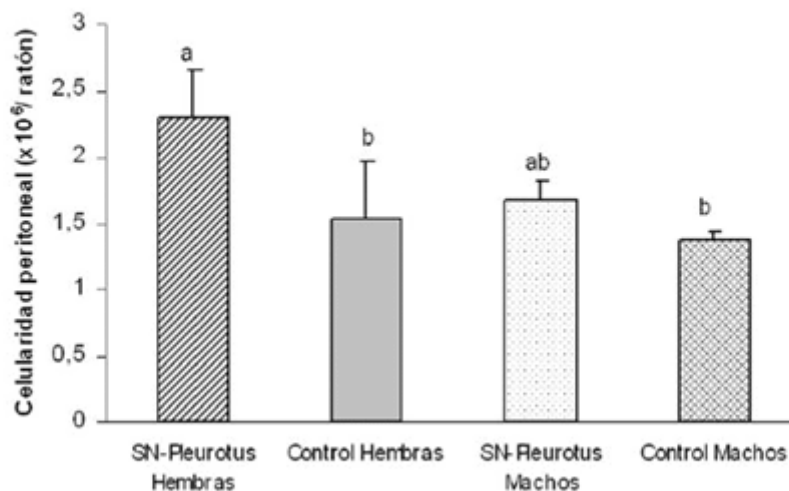


**Fig. 2.** Efecto de la suplementación con setas *Pleurotus* sp en la celularidad esplénica de ratones BALB/c.

Se observó, de manera similar, un incremento en el número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal en las hembras suplementadas oralmente con el preparado seco de *Pleurotus* sp. y en un menor grado en los machos tratados, en comparación con los grupos controles ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3).

Los resultados ( $\times 10^6/\text{ratón}$ ) se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n=5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Los resultados ( $\times 10^6/\text{ratón}$ ) se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n=5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Fig. 3.** Número de células en el exudado peritoneal de ratones BALB/c suplementados con setas *Pleurotus* sp.

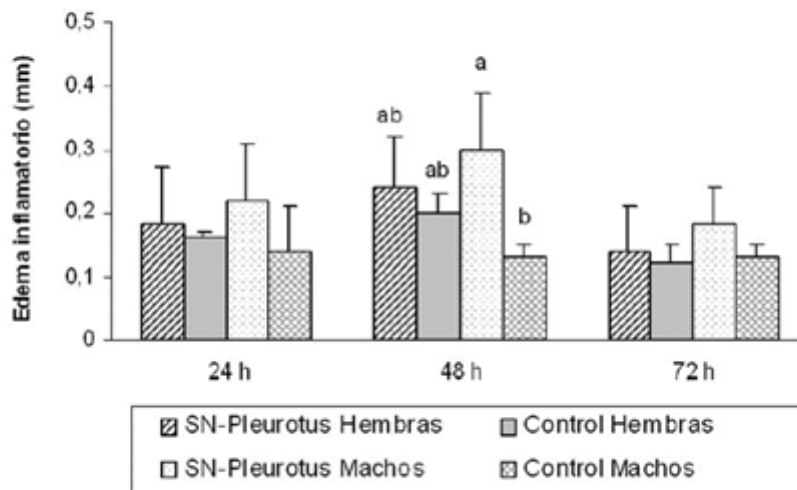


Efecto del biopreparado nutracéutico de *Pleurotus* sp. en la estimulación de la respuesta inmune celular *in vivo*

El biopreparado seco de *Pleurotus* sp., administrado durante 14 días a ratones previamente sensibilizados y retados con BSA, ejerció efectos diferenciados en dependencia del sexo. Los ratones machos tratados con el complemento nutricional mostraron una respuesta de HR superior a la del grupo control que resultó significativa a las 48 horas ( $p < 0,05$ ). Las hembras en cambio, mostraron valores comprendidos estadísticamente entre los machos tratados o no con el suplemento (Fig. 4).

La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema inflamatorio en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSTF. Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema inflamatorio en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSTF. Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).



**Fig. 4.** Respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) específica a la seroalbúmina bovina en ratones BALB/c suplementados con setas *Pleurotus* sp.

DISCUSIÓN

El elevado número de estudios que se registran en la actualidad en el campo de las setas comestibles y medicinales, avalan el enorme potencial de su uso como fuente de obtención de bionutrientes y/o compuestos con actividad medicinal. El desarrollo de nutracéuticos y/o suplementos nutricionales derivados tanto del micelio como de cuerpos fructíferos de las setas, representa una excepcional oportunidad en la profilaxis y el tratamiento complementario de enfermedades crónicas no transmisibles, las cuales presentan mundialmente una alta incidencia en la morbi-mortalidad.<sup>18,19</sup>

Por otro lado, las afectaciones que involucran el sistema inmunitario representan un elevado por ciento en la ocurrencia de las enfermedades crónicas no trasmisibles, tal es el caso del cáncer, las patologías asociadas el estrés oxidativo y las inmunodeficiencias de tipo secundaria.<sup>4</sup> De modo que prevenir y combatir estos padecimientos mediante la dieta y la incorporación de suplementos nutricionales, se vislumbra como una alternativa eficaz y desprovista de efectos secundarios perjudiciales.

El conocimiento del comportamiento de los elementos que incide en la respuesta inmunitaria y la evaluación de parámetros asociados a esta, constituiría un medio sensible y funcional de detección de la respuesta a una intervención determinada.<sup>20</sup> Un elemento a considerar es la influencia del sexo en la respuesta inmunitaria. Aunque ambos géneros exhiben el mismo sistema de defensa, la respuesta inmune frente a bacterias, virus, parásitos, alérgenos y auto-antígenos, es marcadamente diferente y dependiente del sexo, a esto se le conoce como "dimorfismo sexual", y ocurre tanto en humanos como en modelos animales.<sup>13,21</sup> Sin embargo, aún no se refieren estudios que evalúen la influencia del sexo en las variaciones de los parámetros inmunológicos como resultado de la administración de nutraceuticos y en particular, de los obtenidos a partir de setas comestibles-medicinales.

El presente trabajo propone, de forma preliminar, el efecto ejercido sobre el metabolismo y la función inmunitaria de un biopreparado seco obtenido a partir de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. administrado oralmente a ratones BALB/c inmunocompetentes de ambos sexos.

De forma general, no se apreciaron diferencias significativas asociadas a la diferencia del sexo en los niveles de hemoglobina y la concentración de proteínas séricas totales. Aunque estos indicadores bioquímicos se ven mayormente afectados antes cambios patológicos,<sup>22</sup> y el establecimiento de mecanismos regulatorios en condiciones normales evitan un posible desbalance metabólico, este resultado pudiera estar también asociado al período de suplementación con el bioproducto. En tal sentido, algunos estudios apoyan la idea de evaluar un mayor tiempo de intervención nutricional con suplementos o nutraceuticos, considerando que estos cambios bioquímicos y metabólicos se reflejan lentamente.<sup>23</sup>

Sin embargo, la síntesis de la fracción globulínica fue favorecida en las hembras con respecto a los ratones machos y los grupos controles. La relación albúmina/globulina ha sido un indicador muy utilizado para evaluar el comportamiento de las proteínas del suero en diversas enfermedades y trastornos nutricionales.<sup>24</sup>

Estas evidencias suponen un efecto diferenciado sobre poblaciones celulares, como es la posible estimulación tanto a nivel de los hepatocitos relacionados con la biosíntesis de las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$ , así como de las  $\gamma$ -globulinas por linfocitos B pre-activados. Al respecto, se ha comprobado que los estrógenos incrementan la respuesta de células B tanto *in vivo* como *in vitro*, de modo que las hembras de diferentes especies producen niveles más altos de inmunoglobulinas circulantes, y típicamente presentan una respuesta inmune de tipo humoral más pronunciada contra la infección; mientras los andrógenos disminuyen la producción de anticuerpos.<sup>14</sup>

Anteriormente, se refirió que el tratamiento con estrógenos a ratones hembras inmunocompetentes, indujo la activación clonal de linfocitos B. Este estudio, igualmente describió un efecto promotor *in vitro* de la maduración a células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas.<sup>25</sup>

El comportamiento de las poblaciones leucocitarias constituye otro indicador relevante en la evaluación de productos con potencial actividad sobre el sistema inmune, en específico aquellos provenientes de setas comestibles.<sup>26</sup> El conteo total de leucocitos en ratones de ambos sexos fue incrementado tras ser administrados con el suplemento en comparación con los grupos controles, aunque sin llegar a valores patológicos para la especie. Sin embargo, los ratones machos y hembras tratados con dicho nutraceutico respondieron con un aumento diferencial en el número de linfocitos y de polimorfonucleares, respectivamente.

El efecto positivo sobre la hematopoyesis en ratones tratados con diferentes fracciones obtenidas de setas comestibles ha sido informado en varios estudios, que exponen la acción moduladora de éstos, evidenciada por la liberación de citoquinas por linfocitos, macrófagos y neutrófilos.<sup>27-29</sup> Los resultados alcanzados en el presente estudio podrían estar relacionados con la estimulación de la producción de precursores de estas células en la médula ósea y probablemente también, con un aumento en su tiempo de vida media. No obstante, futuros trabajos deben estar encaminados a dilucidar el efecto específico del sexo sobre las distintas poblaciones leucocitarias cuando se evalúen productos con posible acción estimuladora en los procesos hematopoyéticos.

Por otra parte, el bazo es un importante órgano hematopoyético generador de linfocitos y monocitos, siendo estos últimos precursores de los macrófagos.<sup>30,31</sup> La celularidad esplénica observada fue superior en las hembras administradas oralmente con el biopreparado nutraceutico. En esta dirección, otros trabajos apoyan este efecto sobre la funcionalidad en los esplenocitos. Por ejemplo, ratones hembras sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y tratados oralmente con un extracto acuoso de *Agaricus blazei* incrementaron el balance Th1/Th2 a nivel de esplenocitos.<sup>32</sup> Sin embargo, otra fracción derivada de las setas secas de *Agaricus blazei* produjo el efecto contrario a nivel de células esplénicas de ratones BALB/c hembras, favoreciendo el aumento del número de linfocitos Th2 y con ello la producción de anticuerpos IgE anti-OVA.<sup>33</sup>

De manera general, la acción estimuladora del biopreparado nutraceutico de *Pleurotus* en este órgano puede estar asociada de igual manera a una activación funcional de las poblaciones celulares a nivel de este órgano, en dependencia del sexo. No obstante, la variabilidad en resultados obtenidos abre nuevas interrogantes que deben ser abordadas en futuros estudios, como ensayos de actividad funcional en esplenocitos y determinaciones histológicas.

En adición a los resultados presentados con anterioridad, se evaluó el efecto del suplemento de *Pleurotus* sobre macrófagos peritoneales. Los macrófagos son considerados una de las poblaciones leucocitarias más importantes debido a su función tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa.<sup>34</sup> Por otro lado, varios estudios han corroborado la presencia de receptores de membrana en estas células capaces de unir compuestos del tipo polisacárido  $\beta$ -glucanos, una de las principales moléculas bioactivas en hongos superiores.<sup>35</sup>

Aunque las hembras mostraron una respuesta superior, el incremento observado en ambos grupos supone un efecto activador en estas células por componentes presentes en el biopreparado de *Pleurotus*. Una posible explicación a este resultado, unida también al aumento en la proporción de polimorfonucleares neutrófilos en sangre observado en las hembras que recibieron el nutraceutico, es que esté relacionado con la síntesis de factores estimulantes de colonias (CSFs).

Se ha planteado que este efecto superior en las hembras pudiera estar dado por un elevado nivel de expresión de quimiocinas y receptores TLR (del inglés Toll-Like Receptor) en macrófagos peritoneales. También, se refiere que estas poblaciones exhiben mayor índice de fagocitosis y eliminación de microorganismos mediante la vía dependiente del oxígeno.<sup>13</sup>

Se ha demostrado que el 17- $\beta$ -estradiol (E2), incrementa la expresión de marcadores moleculares asociados al crecimiento y proliferación celular en células fagocíticas y fibroblastos.<sup>36</sup> En líneas celulares de macrófagos murinos, el estradiol incrementa la producción de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y disminuye la síntesis de IL-10 en cultivos estimulados con lipopolisacárido (LPS).<sup>37</sup>

Por su parte, un extracto derivado de *Pleurotus florida* incrementó la viabilidad celular y la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales aislados de ratones BALB/c inmunocompetentes y sugieren un efecto protector contra las infecciones.<sup>38</sup> Estas evidencias apoyan, además, la hipótesis de posibles compuestos presentes en el biopreparado capaces de unirse a receptores presentes en la membrana de estas células.

En el caso de la inmunidad específica, evaluada mediante la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada,<sup>39</sup> se observó un comportamiento superior en los machos tratados por vía oral con el suplemento de *Pleurotus*. En el caso de las hembras, este comportamiento resultó intermedio entre los ratones machos y los grupos controles. Este resultado indica un potencial efecto estimulador del suplemento de *Pleurotus* sobre la respuesta inmune mediada por células T (CD4<sup>+</sup> Th1), particularmente en machos.

Las subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> (Th1) actúan como células inductoras de la HR. El mecanismo comprende su inducción al primer contacto con el antígeno y luego ante la segunda exposición, se activan y secretan citocinas promotoras de la inflamación como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , potentes activadores de los macrófagos que se encuentran infiltrando los sitios inflamados.<sup>40</sup>

*Paulik* y colaboradores<sup>41</sup> demostraron el efecto en ratones de dos glucanos derivados de *Pleurotus ostreatus* y una levadura, en diferentes parámetros del sistema inmune. Ambos compuestos mostraron un incremento de la respuesta de HR respecto al control, aunque el glucano aislado de la seta comestible mostró una respuesta superior.

Este efecto activador *in vivo* en poblaciones CD4<sup>+</sup> Th1 por setas del género *Pleurotus*, fue referido también en un ensayo clínico realizado en voluntarios sanos que consumieron setas *Pleurotus cornucopiae*. Los resultados mostraron que, tras la ingestión durante ocho semanas, los niveles de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 se incrementaron significativamente en relación al grupo placebo. Los autores refieren también un aumento moderado de la actividad en células NK y resaltan, finalmente, la importancia de este estudio para combatir enfermedades infecciosas en humanos.<sup>23</sup> Aunque el estudio utilizó voluntarios sanos de ambos sexos, los resultados fueron expresados sin independencia del sexo, no permitiendo dilucidar si dicha actividad sobre poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1 puede ser también resultado de la influencia del género.

La mayor parte de los informes publicados hasta la fecha, exponen que las hembras muestran una mejor funcionalidad inmunológica ya sea mediante una potente inmunidad humoral, exhibiendo altos niveles de anticuerpos, así como una efectiva respuesta inmune mediada por células, en comparación con los machos.<sup>13,42</sup>

*Karpuzoglu* y colaboradores,<sup>43</sup> mostró que la exposición a estrógenos *in vivo*, polariza la respuesta en linfocitos hacia un perfil Th1 mediante la promoción de la expresión del factor de transcripción T-bet, proceso regulado en parte por el IFN- $\gamma$  y la IL-27. No obstante, otro trabajo exhibió que en el hámster de Siberia las hormonas sexuales esteroideas potencian la respuesta inmune celular tanto en machos como en hembras.

Las evidencias derivadas del presente estudio en relación con la respuesta inmune celular sugieren, que la posible función inmunoreguladora de las hormonas sexuales no está del todo esclarecida y que, por tanto, no se puede determinar si un esteroide en específico presenta un efecto en particular. Los andrógenos y los estrógenos tienen un impacto sobre la funcionalidad del sistema inmune y se encuentran relacionados con diversas enfermedades del sistema inmune. El mecanismo por el cual actúan es atribuido, principalmente, a interacciones con receptores presentes en algunas células inmunes, de las cuales se derivan los procesos de maduración, activación y diferenciación. Estas hormonas podrían suprimir o activar la función celular en base a estímulos diferentes en el tejido blanco, proporcionando, en parte, una explicación a las diferentes susceptibilidades referidas entre sexos, en relación a determinadas infecciones, patologías asociadas a la inflamación crónica y en procesos autoinmunes.<sup>13,44,45</sup>

A pesar de que en futuros estudios se debe profundizar en la influencia del sexo sobre la respuesta inmune cuando se evalúan productos con potencial actividad inmunoestimuladora, en particular aquellas formulaciones que se derivan de setas comestibles, el empleo de *Pleurotus* como "ingrediente" para el desarrollo, procesamiento y diseño de suplementos nutricionales se vislumbra como una alternativa promisoriosa en la profilaxis y el tratamiento complementario en diversos estados patológicos. Los resultados obtenidos avalan, así, la inserción de las setas *Pleurotus* para ser empleadas como nutraceutico. Por otra parte, el estudio muestra los primeros resultados en animales inmunocompetentes tratados con setas comestibles y sugiere la estimación de algunos de estos marcadores de inmunomodulación tanto en estudios con biomodelos experimentales como en intervenciones nutricionales en la práctica clínica.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Prakash A, Saha H, Sumeetha V. Nutraceuticals: a functional food as the anti-aging drug and neuroprotective agent. *Res J of Pharm, Bio and Chem Sci.* 2014;5:936-43.

2. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Ichwan SJ, Soundharrajan I, Govindan N, et al. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(3):173-81.
3. Elsayed A, El Enshasy H, Wadaan M, Aziz R. Mushrooms: A potential natural source of anti-Inflammatory compounds for medical applications. *Mediators of Inflammation*. 2014;Article ID 805841.
4. Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O. Edible Mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *Int J of Microbiol*. 2015;Article ID 376387.
5. Smiderle FR, Baggio CH, Borato DG, Santana-Filho AP, Sasaki GL, Iacomini M, et al. Anti-inflammatory properties of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* might be related to its linear (1→3)-β-D-glucan. *Plos ONE*. 2014;9(10):e110266.
6. Baskaran A, Chua KH, Sabaratnam V, Ravishankar M, Kuppusamy UR. *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. *BMC Complementary and Alter Med*. 2017;17:40.
7. Öztürk M, Tel G, Aydoğmuş F, Öztürk M, Duru E. The cooking effect on two edible mushrooms in Anatolia: fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anticholinesterase activities. *Records of Nat Prod*. 2014;8(2):189-94.
8. Wasser SP. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical J*. 2014;37(6):345-56.
9. Deepalakshmi K, Mirunalini S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *J of Biochem Technol*. 2014;5(2):718-26.
10. Gregori A, Švagel M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food of Technol Biotechnol*. 2007;45:238-49.
11. Shamtsyan MM, Konusova VG, Goloshchev AM, Maksimova YO, Panchenko AV, Petrishchev NN, et al. Immunomodulating and anti-tumor effects of basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: fr) P. Kumm and *Pleurotus conuicipiae* (Pau. Ex Pers.) Rollan. *J of Bio and Physiological Chem*. 2004;4(3):157-61.
12. Wong JH, Ng TB, Cheung RCF, Ye XJ, Wang HX, Lam SK, et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiol Biotechnol*. 2010;87(4):1221-35.
13. Scotland R, Stables MJ, Madalli S, Watson P, Gilroy DW. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood*. 2011;118 (22):5918-27.
14. Giefing-Kröll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstein B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. 2015;14:309-21

15. Mc Murray JR. Plasma Proteins. In: A.H. Gowenbock, Eds. Practical Clinical Biochemistry. Heinemann, Oxford; 1988. p. 401-435.
16. Kim YSW, Maslinski XX, Zheng AC, Stevens XC, Li GH, Tesch VR, et al. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fcγ 2a protein blocks delayed type hypersensitivity. J of Immunol. 1998;160:5742-8.
17. Charles Rivers Inc. BALB/c mice hematology. North American Colonies. 2012 [citado 26 de octubre de 2012]. Disponible en: <https://www.criver.com/sites/default/files/.../BALBcMouseClinicalPathologyData.pdf>
18. Tolera KD, Abera S. Nutritional quality of Oyster Mushroom ( *Pleurotus Ostreatus*) as affected by osmotic pretreatments and drying methods. Food Sci Nut. 2017;5(5):989-96.
19. Rathore H, Prasad S, Sharma S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. PharmaNutrition. 2017;5 35-46.
20. Shankar AH. Modulación nutricional de la función inmunitaria y de la enfermedad. Infecciosa. En: Bowman y Russell A, editores. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; 2003. p. 746-61.
21. Ruggieri A, Anticoli S, D'Ambrosio A, Giordani L, Viora M. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. Ann Ist Super Sanità. 2016;52(2):198-204.
22. Tothova C, Nagy O, Kovac G. Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. Veterinarni Medicina. 2016;61:(9):475-96.
23. Tanaka A, Nishimura M, Sato Y, Sato H, Nishihira J. Enhancement of the Th1-phenotype immune system by the intake of Oyster mushroom (Tamogitake) extract in a double-blind, placebocontrolled study. J of Traditional and Complementary Med. 2016;6:424-30.
24. Zhang Z, Pereira S, Luo M, Matheson EM. Evaluation of blood biomarkers associated with risk of Malnutrition in older adults: A systematic review and meta-analysis. Nutrients. 2017;9(8):829
25. Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. Int Immunopharmacol. 2001;1:983-93.
26. Vitak T, Yurkiv B, Wasser S, Nevo E, SybirnaN. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus. World J Diabetes. 2017;8(5):187-201.
27. Yu S, Weaver V, Martin K, Cantorna MT. The effects of whole mushrooms during inflammation. BMC Immunol. 2009;20:10-2.
28. Kyakulaga AH, Ogwang PE, Obua C, Nakabonge G, Mwavu E. Immunomodulatory effects of aqueous extracts of *Auricularia* sp. and *Pleurotus* sp. mushrooms in cyclophosphamide immunosuppressed Wistar Rats. British J of Pharm Res. 2013;3(4):662-70.

29. Paterson RM, Lima N. Biomedical effects of mushrooms with emphasis on pure compounds. *Biomedical J.* 2014;37(6):357-68.
30. Cesta M. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Tox Pathology.* 2006;34:455-65.
31. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* 2013;14, 39(5):806-18.
32. Bouike G, Nishitani Y, Shiomi H, Yoshida M, Azuma T, Hashimoto T, et al. Oral treatment with extract of *Agaricus blazei* Murill enhanced Th1 response through intestinal epithelial cells and suppressed OVA-sensitized allergy in mice. *Evidence-Based Complementary Alt Med.* 2011; Article ID 532180.
33. Ni WY, Wu MF, Lio NCH, Yeh MY, Lu HF, Hsueh SH, et al. Extract of medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill enhances the non-specific and adaptive immune activities in BALB/c mice. *In vivo.* 2013;27:779-86.
34. Sun H, Zhang J, Chen F, Chen X, Wang H, Zhou Z, et al. Activation of RAW 264.7 macrophages by the polysaccharide from the roots of *Actinidia eriantha* and its molecular mechanisms. *Carbohydrate Polymers.* 2015;121:388-402.
35. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6) glucans. *Mycol Res.* 2007;111:635-52.
36. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus.* 2004;13(9):635-8.
37. De León MA, Morales J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Rev Invest Clín.* 2006;58(2):161-9.
38. Ghazanfari T, Roya Y, Zohre F, Batool R. Macrophages activation and nitric oxide alterations in mice treated with *Pleurotus florida*. *Immunopharmacol and Immunotoxicol* 2010;32(1):47-50.
39. Limaye S. Tests for cell-mediated immunity. *Australian Prescriber.* 2010;33:3.
40. Abbas AK, Lichtman A. Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 9<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2017.
41. Paulik S, Svrcec K, Mojzisova J, Durove A, Benisek Z, Huska M, et al. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan ( *Pleurotus ostreatus*) on delayed-hypersensitivity and phagocytic ability of blood leukocytes in mice. *J of Med Veterinary Bio.* 1996;43:129-35.
42. Bhatia A, Sekhon H, Kaur G. Sex Hormones and Immune Dimorphism. *The Sci World J.* 2014;ID 159150.
43. Karpuzoglu E, Phillips RA, Gogal RM Jr, Ahmed S. IFN-gamma-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12. *Mol Immunol.* 2007;44(7):1808-14.



44. Angele M, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis Cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2014;5(1):12-9.

45. Fischer J, Jung N, Robinson R, Lehmann C. Sex differences in immune responses to infectious diseases. *Infection*. 2015;43(4):399-403.

Recibido: 18 de junio de 2018.

Aprobado: 25 de agosto de 2018.

*Gabriel Llauradó*. Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba, Cuba.  
Correo electrónico: [gabriel@uo.edu.cu](mailto:gabriel@uo.edu.cu), [gabocuba@gmail.com](mailto:gabocuba@gmail.com)