



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO

Anatomía y Radiología

TESIS DOCTORAL:

**OBTENCIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS
RICOS EN COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR
DE HONGOS COMESTIBLES. VALORACIÓN, *IN*
VITRO, DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIINFLAMATORIA DE LOS EXTRACTOS**

Presentada por Carlos Moro Lagares para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. Ana María García-Lafuente



AUTORIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO O COMISIÓN ACADÉMICA RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO A LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

El departamento de (1)
(2) La Comisión Académica del Doctorado en *Investigación en Ciencias de la Salud*
en su reunión de fecha *7* de *octubre* de *2015*, acordó autorizar la presentación de la siguiente Tesis Doctoral, al considerar que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente:

Título: *.OBTENCION DE EXTRACTOS METANÓLICOS RICOS EN COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE HONGOS COMESTIBLES. VALORACIÓN, IN VITRO, DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE LOS EXTRACTOS*

Autor/a: D/D^a. MORO LAGARES, CARLOS
con D.N.I. nº 72882108-F

Director/es: Dr. GARCÍA LAFUENTE, ANA MARÍA DNI 16796958-N

(Apellidos, nombre y D.N.I.)

Valladolid, *15* de *octubre* de 20 *15*.

El Director del Departamento/Presidente Comisión Académica

Fdo.:

Maria J. Bermejo Rodríguez

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

(1) para los programas regulados por el R.D. 185/1985, R.D. 778/1998

(2) para los regulados por el R.D. 56/2005, R.D. 1393/2007 y R.D. 99/2011



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D^a ANA M^a GARCÍA LAFUENTE, con DNI 16796958-N, investigadora contratada en el Centro para la Calidad de los Alimentos, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, como directora de la Tesis Doctoral titulada:

Obtención de extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos a partir de hongos comestibles. Valoración, *in vitro*, de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos.

Presentada por D. **Carlos Moro Lagares**, alumno del programa de doctorado "Investigación en Ciencias de la Salud" impartido por el Departamento de Anatomía y Radiología, autoriza la presentación de la misma, considerando que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Soria, 13 de octubre de 2015

El Director de la Tesis,

Fdo.: Ana M^a García Lafuente

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación;
proyecto de investigación (RTA2009-0049) y subprograma FPI-INIA 2008.

A Miguel y Mikel

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones sin las cuales, no habría podido realizar este trabajo:

A mi familia y amigos por apoyarme constantemente.

A los compañeros con quienes trabajé en el Centro para la Calidad de los Alimentos: a Laura García, Félix Andrés y José Manuel Muñiz por prestarme toda su ayuda y agradables momentos, tanto en el laboratorio, como fuera de él, a mis compañeros de beca: Irene Palacios, Noelia Manchón y Miguel Lozano, por ser tan buenos compañeros y mejores personas. Suerte a todos. A Rosario Vicente, M^a Jesús Maján y a los investigadores: Matilde D'Arrigo, Eva Guillamón, Laura Mateo, Ana Villares, Mauricio Ariel Rostagno, José Alfredo Martínez y Álvaro Ramos por su gran profesionalidad.

También quiero dar las gracias a la Profesora Alicia Gonzalo, por concederme la oportunidad de trabajar ella en la Universidad de Valladolid, así como por su amabilidad.

Al Dr. Schneider y todas las personas con las que trabajé durante mi estancia en el Instituto de Ciencias de la Vida, de la Universidad de Lovaina la Nueva, especialmente a Thérèse Sergent, Pauline Beguin, Julie Winand y Aurelie Joly, pero sobretodo a Alina Matirosyan.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación y al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y de los Alimentos (INIA) por la concesión de la beca que me permitió desarrollar este trabajo.

Y en último lugar pero no por ello menos importante, sino todo lo contrario, de manera muy especial, quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a mi Directora de Tesis, la Doctora Ana María García Lafuente, por apostar por mí desde el principio, por brindarme la oportunidad de trabajar contigo y aprender de ti, por tu permanente atención, sacrificio y consejos durante la dirección de este trabajo. Por todo ello y tanto más, muchísimas gracias Ana.

A todos quienes, de una manera u otra, me habéis ayudado a finalizar este trabajo, gracias.

Los resultados expuestos en la presente Memoria de Tesis Doctoral han sido presentados y publicados en:

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS INTERNACIONALES:

- García-Lafuente, A., **Moro, C.**, Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M. A., D'Arrigo, M., Martínez, J. A. (2010). Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 125-141.
- Palacios, I., Lozano, M., **Moro, C.**, D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128, 674–678.
- **Moro, C.**, Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130, 350-355.
- **Moro, C.**, Villares, A., Guillamón, E., Mateo-Vivaracho, L., García-Lafuente, A. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in inflammatory cocktail activated Caco-2 cells. (enviado).

CONGRESOS:

- **5th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH)**

“Anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages”. (*PÓSTER*)

Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D’Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A. Sitges, Barcelona (España), 17-20 de Octubre de 2011.

- **EURO FOOD CHEM XVIII. Upcoming challenges in food science**

“Anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from edible mushrooms in Caco-2 cells”. (*PÓSTER*) García-Lafuente, A., **Moro, C.**,

Guillamón, E., D’Arrigo, M., Fernández-León, M. F., Mateo-Vivaracho, L., Pedrosa, M. M. Madrid (España), 13-16 de Octubre de 2015.

ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro

ABTS: Ácido 2,2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolina) - 6-sulfónico

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

A-MuLV: Virus de leucemia Abelson

APR: Respuesta de fase aguda

BHA: Butilhidroxianisol

BHT: Butilhidroxitolueno

β -PE: Proteína ficoeritrina- β

CAT: Catalasa

CI: Colitis indeterminada

Con A: Concavalina A

COX: Ciclooxygenasa

CRP: Proteína C reactiva

Ct: Ciclo umbral

CU: Colitis ulcerosa

DAS: Sándwich de doble anticuerpo

DC: Células dendríticas

DE: Desviación estándar

DMEM: Medio Dulbecco's modified Eagle's

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EC: Enfermedad de Crohn

ECACC: Colección europea de cultivos celulares

EGCG: Galato de epigallocatequina

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal crónica

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

FBS: Suero fetal bovino

FIPs: Proteínas inmunomoduladoras de los hongos

FRAP: Reducción del hierro - Poder antioxidante

FRET: Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

GA: Ácido ganodérico

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GAE/g: Miligramos de equivalentes de ácido gálico/gramo de hongo seco

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GSH-Px: Glutatión peroxidasa

GTE: Extracto del té verde

HEPA: Filtro de aire de alta eficacia

HIV: Virus de la inmunodeficiencia adquirida humana

hPBLS: Linfocitos de la sangre periférica de humanos

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HRPO: Enzima estreptavidina-peroxidasa de rabanillo picante

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1

IFN- γ : Interferon *gamma*

IkB: Inhibidor de *kappa* B

IL: Interleuquina

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IL1R1: Receptor de la interleuquina-1, tipo1

JNK: Quinasas c-Jun N-terminal

L-II: Polisacárido aislado de *Lentinus edodes*

LE: Complejo polisacárido-péptido de *Lentinus edodes*

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LPME: Extracto de micelio de *Lentinus polychrous*

LPS: Lipopolisacárido de pared bacteriana

MAPKs: Proteín quinasas activadas por mitógenos

MF: Materia fresca

MIP-1: Proteína inhibitoria de macrófagos-1

MIQE: Información mínima requerida para la publicación de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real

MS: Materia seca

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2 il)-2,5-difenil tetrazolio

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NF- κ B: Factor nuclear de transcripción *kappa* B

NHPs: Productos naturales saludables

NK: Células natural killer

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

OL-2: Complejo polisacárido-proteína de *Omphalia lapidescens*

ORAC: Capacidad de absorción del radical de oxígeno

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica humana

PBS: Tampón fosfato salino

PCK: Proteín quinasa K

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGs: Prostaglandinas

PL: Polisacárido ácido de *Phellinus linteus*

PSP: Polisacárido-péptido de *Trametes versicolor*

PSPC: Complejo polisacárido-proteína de *Tricholoma lobayense*

PSK: Polisacárido Krestin de *Trametes versicolor*

PTK: Proteín tirosina quinasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RQI: Índice de calidad del RNA

RT: Retrotranscripción

SOD: Superóxido dismutasa

SPE: Extracción en fase sólida

SSG: β -glucano de *Sclerotinia sclerotiorum*

Tc: Linfocitos T citotóxicos

TE/g: Equivalentes de Trolox/gramo de hongo

Th: Linfocitos T helper

TNF- α : Factor de necrosis tumoral *alfa*

TRAP: Potencial antioxidante total

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. INFLAMACIÓN	3
I.1.1. Mediadores inflamatorios	4
I.1.2. Modulación de la inflamación a través de la dieta	8
I.1.3. Mecanismos de acción	12
I.1.4. Inflamación intestinal	13
I. 2. COMPUESTOS FENÓLICOS	19
I.2.1. Propiedades saludables de los compuestos fenólicos	19
I.2.2. Biodisponibilidad	21
I.2.3. Clasificación y características de los principales grupos de compuestos fenólicos	22
I.3. HONGOS	29
I.3.1. Características generales	29
I.3.2. Importancia de los hongos	31
I.3.3. Propiedades medicinales de los hongos	32
I.3.4. Hongos comestibles	38
I.3.4.1. Composición nutricional	39
I.3.4.2. Composición funcional	45
I.3.5. Los hongos como alimento funcional	51
I.3.5.1. Actividad hepatoprotectora	52
I.3.5.2. Actividad antiosteoporótica	53
I.3.5.3. Actividad antimicrobiana	54
I.3.5.4. Actividad antiviral	56
I.3.5.5. Actividad antitumoral	57
I.3.5.6. Actividad hipolipemiante	60
I.3.5.7. Actividad antiaterogénica	61
I.3.5.8. Actividad antioxidante	61
I.3.5.9. Actividad inmunomoduladora	63
I.3.5.10. Actividad antiinflamatoria	71

I.4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	75
II. OBJETIVOS	77
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
III.1. HONGOS COMESTIBLES.....	83
III.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE HONGOS COMESTIBLES.....	87
III.2.1. Materiales y reactivos	87
III.2.2. Obtención de extractos.....	88
III.2.3. Valoración del contenido de compuestos fenólicos totales.....	91
III.2.4. Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos...	92
III.2.5. Capacidad antioxidante de los extractos	94
III.3. MODELO EXPERIMENTAL: LÍNEAS CELULARES.....	99
III.3.1. Equipos de cultivo celular	99
III.3.2. Materiales y reactivos	102
III.3.3. Línea celular RAW 264.7	103
III.3.4. Línea celular CACO-2	113
III.4. VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS	119
III.4.1. Ensayos de citotoxicidad	119
III.4.1.1. Ensayos de citotoxicidad en la línea celular RAW 264.7.....	120
III.4.1.2. Ensayos de citotoxicidad en la línea celular Caco-2.....	121
III.4.2. Ensayos de actividad antiinflamatoria.....	123
III.4.2.1. Valoración de producción de óxido nítrico.....	123
III.4.2.2. Valoración de citoquinas en sobrenadantes	126

III.4.2.3. Valoración de la expresión de genes proinflamatorios	131
III.4.2.3.1. Extracción y valoración de ARN	132
III.4.2.3.2. Retrotranscripción	136
III.4.2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (q-PCR).....	136
 III. 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	143
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	145
 IV.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE HONGOS COMESTIBLES.....	147
IV.1.1. Valoración del contenido de compuestos fenólicos totales.....	147
IV.1.2. Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos .	152
IV.1.3. Capacidad antioxidante de los extractos.....	161
IV.1.4. Relación entre composición fenólica de los extractos y capacidad antioxidante.....	164
 IV.2. VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS	167
IV.2.1. EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7	167
IV.2.1.1. Ensayos de citotoxicidad	167
IV.2.1.2. Efecto de los extractos sobre la producción de NO	170
IV.2.1.3. Efecto de los extractos sobre la expresión de genes proinflamatorios.....	172
IV.2.1.4. Efecto de los extractos sobre la producción de citoquinas proinflamatorias	178
 IV.2.2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN LA LÍNEA CELULAR CACO-2	187
IV.2.2.1. Ensayos de citotoxicidad	189
IV.2.2.2. Efecto de los extractos sobre la producción de NO.....	195

IV.2.2.3. Efecto de los extractos sobre la expresión de genes proinflamatorios.....	197
IV.3. RELACIÓN ENTRE COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	207
IV.3.1. Relación entre composición fenólica de los extractos y actividad antiinflamatoria en la línea celular RAW 264.7.....	207
IV.3.2. Relación entre composición fenólica de los extractos y actividad antiinflamatoria en la línea celular Caco-2.....	211
V. CONCLUSIONES	217
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	221
VII. ANEXO: TRABAJOS PREVIOS.....	251

I. INTRODUCCIÓN

I.1. INFLAMACIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa natural basado en un conjunto de alteraciones bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas que se originan en respuesta a estímulos nocivos para el organismo como infecciones, lesiones, irritaciones, etc. Su finalidad es suprimir los patógenos, subsanar el daño tisular y restablecer la homeostasis del lugar donde se produjo la infección o el daño (Barton 2008).

La inflamación puede ser considerada como un arma de doble filo: constituye un mecanismo defensivo para eliminar patógenos invasores y para iniciar el proceso de curación, pero la sobreproducción de los productos inflamatorios puede conducir al daño de las propias células, a la inflamación crónica e incluso a la transformación neoplásica (Mantovani 2008).

Por ello, la respuesta inflamatoria debe estar correctamente regulada, ya que de lo contrario puede ser perjudicial para el organismo. Así, desaparece con rapidez una vez que ha desarrollado sus funciones, mediante la acción de mecanismos antiinflamatorios como la secreción de citoquinas antiinflamatorias, la inhibición de las cascadas de señalización de las citoquinas pro-inflamatorias, y la activación de células regulatorias. Cuando esto no sucede, la respuesta inflamatoria puede cronificar, lo cual puede ocasionar otras enfermedades que cuentan con algún componente inflamatorio en su patogénesis, como hipertensión, disfunción endotelial, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes, diabetes tipos I y II, enfermedades neurodegenerativas, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, musculoesqueléticas degenerativas, asma, artritis reumatoide, inflamación crónica intestinal e incluso cáncer (Barton 2008).

La inflamación crónica se caracteriza por respuesta ante estímulos normales, infiltración de un gran número de células inflamatorias en sitios en los que normalmente no deberían encontrarse en abundancia y superproducción de

oxidantes, citoquinas, quimioquinas, eicosanoides, y metaloproteinasas de matriz (Posadas, Terencio et al. 2000).

La inflamación aguda se origina principalmente debido a la presencia de agentes extraños o microorganismos patógenos, mientras que la crónica corresponde esencialmente a causas relacionadas con el estilo de vida de las personas como mala nutrición, inactividad, sueño deficiente o tabaquismo, así como a factores ambientales que les rodean como estrés, depresión o contaminación ambiental.

I.1.1. Mediadores inflamatorios

La activación de células inflamatorias, entre ellas monocitos y macrófagos, juega un papel fundamental en la inmunidad innata. Dichas células participan en los mecanismos de defensa del organismo contra la infección mediante la fagocitosis y la reacción inflamatoria. En el curso de la activación por patógenos se producen una serie de mediadores inflamatorios:

Óxido nítrico (NO).- El NO es un mediador celular que participa en abundantes procesos fisiológicos y patológicos. Su síntesis es llevada a cabo a partir de L-arginina por 3 isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS). Las isoformas nNOS y eNOS producen, de un modo constante, bajos niveles de NO, imprescindibles para numerosas funciones biológicas como neurotransmisión, relajación de la musculatura lisa o mantenimiento de la homeostasis vascular. En cambio, iNOS se expresa como respuesta a varios estímulos inflamatorios como lipopolisacáridos de pared bacteriana (LPS) y ciertas citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α), interleuquina-1 (IL-1), interferon *gamma* (IFN- γ), etc. (Moncada, Palmer et al. 1992). La superproducción de NO por la sobreactividad de la enzima inducible iNOS, puede originar efectos indeseables presentes en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias. Así, la acumulación de esta molécula, como de otras especies reactivas de oxígeno (O_2^- ,...) pueden mediar en una amplia variedad enfermedades como

aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y cáncer (Stokes, Cooper et al. 2002).

Prostaglandinas.- Son sintetizadas por las enzimas ciclooxigenasas (COX) a partir del ácido araquidónico. Dichas enzimas catalizan la síntesis de la prostaglandina G₂, que es una molécula inestable e intermedia, que mediante la acción de la actividad peroxidasa de la COX es posteriormente transformada a prostaglandina H₂. Ésta es la precursora de abundantes prostaglandinas (PGs) como PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGL₂ (o prostaciclina) y el tromboxano A₂, que son sintetizadas mediante la actividad de prostaglandinas sintetasas especializadas (Greenhough, Smartt et al. 2009).

Desde el año 1990 se conocen dos isoformas diferentes de la enzima COX, la COX-1 y la COX-2. COX-1 se expresa en casi todos los tejidos de manera constitutiva produciendo PGs para el mantenimiento de procesos fisiológicos comunes como modulación de respuestas inmunes, protección de la mucosa intestinal, mantenimiento de la homeostasis renal, regulación y coagulación del flujo sanguíneo. COX-2 se induce por células del sistema inmune, como los macrófagos, a modo de respuesta ante infecciones, heridas o diferentes tipos de estrés, produciendo cantidades altas de PGs que originan el estado inflamatorio, la sudoración, el dolor y la fiebre (Funk 2001).

Citoquinas.- Las citoquinas son péptidos y proteínas de bajo peso molecular, pleiotrópicas y que pueden ser virtualmente producidas por todas las células nucleadas del cuerpo como respuesta al estrés fisiológico.

Se trata de péptidos de síntesis *de novo* que actúan regulando la respuesta inmune mediante la acción directa sobre las células inmunes así como también, por medio de moléculas de adhesión que interaccionan con dichas células. Algunas de ellas como IL-1, IL-6, IL-8, o TNF, originan el infiltrado celular y el daño tisular representativos de la inflamación (Abbas and Lichtman 2004).

La IL-1β es una de las citoquinas proinflamatorias más importantes ya que activa distintos tipos de células que participan en la respuesta inflamatoria como

monocitos macrófagos y neutrófilos. Es producida por macrófagos, células endoteliales y algunas células epiteliales, en forma de un precursor inactivo, que posteriormente, mediante la acción de proteasas, adquiere su forma funcional. Es causante de la fase aguda de la respuesta inflamatoria *in vivo*, origina la aparición de fiebre, síntesis aguda de proteínas, anorexia y somnolencia, induce las respuestas inmunes adaptativas Th1 y Th17 y la liberación de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α y la IL-6 (Netea, Simon et al. 2010).

La IL-6 es una citoquina multifuncional que juega un papel muy importante en la defensa del organismo debido a su amplio rango de funciones inmunes, hematopoyéticas y a su potente habilidad para inducir la respuesta de fase aguda (APR), (Nishimoto, Kishimoto et al. 2000).

La interlequina-6 es producida por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Los factores que intervienen en la inducción de su síntesis son varios como IL-1, TNF, IL-2, IFN, factor de crecimiento plaquetario, y LPS. Entre sus funciones destaca la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas, aunque también es capaz de activar a los linfocitos T, modular la hematopoyesis y junto a la IL-1 es responsable de la producción de proteínas de fase aguda en el hígado, especialmente fibrinógeno y proteína C reactiva (CRP) (Abbas and Lichtman 2004).

En algunas condiciones fisiopatológicas crónicas caracterizadas por cierto grado de inflamación como aterosclerosis, artritis reumatoide y diabetes, se han detectado niveles circulantes de IL-6 demasiado altos (Nishimoto, Kishimoto et al. 2000).

La IL-8 es una citoquina proinflamatoria, que actúa como potente factor quimiotáctico de neutrófilos, cuya acumulación en los tejidos, es uno de los principales signos de inflamación. La vida media de esta interlequina es mucho mayor que la de la mayoría de citoquinas (días e incluso semanas, frente a horas), por lo que una vez producida por estímulos de inflamación aguda, puede permanecer activa durante

mucho tiempo. Lo cual hace que amplifique la respuesta inflamatoria local. Su síntesis se realiza en fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Además, regula la producción de proteínas de adhesión, la formación de lípidos bioactivos y estimula la angiogénesis (Bickel 1993).

El TNF- α es una citoquina producida por macrófagos y linfocitos T clave en la respuesta inflamatoria, debido a que es capaz de aumentar dicha respuesta a través de distintas vías como la producción sinérgica de NO, o la estimulación de la secreción de IL-1 y quimioquinas. Además, puede originar la apoptosis y la degradación de tejidos, y estimular el reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos hacia los focos de infección (Abbas and Lichtman 2004). Es producido en pequeñas cantidades cuando las células no han sido estimuladas, siendo su mayor inductor LPS, no obstante su transcripción también se induce por la acción de de IL-3, IL-1, GM-CSF y de IFN- γ (Park, Rimbach et al. 2000). El TNF- α fue descubierto como un péptido poseedor de efectos antitumorales, debido a que es citotóxico para células cancerosas e inductor de la respuesta inmune antitumoral tras ser administrado *in vivo*. También estimula la adhesión de leucocitos al endotelio mediante la inducción de ICAM-I, la activación y quimiotaxis de polimorfonucleares y la activación de monocitos incrementando la producción de mediadores inflamatorios como IL-6 e IL-8 (Aarons and Borish 1993).

La modulación de la producción de estos mediadores inflamatorios se ha convertido en una diana en la búsqueda de agentes terapéuticos que puedan frenar la respuesta inflamatoria en su evolución a la cronicidad. En este sentido los compuestos funcionales naturales así como los presentes en la dieta se han presentado como grandes candidatos a la hora de intentar prevenir enfermedades crónicas que presentan una base inflamatoria.

I.1.2. Modulación de la inflamación a través de la dieta

La prevención de varias enfermedades puede ser favorecida en gran parte por ciertos factores ambientales entre los que cabe destacar la dieta. Una de las primeras evidencias de ello fue el Seven Countries Study, que se llevó a cabo en 1960 y que estableció conexiones entre patrones dietéticos y enfermedades cardiovasculares (Keys, Menotti et al. 1986). De hecho, ese estudio trajo consigo las primeras pruebas de que los hábitos dietéticos de las regiones del mediterráneo poseían propiedades cardioprotectoras en comparación con los de las regiones del oeste. Esto es, baja proporción de grasas saturadas y alta de monoinsaturadas y poliinsaturadas omega-3, abundante consumo de frutas y verduras, y moderado de vino; frente a alta proporción de grasas saturadas y azúcares simples y baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3.

Dicha observación inicial es hoy en día un hecho que se ha visto confirmado por varios estudios epidemiológicos como el Lyon Diet Heart Study (de Legeril, Salen et al. 1999) o recientes ensayos pertenecientes al proyecto PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea), que demuestran que la dieta mediterránea puede reducir considerablemente el riesgo de padecer en enfermedades cardiovasculares (Martínez-González, Salas-Salvadó et al. 2015). Sin embargo la dieta mediterránea también contribuye a la prevención de otras enfermedades como la diabetes (Salas-Salvado, Bullo et al. 2014), el estrés oxidativo y el estado inflamatorio (Massaro, Scoditti et al. 2010) (Badimon, Vilahur et al. 2010).

El que ya en la infancia se observen síntomas de inflamación es indicativo de que enfermedades crónicas relacionadas con la inflamación cada vez están apareciendo antes. El hecho de que la dieta sea uno de los factores de riesgo para desarrollar una inflamación crónica, y sea asimismo un factor modulable, la convierten en un punto sobre el que poder incidir para su prevención y probablemente para su tratamiento. De hecho, diversos estudios han probado que diferentes componentes de la dieta pueden modular vías implicadas en el control de la inflamación como rutas de

señalización intracelular, actividad de factores de transcripción y generación de mediadores inflamatorios (Calder, Albers et al. 2009).

A este respecto, la dieta mediterránea ha generado un enorme interés debido a su potencial antiinflamatorio. Se ha demostrado que esta dieta afecta de manera positiva en el estado inflamatorio, disminuyendo los niveles de marcadores como TNF- α , IL-6, CRP, ICAM-1, VCAM-1 y homocisteína. Las pautas dietéticas de occidente, escasas en antioxidantes y fibra, distinguidas por el consumo de almidones refinados, azúcar, y ácidos grasos saturados y trans, producen una fase postprandial casi continua, que muchas veces provoca la activación crónica del sistema inmune innato, al revés de lo que sucede con la dieta mediterránea (Wärnberg, Gómez-Martínez et al. 2009).

Se ha demostrado que el incremento del consumo de aceite de oliva (15 frente a 26,8 g/día), frutas, legumbres, frutos secos y vegetales (198 frente a 487 g/día) en sujetos que padecen síndrome metabólico, causa una reducción significativa de los niveles de IL-6, IL-7, IL-8 y CRP (Esposito, Marfella et al. 2004). De la misma manera, un mayor consumo de frutas y vegetales se asociaba de manera independiente con menores concentraciones de CRP, homocisteína y con una menor expresión de ARNm de ciertos marcadores proinflamatorios (ICAM1, IL1R1, IL-6, TNF- α y NF- κ B) (Hermsdorff, Zulet et al. 2010).

Modulación de la inflamación mediante citoquímicos

La medicina tradicional siempre se ha surtido de extractos procedentes de distintas plantas para la cura de un vasto rango de enfermedades, entre las que se incluyen la inflamación aguda y la crónica. Por ello, los denominados NHPs (Productos naturales saludables), han cobrado un gran interés en los últimos tiempos, como alternativas para la prevención y tratamiento de este tipo de trastornos (Haddad, Azar et al. 2005).

Así pues, se han descrito un amplio número de compuestos naturales con actividad antiinflamatoria:

- - Probióticos: organismos vivos que, suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedador. Se utilizan para el tratamiento de la inflamación intestinal por su capacidad para modular la flora intestinal a través de diferentes mecanismos (Arribas 2009):
 - Compiten con bacterias perjudiciales por el lugar de fijación al epitelio
 - Reducen la permeabilidad intestinal mediante la fijación de las bacterias, lo cual hace que el paso de antígenos luminales a la lámina propia se vea impedido
 - Inhiben el crecimiento de bacterias patógenas e inducen su muerte produciendo compuestos antibacterianos y reduciendo el pH intestinal
Producen nutrientes esenciales para la función intestinal
 - Modulan la respuesta inmune de la mucosa del hospedador
- Vitaminas C y E: Disminuyen el estrés oxidativo en diferentes enfermedades crónicas a través de su actividad antioxidante. Contribuyen a controlar la inflamación crónica intestinal, la artritis y el asma (Diplock, Charleux et al. 1998).

Existen un gran número de evidencias epidemiológicas que relacionan el papel patogénico de los radicales libres con numerosos procesos biológicos, y más concretamente los que demuestran la correlación existente entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas con bajas concentraciones de agentes antioxidantes en sangre. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario (Kinsella, Frankel et al. 1993).

- Ácidos grasos n-3 y n-6: El ácido linoleico y el ácido alfa linolénico, son compuestos que el organismo no es capaz de sintetizar por lo que han de obtenerse de la dieta. Por ello se les considera como ácidos grasos indispensables. Estos ácidos grasos pertenecen a la familia n-6 o n-3, también conocidos como ω -6 u ω -3, respectivamente (Sprecher 1992).

Ambos son agentes antiinflamatorios puesto que inhiben la producción de marcadores inflamatorios como CRP, IL-1, IL-6, TNF- α y leptina (James, Gibson et al. 2000).

- Ginsenoides: Los ginsenoides son un tipo de saponinas triterpenoides que se encuentran de manera mayoritaria en las especies del género *Panax* (ginseng). Estos compuestos son objeto de estudio por ser efectivos agentes antiinflamatorios, así como por presentar otras acciones biológicas de interés para la salud: anticarcinogénicas, inmunomoduladoras, antialérgicas, antiescleróticas, antihipertensivos y antidiabéticos (Yang, Yang et al. 2015).

- Polifenoles: entre los numerosos compuestos de probada actividad antiinflamatoria son los polifenoles los que, recientemente, han generado un mayor interés a causa de su extensa distribución entre los integrantes de la dieta y a la gran diversidad de actividades biológicas que poseen (García-Lafuente, Guillamón et al. 2009).

De este modo, numerosos estudios han probado que diversos compuestos polifenólicos inhiben la producción de NO y otros mediadores en respuesta a estímulos inflamatorios (Autore, Rastrelli et al. 2001). En el presente trabajo se estudiarán los efectos de extractos ricos en compuestos fenólicos procedente de hongos comestibles, por lo que se describirán en un apartado específico.

I.1.3. Mecanismos de acción

Los mecanismos por los que todos estos componentes naturales actúan sobre la inflamación son muy variados y probablemente cada uno actúe a través de varios de ellos:

1. Actividad antioxidante y de secuestro de radicales libres. Altos niveles de especies reactivas de oxígeno se asocian con diferentes tipos de daño tisular que a su vez conllevan a un extenso número de enfermedades, desde inflamación hasta cáncer. Numerosos compuestos naturales presentan un elevado poder antioxidante *in vitro*, que les capacita tanto para secuestrar una extensa suma de radicales libres, como para impedir la formación de los mismos (Jung, Jung et al. 2003).
2. Regulación de las actividades celulares de células inflamatorias: mastocitos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Ciertos compuestos funcionales son capaces de intervenir sobre sistemas enzimáticos implicados en procesos inflamatorios, fundamentalmente sobre ciertas quinasas (Middleton, Kandaswami et al. 2000).
3. Modulación de las actividades enzimáticas de las enzimas que metabolizan el ácido araquidónico: fosfolipasa A2, ciclooxigenasa, lipooxigenasa y óxido nítrico sintasa (Raso, Meli et al. 2001).
4. Modulación de la producción de otras moléculas proinflamatorias, en particular TNF- α , IL-6 e IL-1 β que participan especialmente en los procesos crónicos.

Un papel fundamental de la respuesta inflamatoria, lo desempeñan los macrófagos mediante la producción de citoquinas como TNF- α o IL-1 β , diferentes mediadores inflamatorios como el NO y PGs. Después de la exposición a estimulantes como LPS, se han descubierto en tejidos

inflamados, altos niveles de los citados mediadores inflamatorios producidos por macrófagos, además de una elevada expresión de sus ARNm (Kim, Kwon et al. 2003).

5. Modulación de la expresión de genes proinflamatorios. Los factores de transcripción como el factor nuclear de transcripción NF- κ B representan en la regulación celular un punto fundamental, puesto que regula la expresión de varios genes entre los que se incluyen los de IL-1 β , TNF- α , iNOS, y COX-2. El NF- κ B se activa como respuesta a estímulos inflamatorios entre los que se incluyen la LPS, proteínas virales y otros mediadores inflamatorios, lo cual establece hoy en día una diana para el tratamiento de numerosas enfermedades que cuentan con importantes componentes inflamatorios (Kim, Kun et al. 2004).

1.1.4. Inflamación intestinal

La inflamación intestinal es un proceso protector natural que resulta crucial para mantener la integridad del intestino así como su correcto funcionamiento (Martin and Wallace 2006). Para ello, es necesario que se dé una continua comunicación cruzada entre los diferentes tipos celulares presentes en el intestino mediante la secreción de mediadores solubles. Las células epiteliales intestinales y las células inmunológicas, establecen entre ellas interacciones bidireccionales (Danese, Angelucci et al. 2008). Las células del epitelio intestinal poseen la propiedad de modular selectivamente la monocapa del epitelio –y por tanto, también la exposición de las células inmunes a antígenos-, así como de sintetizar y secretar mediadores inflamatorios como óxido nítrico, eicosanoides, citoquinas y factores de crecimiento (Martin and Wallace 2006) (Danese, Angelucci et al. 2008). Ésto hace que sean capaces de atraer células inmunes así como de activarlas, iniciando así procesos inflamatorios. Las células epiteliales del intestino también responden a varios de los mediadores inflamatorios que las células inmunes secretan, modulando la permeabilidad de la monocapa y sus secreciones, siendo capaces, por tanto, de amplificar o disminuir la

respuesta inflamatoria. Así, para generar una respuesta inflamatoria óptima, este proceso ha de estar perfectamente regulado (Van De Walle, Hendrickx et al. 2010). La falta de regulación de alguno de sus componentes puede originar que la respuesta inflamatoria cronifique y dé lugar a algún tipo de desorden intestinal grave.

Las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas incluyen diversas patologías cuyo rasgo principal es la inflamación crónica de cualquier parte del tubo digestivo. Sin embargo, actualmente bajo el término “Enfermedad Inflamatoria Intestinal crónica” (EII) se designan 3 entidades: la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis indeterminada (CI). Se caracterizan por brotes inflamatorios crónicos que ocurren de manera impredecible sobre el intestino, provocando dolor abdominal, fiebre, diarrea, pérdida de peso, sangrado rectal y anemia (Gassul, Gomollón et al. 2007).

La incidencia de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa es alta en los países industrializados y está aumentando en los países en desarrollo. Así, las tasas de incidencia de la EC se estiman en 3,9-7 pacientes por 100.000 habitantes y año. La incidencia en la CU es mayor, estimándose en 5-18 pacientes por 100.000 habitantes y año en los países occidentales. En España la incidencia de la enfermedad de Crohn es de 5,5 por 100.000 habitantes/año y la de colitis ulcerosa, de 8 por 100.000 habitantes/año. La mayoría de los enfermos inicia su enfermedad entre los 15 y los 40 años, con un segundo pico para la colitis ulcerosa entre los 55-65 años (Gassul, Gomollón et al. 2007).

Además, la inflamación crónica intestinal, puede contribuir a la aparición de otras enfermedades como alergias alimentarias y enfermedades autoinmunes como la celiaquía o la diabetes tipo 1, y se asocian a un elevado riesgo de padecer cáncer (especialmente cáncer de colon). Un patrón inflamatorio extenso (pancolitis) difícilmente controlable con medicación y la duración de la enfermedad parecen ser factores muy asociados significativamente al desarrollo de cáncer de colon. Los

pacientes con EII, y principalmente, los de CU presentan un riesgo de desarrollar cáncer de colon muy superior a la población sana (Gassul, Gomollón et al. 2007).

La patogénesis de las enfermedades intestinales inflamatorias no está completamente esclarecida, pero sí se sabe que posee 2 rasgos característicos: funcionamiento deficiente de la barrera intestinal y actividad inmune exagerada. Ambas cooperan en un bucle de auto amplificación, en el que participan la disfunción de la barrera inmune, un aumento de la permeabilidad paracelular a antígenos lumbinales, aumento de la activación de las células inmunes en la mucosa y liberación de estímulos inflamatorios con respuesta de las células del epitelio intestinal (Bruewer, Luegering et al. 2003).

Los mediadores que pueden estar implicados en el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales son muchos. Sin embargo los estudios, *in vitro*, con células del epitelio intestinal, se enfocan principalmente a la implicación de 3 citoquinas: IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . La IL-1 β es una citoquina multifuncional cuyo principal papel es el de iniciar y amplificar varias condiciones inflamatorias. Se ha demostrado su presencia en altas concentraciones en los tejidos intestinales de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino y está involucrada en importantes características de este tipo de enfermedades como generación de fiebre, reducción del apetito, liberación de mediadores y el reclutamiento de células inmunológicas (leucocitos). El TNF- α y el INF- γ son citoquinas con un papel crucial en la fase aguda de la inflamación y de diversos procesos inmunológicos. Altos niveles de expresión de ambas, han sido encontrados en las mucosas intestinales de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino (Martin and Wallace 2006).

Otro factor que se considera importante tanto en la iniciación como en la reactivación de las enfermedades inflamatorias intestinales, es la presencia de componentes bacterianos como LPS. LPS puede provocar el aumento de la sensibilidad de las células epiteliales del intestino frente a la microflora intestinal local, y en consecuencia originar una serie de estímulos inflamatorios que conlleven a una

presencia exagerada de citoquinas, lo que supone un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas. Además, el aumento de la permeabilidad de la barrera de las células epiteliales del intestino, que tiene lugar durante la inflamación, permite que un mayor número de bacterias logren atravesar dicha barrera, lo que a su vez, aumenta la actividad inmunológica (Bocker, Yezersky et al. 2003).

Los estudios *in vitro*, con IL-1 β , TNF- α , INF- γ y LPS sobre células del epitelio intestinal, han demostrado que estos estímulos inducen la activación de cascadas intracelulares que conducen a un aumento de la actividad transcripcional y un aumento de la secreción de mediadores inflamatorios como IL-8 (Schuerer-Maly, Eckmann et al. 1994), IL-6 (Vitkus, Hanifin et al. 1998), PGE₂ (Duque, Diaz-Munoz et al. 2006) y NO (Forsythe, Xu et al. 2002), además del aumento de la permeabilidad celular, mediante el debilitamiento de las uniones celulares (Al-Sadi and Ma 2007).

Los tratamientos para estas enfermedades incluyen glucocorticoides, el ácido 5-aminosalicílico (mesalazina) y agentes inmunosupresores (Triantafillidis, Merikas et al. 2011). Los glucocorticoides son efectivos para el tratamiento a corto plazo de la colitis ulcerosa, sin embargo cuando ésta requiere de un tratamiento más a largo plazo, originan una gran cantidad de efectos adversos (Sands 2000). El ácido 5-aminosalicílico es comúnmente muy utilizado en el tratamiento de las EII, pero cuando éstas presentan estados de importante gravedad, no resulta efectivo. Los agentes inmunosupresores se emplean en los casos de gravedad severa o en los que la enfermedad se hace resistente a las drogas esteroideas, pero frecuentemente favorecen la aparición de complicaciones asociadas (Ishiguro, Ando et al. 2006). Actualmente, por tanto, no sólo no se dispone de tratamientos efectivos para la remisión de la EII, sino que además ciertos fármacos como los anticonceptivos orales y sobre todo los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), en ocasiones pueden favorecer la aparición de este tipo de enfermedades (Forrest, Symmons et al. 2004). Por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos compuestos con actividad

antiinflamatoria que contribuyan a tratar con éxito estas dolencias. Recientes estudios evidencian que los hongos pueden ser buena fuente de compuestos para el tratamiento de estas enfermedades. Se ha demostrado en ratones a los que se les indujo colitis mediante dextrano sulfato de sodio, que una previa suplementación con un 10% de *Agaricus bisporus* durante 4 semanas, prevenía el acortamiento del colon, la diarrea, el sangrado y el daño de la mucosa, que se observaba en los ratones que no recibieron la suplementación con *A. bisporus*. Así mismo, se demostró que la elevada actividad de la actividad mieloperoxidasa y la sobreproducción de TNF- α , que tenían lugar tras la inducción de la colitis, quedaban atenuados en aquellos animales alimentados con *A. bisporus*. Dicha actividad antiinflamatoria se relacionó con la capacidad antioxidante que el hongo mostró, atribuyéndose ambos efectos, en gran parte, al contenido de compuestos fenólicos del hongo (Um, Park et al. 2014).

Los compuestos fenólicos son los antioxidantes que más abundan en la dieta por hallarse ampliamente extendidos en el reino vegetal. Además, estos compuestos contribuyen a la promoción y mantenimiento de la salud intestinal como consecuencia de su alta ingesta diaria (entorno a 1 g de compuestos fenólicos/día) y de su pobre absorción (Manach, Scalbert et al. 2004), lo que hace que las células epiteliales intestinales, que cuentan con una posición estratégica entre el espacio luminal antigénico y el medio interno, experimenten una alta exposición a dichos compuestos. Este hecho junto al de que los compuestos fenólicos cuentan con demostradas propiedades antiinflamatorias (Yoon and Baek 2005), hace que puedan ser considerados como buenos candidatos para el tratamiento y prevención de las enfermedades inflamatorias del intestino.

I.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles son compuestos orgánicos cuya estructura básica se caracteriza por contener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos, y pueden abarcar desde moléculas simples (ácidos fenólicos, flavonoides o fenilpropanoides) hasta compuestos altamente polimerizados (taninos, ligninas o melaninas). Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino Plantae. Son metabolitos secundarios imprescindibles para la vida de las plantas, puesto que desempeñan funciones de defensa claves para su supervivencia: protegen frente a patógenos actuando como potentes agentes antibacterianos, antivíricos y antifúngicos; protegen ante determinadas situaciones de estrés como elevados niveles de radiación UV, calor, frío, pesticidas, etc. y participan en mecanismos de reparación celular (Crozier 2006).

I.2.1. Propiedades saludables de los compuestos fenólicos

Los polifenoles comenzaron siendo objeto de estudio por las cualidades organolépticas que proporcionan a los alimentos: color (antocianinas), amargor (flavanoles), astringencia (taninos), etc., pues aunque la principal función que desempeñan en los vegetales es de defensa, aportan también propiedades organolépticas características de muchos alimentos vegetales, siendo responsables en muchos casos de sus típicos sabores y colores (Tarko, Duda-Chodak et al. 2013). Sin embargo en las últimas décadas, los estudios sobre los polifenoles se han llevado a cabo bajo el punto de vista de la salud, y hoy en día se ha demostrado que poseen propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, anticancerosas, antiaterogénicas, antiulcerosas, antitrombóticas, antialérgicas, antiagregativas, antimicrobianas y vasodilatadoras; además de poseer efectos estrogénicos, reductores de la incidencia de diabetes o reguladores del metabolismo glucídico y lipídico. La mayor parte de estas propiedades se deben a su poder antioxidante, su efecto como agentes quelantes y su capacidad para modular o inhibir enzimas del tipo topoisomerasas, proteínas quinasas o ciclooxigenasas (Scalbert, Manach et al. 2005).

Los estudios epidemiológicos sugieren que un alto consumo de frutas y verduras ricas en compuestos fenólicos está asociado con un descenso del riesgo de un amplio espectro de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, metabólicas, neurodegenerativas, y algunos tipos de cánceres. Estos fitoquímicos se asocian íntimamente con efectos beneficiosos en abundantes estudios clínicos así como en ensayos *in vitro*, y con animales. En lo que a la salud cardiovascular y las enfermedades metabólicas se refiere, estas sustancias son capaces de alterar el metabolismo lipídico, reducir la oxidación de LDL, ralentizar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, mejorar la función endotelial, disminuir la presión sanguínea, inhibir la agregación plaquetaria, mejorar la resistencia a la insulina y regular la inflamación (Del Rio, Rodriguez-Mateos et al. 2013). Los polifenoles, en particular los flavonoides, también han demostrado tener efectos cognitivos beneficiosos y disminuir trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad (Williams and Spencer 2012). Además, poseen una amplia variedad de efectos anticarcinogénicos como consecuencia de su capacidad para inhibir la proliferación, prevenir la angiogénesis y regular la apoptosis, de células cancerígenas (Cimino, Sortino et al. 2012).

A diferencia de muchos compuestos farmacológicos, que actúan específicamente sobre un receptor o una vía de señalización concretos, la mayoría de los polifenoles cuentan con acciones con múltiples dianas. Así, dependiendo de los compuestos, los polifenoles pueden actuar mediante mecanismos no específicos y/o mediante mecanismos específicos (Fraga, Galleano et al. 2010). Los primeros se refieren a su capacidad de interactuar con las membranas plasmáticas, provocando cambios en su estructura y características físicas que podrían afectar la función celular. Los segundos se basan en la estructura particular y características conformacionales de ciertos polifenoles y sus dianas biológicas, incluyendo su habilidad para modular actividades enzimáticas y factores de transcripción o de interactuar con receptores. La diversidad de estos potenciales mecanismos de acción explica el amplio espectro de

actividades biológicas asociados con los polifenoles (García-Lafuente, Guillamón et al. 2009).

I.2.2. Biodisponibilidad

Las principales fuentes de la dieta de compuestos fenólicos son frutas, verduras, cereales, cacao y legumbres, además de las bebidas hechas a partir de frutas y demás vegetales, como zumos, café, té o vinos, por ejemplo.

Además de la estructura química, otro factor que influye en su actividad biológica, es su absorción y metabolismo tras la ingesta. De todos los polifenoles, sólo las agliconas son capaces de atravesar las membranas biológicas por ser altamente lipofílicas. Pero la mayoría de los compuestos fenólicos raramente se encuentran en los alimentos como conjugados de agliconas, sino que generalmente lo hacen en forma de ésteres, glicósidos y polímeros que no pueden ser absorbidos en esas formas nativas, por lo que se requieren procesos de hidrólisis a cargo de enzimas digestivas o de la microflora intestinal.

Otro factor que influye en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos es la naturaleza de la propia matriz de los alimentos, ya que pueden reaccionar con algunos de sus constituyentes, como por ejemplo ciertas proteínas y carbohidratos, lo que puede afectar significativamente a la absorción de los mismos durante la digestión (Manach, Scalbert et al. 2004).

Los compuestos fenólicos de la dieta son ampliamente digeridos y metabolizados por la microbiota intestinal y el hígado. Se estima que el 48% de los compuestos fenólicos son digeridos en el intestino delgado y el 42% en el intestino grueso. Solo el 10% no son digeridos y permanecen intactos dentro de la matriz alimentaria (Manach, Scalbert et al. 2004). Los metabolitos de estos compuestos conducen en última instancia a ácidos benzoicos, que pueden ser absorbidos para llegar a la circulación sanguínea donde se unen a la albúmina y son transportados al hígado. Aquí se someten a procesos de hidroxilación, desmetilación, metilación o así

como a conjugaciones con glucurónidos y derivados sulfatados a través de diversas enzimas hepáticas I y II. Posteriormente una parte importante de estos puede, secretarse junto con la bilis al intestino, donde otra vez son sometidos a hidrólisis para ser finalmente absorbidos o excretados por las heces (Tarko, Duda-Chodak et al. 2013).

Las formas predominantes (en ocasiones, exclusivas) que llegan a la sangre y alcanzan los tejidos diana son metabolitos conjugados (principalmente glucorinizados, sulfatados y derivados metilados) químicamente distintos de los compuestos originales encontrados inicialmente en los alimentos vegetales. Las concentraciones máximas de polifenoles en plasma suelen darse entre 1 y 6 horas después de haberse producido su consumo y su grado de absorción es bastante variable en cuanto a que la excreción urinaria relativa va desde 0,3% a 43% de la dosis ingerida dependiendo del polifenol (Manach, Williamson et al. 2005). De modo que la concentración máxima en plasma después de haber ingerido 50 mg de un compuesto fenólico, raramente superará 1 μ M. Hasta el momento, no hay ninguna evidencia convincente sobre la acumulación de metabolitos hidrosolubles a largo plazo incluso cuando se consumen dosis altas de polifenoles repetidamente (Clifford and Brown 2006).

1.2.3. Clasificación y características de los principales grupos de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos representan una gran variedad de compuestos, habiéndose identificado más de 8000 moléculas con estructura fenólica (Spencer, Abdel-Mohsen et al. 2004).

Su actividad biológica está determinada por su estructura, y en base a ella se pueden clasificar en distintos grupos en función del número de anillos fenólicos que contengan y de los distintos elementos estructurales que unen los anillos: ácidos fenólicos, flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanonas e isoflavonas), estilbenos y lignanos (Tucker and Robards 2008).

- *Ácidos fenólicos*

Los ácidos fenólicos derivan de moléculas no fenólicas y se dividen en dos grupos: los ácidos hidroxicinámicos y los ácidos hidroxibenzoicos, que provienen del ácido cinámico y del ácido benzoico, respectivamente (Harborne and Williams 2000).

Los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados se encuentran generalmente en plantas unidos a componentes estructurales de las membranas celulares como celulosa, proteínas, lignina, así como asociados mediante uniones ester, a otros ácidos orgánicos como los ácidos quínicos (ácidos clorogénicos) o al ácido tartárico (Liu 2004).

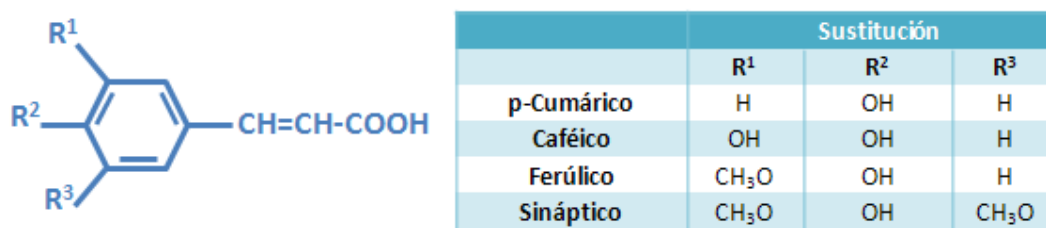


Figura 1. Estructura y composición de los derivados del ácido cinámico

Los ácidos hidroxibenzoicos y sus derivados son, por lo general, componentes de estructura compleja como taninos hidrolizables y ligninas, aunque también se encuentran unidos a ácidos orgánicos y a azúcares de las plantas (Liu 2004).

Presentan varias acciones biológicas de interés como actividad antimicrobiana (Alves, Ferreira et al. 2013), antiplaquetaria (Chou, Shih et al. 2011), antitrombótica (Holy, Forestier et al. 2011), antioxidante (Lee, Kim et al. 2007), anticarcinogénica y antiinflamatoria, además de regular el metabolismo lipídico y glucídico (Milenkovic, Jude et al. 2013).



Figura 2. Estructura y composición de los derivados del ácido hidroxibenzoico

- *Flavonoides*

- Flavanoles

Los flavanoles son una clase de flavonoides de formas monoméricas y oligoméricas entre los que figuran diversas formas de catequinas y proantocianidinas, presentes en el té verde, en el cacao y en la furta. Estudios epidemiológicos, clínicos, y experimentales han indicado un potencial de los flavan-3-oles en la prevención de diferentes enfermedades. Galato epigalocatequina (EGCG) es el polifenol más abundante en el té verde y tiene potencial anticancerígeno y propiedades protectoras cardiovasculares (Kanwar, Taskeen et al. 2012).

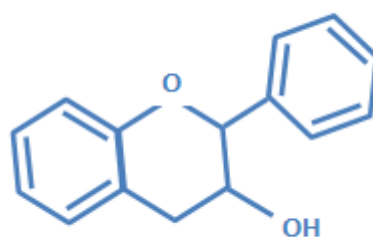


Figura 3. Estructura química de los flavanoles

○ Flavonoles

Dentro de ellos está la quercetina, el flavonoide más presente en la dieta humana, se encuentra en diferentes alimentos como cebollas, manzanas, o vino y cuenta con un amplio espectro de efectos biológicos. Los mecanismos subyacentes a los efectos biológicos observados en este compuesto se relacionan con su capacidad para modular el estado de fosforilación de las moléculas de señalización celular y por consiguiente la expresión de los genes (Dajas 2012).

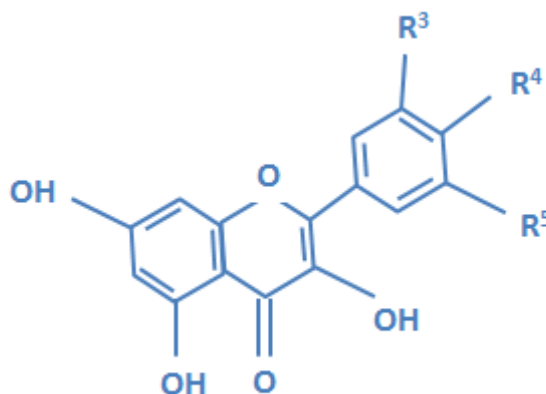


Figura 4. Estructura química de los flavonoles

○ Flavanonas

Las flavanonas representan una subclase de flavonoides de interés, puesto que cuentan con efectos beneficiosos para la salud a nivel cardiovascular. Además, ciertas flavanonas poseen efectos citotóxicos para determinadas líneas celulares cancerosas. Dentro de la dieta, las flavanonas se encuentran casi exclusivamente en las frutas cítricas (Chanet, Milenkovic et al. 2012).

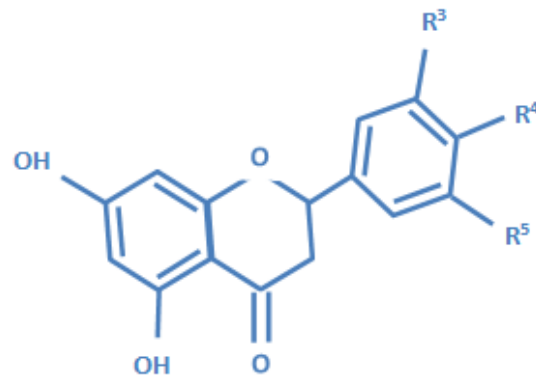


Figura 5. Estructura química de las flavanonas

O Isoflavonas

Las isoflavonas presentan una estructura similar al 17- β -estradiol, que ejerce efectos beneficiosos en la salud, en particular en la prevención de cánceres dependientes de hormonas, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, manifestaciones menopáusicas adversas, y descenso cognitivo relacionado con la edad (Milenkovic, Jude et al. 2013). Evidencias recientes revelan que los mecanismos por los que se producen estos efectos están relacionados con la capacidad de estas moléculas de interactuar con múltiples vías de señalización celular, por lo que consecuentemente regulan la expresión de numerosos genes (Li, Kong et al. 2011).

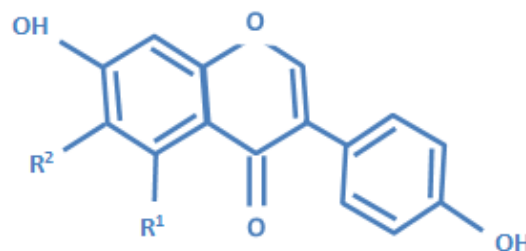


Figura 6. Estructura química de las isoflavonas

- *Estilbenos*

El resveratrol es el miembro más representativo de la clase de los estilbenos, se encuentra principalmente en uvas, vino, bayas, cacahuetes y en menor medida en el cacao (Burns, Yokota et al. 2002). Existen dos formas isoméricas de resveratrol: cis- y trans- resveratrol. Ambas isoformas tienen actividades biológicas y antioxidantes similares, aunque cis-resveratrol es inestable y no se encuentra comúnmente en los alimentos (Orallo 2006).

Este compuesto posee diversas acciones bioquímicas y fisiológicas, entre las que se incluyen antiinflamatorias, antioxidantes, antiproliferativas, promoción de la diferenciación y efectos quimiopreventivos, además de su potencial antiobesidad. Los efectos beneficiosos del resveratrol parecen ser mediados en gran parte por la regulación de las vías de señalización y de la expresión génica (Markus and Morris 2008).

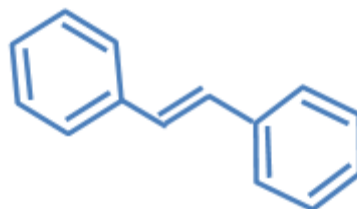


Figura 7. Estructura química de los estilbenos

- *Lignanos*

Los lignanos son derivados de la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropanoides, y representan uno de los grupos de metabolitos secundarios más omnipresentes en las plantas terrestres, aunque las cantidades totales en las que se encuentran son pequeñas (μg por cada gramo de materia seca) (Crosby 2005). Su estructura viene determinada por dos unidades de C_6C_3 unidas mediante enlaces β, β'

(Moss 2000). Presentan formas finales muy diversas, lo cual les otorga un amplio espectro de actividades biológicas: antioxidantes, antitrombóticas, antitumoral, antivirales, antifúngicos y antiinflamatorios (Saleem, Kim et al. 2005).

- *Curcuminoides*

Los curcumionoides son otra clase de compuestos fenólicos, entre los que destaca la curcumina, un polifenol hidrofóbico de color amarillo que se encuentra como molécula principal en la especia cúrcuma que se obtiene de los rizomas de *Curcuma longa* (Alappat and Awad 2010). Tradicionalmente, se ha utilizado a parte de como especia de la dieta, como agente colorante de alimentos y textiles (Meydani and Hasan 2010).

Se ha demostrado que la curcumina posee potentes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, proapoptóticas, antiobesidad, y antiangiogénicas (Milenkovic, Jude et al. 2013). Estos efectos son mediados por la capacidad que tiene la curcumina para modular la actividad de vías de señalización y factores de transcripción. Estudios epidemiológicos y ensayos clínicos han demostrado importantes efectos quimioprotectores de la curcumina en cánceres colorrectales y pancreáticos (Strimpakos and Sharma 2008) (Zhou, Beevers et al. 2011).

I.3. HONGOS

I.3.1. Características generales

Los hongos son organismos que pertenecen al reino Fungi, un reino independiente del animal y también del vegetal desde que en 1969 Whittaker los diferenciara de éste último en base a tres principios básicos:

-Son organismos no fotosintéticos.

-Se alimentan de nutrientes producidos por otros organismos.

-Se diferencian de las plantas en sus estructuras corporales, sus métodos de reproducción y en su composición celular (Whittaker 1969).

Se trata de un reino antiguo, variado y muy amplio; actualmente se estima que hay en la Tierra alrededor de 1,5 millones de especies de hongos, de las cuales, 140.000 producen cuerpos fructíferos lo suficientemente grandes y poseen la estructura requerida para que sean consideradas como macrohongos. De ellas tan sólo se conocen el 10%, es decir, entorno a 14.000 especies (Hawksworth 2001).

Los hongos son organismos eucariotas, generalmente plurinucleados, cuya reproducción puede ser tanto sexual como asexual. Son organismos heterótrofos que se suelen alimentar por absorción, liberando generalmente al exterior enzimas digestivas para absorber después los productos de la digestión.

El reino Fungi se divide en 4 filos: *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota* y *Deuteromycota*.

Entre las especies que se incluyen en el filo ***Basidiomycota*** se encuentran las de la clase Basidiomycetes, que son aquellos que poseen cuerpos fructíferos lo suficientemente grandes como para ser vistos a simple vista, a la que pertenecen los hongos objeto de este estudio.

En el filo **Ascomycota**, destacan desde el punto de vista culinario las tan apreciadas especies de los géneros *Tuber* (trufas) y *Morchella* (colmenillas) así como *Saccharomyces cerevisiae*, en este caso apreciada por sus aplicaciones biotecnológicas.

La especie más conocida dentro del filo **Zygomycota**, que está constituido por alrededor de 600 especies, es *Rhizopus stolonifer* que es un hongo negro que infecta comúnmente el pan.

Y finalmente, en el filo **Deuteromycota**, el filo de los llamados hongos imperfectos, se sitúan géneros como el *Penicillium*, el causante de infecciones en los seres humanos *Candida albicans*, o el responsable de producir también en humanos el popularmente conocido pie de atleta, *Trichophyton* (Alexopoulos, Mims et al. 1996).

En cuanto a su estructura, en los hongos basidiomicetes se distinguen dos partes fundamentales, el talo o cuerpo vegetativo y el carpóforo o cuerpo fructífero.

- **El talo o cuerpo vegetativo** está formado por hifas microscópicas y su conjunto recibe el nombre de micelio. Dichas hifas están recubiertas de una pared celular compuesta fundamentalmente de un polisacárido, la quitina (aunque algunos grupos presentan celulosa u otros polisacáridos).
- **El carpóforo o cuerpo fructífero** es lo que se conoce comúnmente como “seta”. Se origina como consecuencia del crecimiento diferenciando y del entrelazamiento de las hifas junto a su rápida expansión causada por la absorción de agua. Su finalidad es la de producir y diseminar las esporas, para asegurar así la supervivencia del hongo (Martínez Peña, Oria de Rueda et al. 2011).

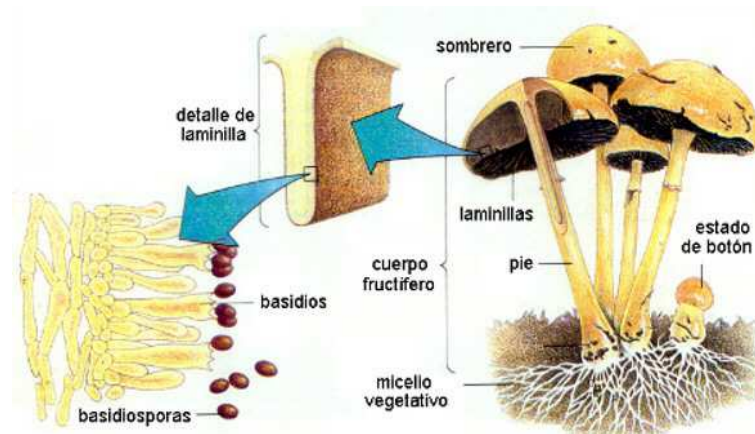


Figura 8. Estructuras microscópicas y macroscópicas de los hongos basidiomicetes.

I.3.2. Importancia de los hongos

Los hongos tienen una gran importancia para el hombre en ámbitos muy variados. Desde el punto de vista medio ambiental, los hongos son organismos de vital importancia para el correcto funcionamiento de todos los ecosistemas. Son los responsables (junto a determinadas bacterias) de la descomposición de la materia orgánica, desempeñan una importante función en el mantenimiento del ciclo trófico de plantas y animales muertos (Hawksworth 1991) y son fundamentales para el mantenimiento de la calidad de los suelos (Perry, Amaranthus et al. 1989). Además, existen hongos micorrízicos que son capaces de establecer asociaciones con las raíces vegetales, que muchas veces son necesarias para la vida de ciertas plantas. A nivel forestal, algunos hongos formadores de micorrizas se emplean para estimular el desarrollo de plantas así como para la producción de hongos de elevado valor comercial como son las trufas. Otros, son apreciados por tratarse de especies productoras de enzimas que se utilizan en diferentes procesos industriales, así como otros lo son por ayudar al control de determinadas plagas (Martínez Peña, Oria de Rueda et al. 2011).

En cuanto a su relación con el hombre, existen evidencias que prueban que el reino Fungi lleva unido al hombre desde sus primeros tiempos, iniciándose en la

prehistoria, donde los hombres ya usaban como alimento hongos que recogían de la naturaleza, continuando con las primeras civilizaciones de la antigua Grecia, los egipcios y los romanos. Los primeros pobladores de China y Méjico también consideraban a los hongos como elementos de preciado valor, por sus sabores, sus propiedades terapéuticas y en ocasiones por su importancia en determinados ritos religiosos (Alexopoulos, Mims et al. 1996).

En nuestros días, algunas especies cuentan con un alto reconocimiento en el mundo gastronómico, a consecuencia de sus apreciados aromas y sabores, mientras que otras se utilizan como ingredientes o alimentos, levaduras de la masa del pan, fermentadores de la producción del vino y cerveza, maduradores de quesos, etc. Existen también especies que tienen especial importancia por su capacidad de sintetizar antibióticos y hormonas empleadas en medicina, mientras que otras cada vez están despertando mayor interés, por su composición funcional y las actividades terapéuticas que poseen (Martínez Peña, Oria de Rueda et al. 2011) (Fleming 1929).

Los hongos, por tanto, han contribuído a lo largo de los años mediante sus numerosas aplicaciones al continuo progreso de la sociedad humana.

I.3.3. Propiedades medicinales de los hongos

Desde tiempos inmemoriales, los hongos han sido empleados por el ser humano no sólo como alimentos sino también como agentes medicinales. Prueba de ello es la larguísima tradición que cuenta el empleo de hongos como agentes terapéuticos en la medicina de países orientales (China, Japón y Corea, principalmente). Además, en la actualidad los hongos están recibiendo un creciente interés en las sociedades occidentales por sus propiedades medicinales, lo cual a su vez se está traduciendo en una cada vez mayor variedad de productos obtenidos a partir de distintas especies de hongos que ayudan a mejorar el estado de salud (Wasser 2011).

De las 14.000 especies de macrohongos conocidas, aproximadamente 700 son consideradas como especies poseedoras de propiedades medicinales. Por el contrario, el número de aquellas catalogadas como venenosas es de 500 especies (Wasser 2010) (Chang and Wasser 2012). Además, se estima que los hongos medicinales son capaces de provocar 126 acciones medicinales entre las que destacan actividades antitumorales, inmunomoduladoras, cardiovasculares, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiparasitarias, antioxidantes, sequestradoras de radicales libres, antihipercolesterolemias, hepatoprotectoras, antidiabéticas, detoxificantes y antiinflamatorias (Wasser 2011).

Se cree que la gran mayoría, si no todas las especies de hongos basidiomicetes, contienen polisacáridos biológicamente activos en sus cuerpos fructíferos, en sus micelios cultivados y en sus medios de cultivo (Wasser 2010) (Smith 2003).

Los hongos medicinales pertenecientes al filo Basidiomycota, por tanto, suponen una fuente abundante de productos naturales con actividades biológicas de interés aún en gran medida sin explotar (Reshetnikov, Wasser et al. 2001). De todas las especies de hongos con propiedades medicinales, tan sólo unas pocas han sido estudiadas. Las especies más estudiadas son *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* y *Trametes versicolor* dentro de las especies no comestibles y *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus spp.* y *Tremella spp.* dentro de las especies comestibles (Elisashvili 2012).

Las propiedades terapéuticas de estos hongos considerados como medicinales, se deben tanto a varios de sus compuestos celulares, como a ciertos metabolitos secundarios presentes en los cuerpos fructíferos, micelios y medios de cultivo de los mismos. Dichos metabolitos pueden ser de naturaleza muy variada: polisacáridos, proteínas, complejos formados por ambos o metabolitos de bajo peso molecular como es el caso de compuestos fenólicos, triterpenoides, poliquétidos, lactonas, alcaloides, ácidos grasos y nucleótidos (Reshetnikov, Wasser et al. 2001) (Lindequist, Niedermeyer et al. 2005).

Los hongos medicinales cada vez están suscitando mayor interés en cuanto a su cultivo, consumo y estudio de sus componentes bioactivos, hasta el punto que varios de sus derivados se encuentran a las puertas de ensayos clínicos mientras otros ya están en fase de desarrollo para una futura comercialización (Zhou and Gao 2002). A continuación se describen brevemente las especies consideradas tradicionalmente como más útiles desde el punto de vista medicinal así como sus efectos terapéuticos.

G. lucidum, comúnmente conocido como lingzhi, reishi o mannentake, se ha utilizado durante más de 4.000 años para promover la salud y la longevidad en la medicina tradicional china (Batra, Sharma et al. 2013).



Figura 9. *G. lucidum*

El potencial farmacológico de *G. lucidum* se debe a la alta actividad inmunomoduladora que posee. Así pues, en las diferentes partes de este hongo (carpóforo, micelio y esporas) se han descubierto más de 400 compuestos bioactivos que incluyen: polisacáridos, esteroides, triterpenoides, esteroides, péptidos y proteínas, nucleótidos, ácidos grasos y elementos traza, que le confieren una gran variedad de efectos farmacológicos. Se trata del hongo medicinal más estudiado y la prueba de ello es que numerosos productos obtenidos a partir de él han sido objeto de ensayos clínicos y se encuentran actualmente disponibles en forma de comprimidos, inyecciones o jarabes (Wasser, 2010) (Batra, Sharma et al. 2013), para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades (Kim and Song 2014).

Otro de los hongos más estudiados es *L. edodes*, conocido en China popularmente como xiang gu, y en Japón y cada vez en más lugares del mundo (Europa, América...) como shiitake. La medicina tradicional oriental ha utilizado este hongo para tratar una gran variedad de dolencias. Actualmente se utiliza para el tratamiento de la artritis, la hipertensión y la hipercolesterolemia. También contribuye a mejorar el sistema inmunitario, combatir infecciones, desórdenes gastrointestinales y el síndrome de la fatiga crónica, así como ciertos tipos de tumores cancerosos (Kim and Song 2014) (Ooi 2000).



Figura 10. *L. edodes*

De *L. edodes* se ha extraído, tanto de sus cuerpos fructíferos como de sus micelios, uno de los polisacáridos de hongos más importantes desde el punto de vista terapéutico, el lentinan. Fue aislado en 1970 (Chihara, Hamuro et al. 1970) y presenta una potente actividad antitumoral, derivada de su capacidad para ampliar las respuestas inmunitarias. Esto ha hecho que en la actualidad, este compuesto sea utilizado frecuentemente como adyuvante, en la quimioterapia en determinados pacientes con cáncer para ayudar a mejorar la respuesta inmune de los mismos (Oba, Kobayashi et al. 2009).

De la misma manera se han aislado diferentes compuestos de otros hongos con variadas propiedades medicinales. Por ejemplo la cordicepina, un compuesto con actividad antibiótica, aislado de *Cordyceps sinensis* (De Diego Calonge 2011), o el péptido polisacárido (PSP) y el polisacárido K (PSK), aislados del hongo *Trametes*

vericolor que tienen propiedades anticancerígenas y actualmente se utilizan como coadyuvantes combinados con quimioterapia o radioterapia para el tratamiento clínico de pacientes con cáncer (Kim and Song 2014).

No obstante muchas más especies de hongos se utilizan en la actualidad para el tratamiento de diferentes dolencias:

Tabla 1. Tabla resumen de diferentes especies de hongos medicinales y las patologías para las que se emplean

HONGO	UTILIDAD	REFERENCIA
<i>C. sinensis</i>	Tónico renal, pulmonar, sexual, inmunitario, cardiovascular y hepático. Agente antiviral y antibacteriano. Tratamiento para anemia, asma y tos crónicas.	(Hobbs 2003) (Jones 1997) (Chang 1996) (Ying 1987)
<i>Cordyceps sobolifera</i>	Alivio de espasmos palpitations, tos, irritación e inflamación de garganta. Agente desintoxicante.	(Liu and Bau 1980)
<i>Poria cocos</i>	Tratamiento de ictericia, estados febriles y edemas. Antitusivo, diurético. Fortalecimiento del bazo e inducción de la menstruación.	(Hobbs 2003) (Chang 1996)
<i>Tremella fulciformis</i>	Tratamiento de úlceras y traqueítis crónica. Agente antipirético. Efectos antitumorales, inmunoestimulante e hipocolesterolémico.	(Hobbs 2003). (Liu and Bau 1980)
<i>Auricularia auricula</i>	Analgésico y activador de la circulación sanguínea. Estimulador de los movimientos intestinales.	(Ying 1987) (Kim and Song 2014) (Oyetayo 2011)
<i>H. erinaceus</i>	Tratamiento de úlceras gástricas y duodenales, gastritis crónica y gastritis crónica atrófica. Mejora el estado de salud de los enfermos de la demencia de Alzheimer. Efectos anticancerígenos frente a carcinomas gástricos, esofágicos y cervico uterinos.	(Mizuno 1995) (Kawagashi, Ando et al. 1990) (Kawagashi, Ando et al. 1991)
<i>T. versicolor</i>	Tratamiento de la inflamación del aparato urinario, del tracto digestivo, del aparato respiratorio superior, infecciones, enfermedades hepáticas, diabetes, estados de debilidad e	(Ooi 2000) (Tsukagoshi, Hashimoto et al. 1984) (Kobayashi, Matsunaga et al.

Tabla 1 continuación

	incluso ciertos tipos de tumores.	1993) (Kobayashi, Matsunaga et al. 1995) (Oba, Teramukai et al. 2007) (Kim and Song 2014) (Jong and Yang 1999)
<i>G. frondosa</i>	Efectos hipocolesterolémicos, hepatoprotectores, antidiabéticos y de reducción de la presión sanguínea. Tratamiento de dolencias estomacales o esplénicas, hemorroides, enfermedades de próstata y reumáticas. Agente calmante, revitalizante y antioxidante.	(Hobbs 2003) (De Diego Calonge 2011)
<i>F. velutipes</i>	Mantenimiento de la salud hepática y gastrointestinal. Propiedades anticancerígenas compuestos antiviricos.	(Ooi 2000) (Ikekawa 1995) (De Diego Calonge 2011)
<i>Inonotus obliquus</i>	Cancer, prevención de tuberculosis y de enfermedades cardíacas, hepáticas y gástricas.	(Kim and Song 2014) (Maret 1991) (Huang 2002)
<i>Phellinus hartigii</i>	Cancer	(Kim and Song 2014)
<i>Phellinus linteus</i>	Cancer, inmunodeficiencia, enfermedades hepáticas.	(Kim and Song 2014)
<i>Phellinus ribis</i>	Dolores postparto, cáncer	(Kim and Song 2014)
<i>Morchella esculenta</i>	Cancer	(Kim and Song 2014)
<i>Fomes fomentarius</i>	Dolor abdominal, alopecia, cáncer, resfriados, estreñimiento, problemas oculares, fiebre, glicosuria, hipertensión, indigestiones en la infancia, cáncer hepático, cirrosis, obesidad, parálisis, tuberculosis pulmonar	(Kim and Song 2014)
<i>Wolfiporia cocos</i>	Analgésico, ansiedad, problemas de la circulación sanguínea, cáncer, hiperhidrosis, insomnio, menorragia, enfermedades renales, trombosis	(Kim and Song 2014)
<i>Pholiota nameko</i>	Cancer	(Kim and Song 2014)
<i>Sarcodon aspratus</i>	Enfermedades óseas, cáncer, indigestiones	(Kim and Song 2014)
<i>Armillariella mellea</i>	Cancer	(Kim and Song 2014)
<i>Calocybe gambosa</i>	Cancer, cáncer hepático	(Kim and Song 2014)
<i>Panellus serotinus</i>	Cancer	(Kim and Song 2014)
<i>Tricholoma matsutake</i>	Cáncer, cáncer gástrico, amigdalitis	(Kim and Song 2014)
<i>Umbilicaria esculenta</i>	Intoxicación alimentaria, desórdenes gastrointestinales, glicosuria, hipertensión	(Kim and Song 2014)
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	Dolor de cabeza, resfriados, fiebre, dolor de estómago, estreñimiento	(Oyetayo 2011)
<i>Lentinus squarrosulus</i>	Paperas, enfermedades coronarias	(Oyetayo 2011)

Tabla 1 continuación

<i>Termitomyces microcarpus</i>	Gonorrea	(Oyetayo 2011)
<i>Calvatia cyathiformis</i>	Leucorrea, hipo	(Oyetayo 2011)
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Reducir nivel de azúcar en sangre y proteger células hepáticas	(Oyetayo 2011)
<i>Ganoderma applanatum</i>	Hipertensión, reducir nivel de azúcar en sangre, y antioxidante	(Oyetayo 2011)
<i>S. commune</i>	Diabetes	(Oyetayo 2011)
<i>Volvariella volvacea</i>	Antibiótico y antineoplásico	(Oyetayo 2011)
<i>Daldinia concentrica</i>	Úlcera gástrica, enfermedades de la piel, tos ferina y la prevención del crecimiento excesivo del feto	(Oyetayo 2011)
<i>Polyporus officinalis</i>	Hernias, tos, catarros	(Oyetayo 2011)
<i>Termitomyces microcarpus</i>	Promotor de la salud e inducir lactancia materna	(Tibuhwa 2012)
<i>Termitomyces titanicus</i>	Dolor abdominal, dolor de estómago, úlceras y estreñimiento	(Tibuhwa 2012)
<i>Parkia biglobosa</i>	Síndrome de dificultad respiratoria como resultado de la acidosis de la malaria	(Beiersmann, Sanou et al. 2007)

I.3.4. Hongos comestibles

Los hongos han sido consumidos por el hombre desde hace siglos, bien sea como parte habitual de su dieta o bien como algo extraordinario en forma de manjar. En la actualidad, los hongos son elementos muy apreciados en la gastronomía debido a las cualidades culinarias que poseen (sabores y aromas únicos), tanto en forma de alimento principal como en forma de ingredientes.

De las especies de macrohongos conocidos, se considera que el 50% posee algún grado de comestibilidad (esto es, unas 7.000 especies) de las que más de 3.000 especies pertenecientes a 231 géneros son consideradas como hongos comestibles de primera (Wasser 2010).

Además de sus cualidades organolépticas, los hongos ofrecen una interesante composición nutricional que les ha hecho recibir una gran atención.

1.3.4.1. Composición nutricional

La composición nutricional de los hongos comestibles se caracteriza por su bajo contenido calórico y lipídico, así como por su elevado contenido de proteínas, fibra, vitaminas y minerales, lo que hace que, desde el punto de vista nutricional, constituyan un alimento saludable (Martínez Peña, Oria de Rueda et al. 2011). No obstante hay que señalar que dicha composición nutricional puede variar en función del estado de desarrollo del carpóforo, de las condiciones pre y post recolección, así como de otros tratamientos recibidos en el almacenamiento, procesado o mediante las transformaciones culinarias a las que se les someta (Barros, Baptista et al. 2007b) (Reis, Barros et al. 2012).

Pueden considerarse como valores medios de composición nutricional (respecto a materia fresca) los siguientes (Barros, Baptista et al. 2007a).

Tabla 2. Composición nutricional media de los hongos comestibles respecto a materia fresca

AGUA	PROTEÍNAS	GRASAS	HIDRATOS DE CARBONO	FIBRA	SALES MINERALES	ENERGÍA
89-90%	1,5-3,5%	0,3-0,4%	4-6%	1-1,5%	1%	30 Kcal/100g

- Humedad

El componente mayoritario de los hongos es el agua por lo que su contenido de humedad es muy alto; 85-95% de su peso total (Guillamón, García-Lafuente et al. 2010). La materia seca (MS) de los hongos comestibles es muy baja tanto en el caso de los hongos silvestres como en el de los cultivados, generalmente oscila entre valores de 80-140 g/Kg (Kalac 2013), es decir, en torno al 10% del peso de los mismos. Por ello, los datos que se publican sobre la composición nutricional de los hongos, se suelen

normalizar expresando los contenidos de nutrientes en relación a una cantidad de materia seca (Wang, Zhang et al. 2014).

- Proteínas y aminoácidos

Antiguamente los hongos silvestres comestibles eran popularmente conocidos, en Europa Central, como la “carne de los pobres”, debido a la calidad y cantidad de las proteínas y aminoácidos que contienen (Kalac 2013).

El contenido proteico de los hongos se considera bastante alto, pudiendo oscilar entre valores de 10 a 44% del peso seco (Longvah and Deosthale 1998). Petrovsca analizó el contenido proteico de 47 especies obteniendo un resultado medio de 22,8% de MS (Petrovska 2001) y Uzun et al., por su parte, en un estudio sobre 30 especies, obtuvieron valores medios de 24,9% de MS (Uzun, Gençcelep et al. 2009). Algunos autores han llegado a detectar valores de hasta 54% y 59% de MS en *Cantharellus cibarius* y *Lepista nuda*, respectivamente (Barros, Venturini et al. 2008).

En general, en términos de la cantidad de proteína cruda, los hongos se sitúan en un rango inferior al de las carnes de animales, pero muy por encima al de la mayoría de otros alimentos (Chang and Wasser 2012).

Respecto a su calidad, la FAO estableció en 1991 que los hongos poseen una calidad nutricional proteica superior a la de los vegetales (FAO/WHO Food and Agriculture Organization/ /World Health Organization.1991). De hecho, hay estudios que demuestran que la calidad biológica de las proteínas de los hongos es muy alta, siendo similar a las de origen animal, consideradas como las de mayor valor por excelencia. Además, en comparación con las proteínas animales, presentan varias ventajas como son el no ir acompañadas de altas cantidades indeseables de grasa y tener un coste de producción mucho más barato (Longvah and Deosthale 1998).

Las proteínas de los hongos contienen los aminoácidos esenciales requeridos por el hombre (Chang and Wasser 2012), de hecho la composición en aminoácidos de

los hongos comestibles es considerada superior, o al menos, similar a la de las proteínas de la soja y análoga a la del huevo de gallina (Yin and Zhou 2008).

Los datos sobre la composición de aminoácidos de la proteína de los hongos todavía son escasos, además sus perfiles son variables en función de la especie. En general, el rango de aminoácidos totales es de 93,6 a 230 g/kg MS y de 39,7 a 86,8 g/kg MS para el contenido de aminoácidos esenciales (Kalac 2013).

Los hongos son también son una fuente considerable de aminoácidos no esenciales como alanina, glicina, prolina y serina (León-Guzmán, Silva et al. 1997). Además, se han detectado cantidades significativas de dos aminoácidos poco comunes en los alimentos como son el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la ornitina, de gran importancia en cuanto a actividades fisiológicas se refiere, pues actúan como neurotransmisores del sistema nervioso en el caso del GABA, y precursor en la síntesis de la arginina, en el de la ornitina (Manzi, Gambelli et al. 1999).

- Lípidos

El contenido graso de los hongos, es muy bajo, puesto que sus valores oscilan entre el 1% y el 8% MS, aunque puede variar entre especies o entre ejemplares de la misma especie en función de diversos factores (Barros, Baptista et al. 2007c).

Algunas especies pertenecientes al género *Cordyceps* contienen porcentajes grasos del 10,06%, mientras que en otras como *L. edodes*, *Tremella fuciformis*, *Clitocybe maxima*, *T. versicolor*, *Auricularia mesenterica* y *Auricularia polytricha* se sitúa por debajo del 1,5% (Ulziijargal and Mau 2011).

Este hecho, junto a que prácticamente el 90% de los hongos es agua, hacen que el valor energético de los mismos sea muy bajo.

Además, la proporción de ácidos grasos insaturados frente a saturados en los hongos, sería de 4,3-12,7 en hongos silvestres (Liu, Sun et al. 2012) y 0,7-4,5 en cultivados (Zhang and Ran 2005). Particularmente los ácidos grasos (mono)

insaturados: ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 Δ 9c) y linoléico (C18:2 Δ 9c, 12c) son los más representativos (Barros, Baptista et al. 2007a). De hecho, el ácido oléico y el linoléico son los que prevalecen mayoritariamente, constituyendo dos tercios de todos los ácidos grasos que se han identificado en los hongos, seguidos a gran distancia por el ácido palmítico saturado (Kalac 2009).

A pesar de que el contenido total de lípidos en los hongos es bajo entre las grasas presentes en los mismos se encuentran todas las clases de compuestos lipídicos como ácidos grasos libres, mono-, di-, y triglicéridos, esteroides, ésteres de esteroides y fosfolípidos (Manzi, Gambelli et al. 1999).

- Hidratos de carbono y fibra

Los hidratos de carbono son los componentes mayoritarios de los hongos comestibles pues pese a haber diferencias entre distintas especies, constituyen aproximadamente la mitad de la MS de los hongos, encontrándose sus valores medios entre 35 y 70 g/100 g MS. Abarcan una amplia variedad de compuestos; desde azúcares simples (monosacáridos, oligosacáridos y sus derivados) a polisacáridos de reserva y construcción (glucanos). Es interesante señalar que los hongos contienen glucógeno y quitina, polisacáridos que se producen en los animales y no almidón ni celulosa, típicos de los vegetales (Kalac 2013).

Los azúcares mayoritarios en los hongos son el manitol y la trehalosa con valores medios de 28,9 g/kg MS para el manitol y 39,2 g/kg MS para la trehalosa (Kalac 2009). El manitol es el azúcar más abundante en especies como *Lactarius deliciosus*, *C. cibarius*, *A. bisporus* o *Volvariella volvacea*; mientras que en otras como *Pleurotus ostreatus*, *Boletus edulis*, *C. gambosa* o *L. nuda* predomina la trehalosa. Además de estos dos azúcares mayoritarios, también poseen cantidades considerables de otros como arabitol, galactosa, glucosa, inositol, manosa y fructosa (Barros, Cruz et al. 2008).

La fibra es una compleja mezcla de hidratos de carbono como: quitina, mananos y glucanos, con proteínas, ceras, saponinas o fitoesteroides, que el ser

humano no es capaz de digerir. Los hongos comestibles representan una fuente importante de fibra: 4,5 a 54,5 g/100 g MS (Manzi, Marconi et al. 2004), con valores medios de 40-90 g/Kg para la fibra soluble, y de 220-300 g/Kg para la fibra insoluble (Kalac 2009).

- Cenizas y composición mineral

El contenido normal de cenizas de los hongos oscila entre 60 g/Kg de MS (*P. ostreatus*) y 120 g/Kg de MS (*Craterellus cornucopioides*). En las especies silvestres se producen mayores variaciones que en las cultivadas, probablemente debido a que los sustratos de las primeras son más variables. Aún así, la variabilidad en los contenidos de ceniza parece ser menor que las de proteína cruda, lípidos y carbohidratos (Kalac 2013).

Los dos minerales mayoritarios en los hongos comestibles son el potasio y el fósforo. De hecho los hongos por lo general presentan en su composición valores de fósforo y potasio algo más altos o, al menos, comparables a los de la mayoría de las verduras (Kalac 2013).

Los hongos comestibles también presentan cantidades variables de calcio, zinc, hierro, magnesio, sodio y cobre (Guillamón, García-Lafuente et al. 2010).

- Vitaminas y provitaminas

Los hongos comestibles son considerados como una buena fuente de vitaminas, especialmente de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina (vitamina B₃), ácido fólico (vitamina B₉), tocoferol (vitamina E) y ergosterol (precursor de la vitamina D₂). Presentan además, trazas de ácido ascórbico (vitamina C), cianocobalamina (vitamina B₁₂) y β -caroteno, precursor del retinol (vitamina A).

El contenido normal de ácido ascórbico (vitamina C) en los hongos es 150-300 mg/Kg de MF, variando entre especies; así el contenido de *Agaricus spp.* es más bajo,

mientras que en *B. edulis* y *C. cibarius* se dan niveles superiores a la media (Kalac 2013).

El contenido normal de tocoferoles es de 0,5 a 3 mg/Kg de MS. Lo cual supone un nivel considerablemente más bajo que el que se da en los vegetales. Aunque varias especies tienen contenidos significativamente mayores, como es el caso de *Boletus reticulatus* y *Suillus variegatus* (Pereira, Barros et al. 2012). Las especies cultivadas parecen tener menores cantidades de tocoferoles que los hongos silvestres, predominando en ellos generalmente, el γ -tocoferol (Reis, Barros et al. 2012).

El β -caroteno, la provitamina A más potente, es menos común en los hongos que en las plantas. De hecho, su contenido es bajo, yendo desde un nivel indetectable hasta 6 mg/Kg de MS (Pereira, Barros et al. 2012).

Mayor atención ha recibido el ergosterol, provitamina del ergocalciferol (vitamina D₂). El contenido de este se sitúa en un margen entre 3000-7000 mg/Kg de MS. Aunque el género *Tuber* presenta valores inferiores: 640 y 1770 mg/Kg MS (Kalac 2009), sin embargo para el caso de otros fitosteroles, como principalmente para el brasicasterol, los niveles son similares a los del resto de hongos, situándose entre 480 mg/Kg de MS (Tang, Li et al. 2012).

La creciente demanda de proteínas por parte de la población hace de los hongos una fuente idónea a explotar, con la ventaja de que estas proteínas se acompañan de ácidos grasos insaturados lo que disminuiría los riesgos alimentarios que se asocian al consumo de proteínas de origen animal. Además, los hongos cuentan también con otras ventajas nutricionales, por ejemplo: una ración de hongos aporta entre un 10-40% de la fibra dietética diaria recomendada (en torno a 25-35 g/día) (Martínez Peña, Oria de Rueda et al. 2011).

1.3.4.2. Composición funcional

La preocupación de la población por su estado de salud cada vez es mayor, y eso se refleja no sólo en el seguimiento de una dieta equilibrada, sino también en la búsqueda de alimentos funcionales, que contribuyan a la obtención y preservación de un estado óptimo de salud y bienestar (Araújo, de Carvalho et al. 2010).

Esto no es un hecho aislado de la población, si no que los organismos públicos relacionados con la salud, también están buscando constantemente estrategias para mejorar los hábitos alimenticios y así, mejorar el estado global general frente a enfermedades crónicas como obesidad, aterosclerosis, hipertensión, osteoporosis, diabetes y cáncer (Moraes and Colla 2006).

La importancia creciente de los alimentos funcionales en la sociedad actual, ha contribuido a fomentar la investigación científica de nuevos componentes naturales biológicamente activos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Algunas especies de hongos han demostrado contener numerosas sustancias bioactivas sin presentar ningún tipo de toxicidad para la salud, lo que los caracteriza como alimentos funcionales (Lindequist, Niedermeyer et al. 2005). A continuación se describen dichas sustancias.

- Polisacáridos

Un gran número de las propiedades beneficiosas para la salud que presentan los hongos son debidas a su composición de polisacáridos. Más concretamente, a la presencia de quitina, β -glucanos, β -mananos y hetero-polisacáridos con enlaces glucosídicos (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) y (1 \rightarrow 6) (Zhang, Cui et al. 2007).

La actividad biológica de los polisacáridos, fundamentalmente en las últimas décadas, ha atraído la atención de la comunidad científica, debido principalmente a sus efectos biológicos como agentes inmunomoduladores y antitumorales.

Indiscutiblemente, los polisacáridos más estudiados son los beta-glucanos, por su capacidad para modular el sistema inmune. Estos compuestos actúan a través de diversos mecanismos como inducción de la hematopoyesis, activación del sistema de citoquinas, inhibición del crecimiento de células tumorales e inducción de la resistencia a infecciones virales y bacterianas (Vannucci, Krizan et al. 2013), lo que les confiere una variedad de efectos: antitumorales, inmunomoduladores, antiinflamatorios, antioxidantes, sequestradores de radicales libres, cardiovasculares, antihipercolesterolémicos, antivirales, antiparasitarios, antifúngicos, detoxificantes, hepatoprotectores y antidiabéticos (Wasser 2011) (Zhang, Cui et al. 2007).

Los glucanos son polímeros de D-glucosa que presentan enlaces glucosídicos (1→3)-, (1→4)-, (1→6)- tipo alfa (dextrano, glucógeno y almidón); (1→3)-, (1→6)- tipo beta (zymosan, laminarina, lentinan y pleuran); o tipo alfa-beta (es decir mixtos). En función de su constitución, se les puede considerar como homogluconos (sólo moléculas de glucosa) o heterogluconos (más tipos de moléculas, a parte de glucosa) (Synytsya and Novák 2012).

Se ha demostrado que la actividad biológica de los polisacáridos está íntimamente ligada a su composición química y estructural. Esto se debe a que su composición afecta, a su vez, a otros factores tales como la masa molecular, el grado de ramificación, la conformación final, la solubilidad en agua y la biodisponibilidad (Sletmoen and Stokke 2008).

Entre los polisacáridos funcionales de los hongos comestibles, sin duda los más estudiados son 4: lentinan, de *L. edodes*; schizophyllan, de *S. commune*; grifolan, de *G. frondosa* y SSG, de *Sclerotinia sclerotium*. El principal motivo por el cual han sido tan estudiados es su actividad antitumoral. También son de especial importancia para el tratamiento de ciertos cánceres, a parte de por sus efectos anticancerígenos por tratarse de agentes adyuvantes de eficacia probada para los tratamientos clásicos (quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, etc.) (Furusawa, Chou et al. 1992).

Además, varios polisacáridos como las fibras dietéticas solubles e insolubles dependiendo también de su estructura molecular y conformación, promueven el estado de salud general y del tracto gastrointestinal en particular, al mismo tiempo que disminuyen el riesgo de padecer diversas enfermedades. Favorecen el proceso de la digestión, fomentando el peristaltismo intestinal, y reducen los niveles en sangre de glucosa y colesterol (Wang, Zhang et al. 2014).

- Proteínas

A partir de diferentes especies de hongos se han aislado distintas proteínas con actividad inmunomoduladora así como antifúngica.

Tabla 3. Péptidos de hongos con propiedades antifúngicas (García-Lafuente, Moro et al. 2010)

COMPUESTO	ORIGEN
Hypsina	<i>Hypsizigus marmoreus</i>
Lentina	<i>L. edodes</i>
Alveolarina	<i>Polyporus alveolaris</i>
Eryngina	<i>Pleurotus eryngii</i>
Pleurostrina	<i>P. ostreatus</i>
Tricogina	<i>Tricholoma giganteum</i>
Agrocibina	<i>Agrocybe cylindracea</i>
Ganodermina	<i>G. lucidum</i>

Podemos distinguir diversas clases de proteínas con actividades biológicas como las FIPs (proteínas inmunomoduladoras de los hongos), glicoproteínas, proteínas no glicosiladas, péptidos, etc.

Complejos polisacárido-proteína: numerosos complejos de este tipo han demostrado tener actividad inmunomoduladora así como propiedades anticancerígenas. Sin embargo son principalmente 2 del hongo *T. versicolor* los que destacan por su

demostrada actividad anticancerígena, tanto *in vitro* como *in vivo*, y en ensayos en humanos: Polisacárido-K (PSK) y Polisacárido–Peptido (PSP) (Fisher and Yang 2002). Ambos debido a que son totalmente compatibles con la quimioterapia y la radioterapia, han sido incluidos en varias terapias contra el cáncer (Kidd 2000).

Lectinas: las lectinas son un tipo de proteínas de origen no inmune que tienen la capacidad de aglutinar células. Abundan en frutas, verduras y legumbres, así como en los hongos. Poseen un gran número de propiedades funcionales como mitogénicas, antiproliferativas, o inmunoestimulantes (García-Lafuente, Moro et al. 2010). Por ejemplo, una nueva lectina procedente del hongo *Pleurotus citrinopileatus* posee potentes efectos antitumoral y antimitogénico, además de una gran actividad inhibidora de la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana-1 (HIV-1) (Li, Liu et al. 2008).

Proteínas inmunomoduladoras de los hongos (FIPs): algunas de ellas han sido aisladas de distintas especies de hongos: *G. lucidum* (Kino, Yamashita et al. 1989), *Ganoderma tsugae* (Lin, Hung et al. 1997), *F. velutipes* (Ko, Hsu et al. 1995) y *V. volvacea* (Hsu, Hsu et al. 1997). Se ha demostrado, *in vitro*, que presentan efectos mitogénicos y activadores en linfocitos de la sangre periférica de humanos (hPBLs), por lo que estimulan la producción de citoquinas como la IL-2, el IFN- γ , y el TNF- α . Además, se ha demostrado que estas proteínas son, igualmente, capaces de actuar como agentes inmunosupresores (Moradali, Mostafavi et al. 2007).

- Componentes lipídicos

Algunos componentes de origen lipídico cuentan también con propiedades funcionales. Es el caso del ergosterol y del peróxido de ergosterol, y de ciertos ácidos grasos que presentan con propiedades antitumorales, antioxidativas, antiinflamatorias e inmunosupresoras.

El ergosterol es un componente exclusivo de los hongos. Se encuentra en las membranas celulares de levaduras y hongos y desempeña las mismas funciones que el

colesterol en las células animales (Margalith 1989). El ergosterol, además de ser el precursor de la vitamina D₂ (ergocalciferol), , cuenta con demostrada actividad antitumoral y antiinflamatoria y asimismo, en la última década, se ha reconocido su papel en la prevención de cáncer y modulación del sistema inmune (Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013).

El peróxido de ergosterol posee actividad citotóxica, inhibe el crecimiento de células cancerígenas e induce la apoptosis en células de leucemia humana HL60 (Takei, Yoshida et al. 2005).

- Terpenoides

Muchos terpenoides se encuentran en plantas, organismos marinos y hongos. Sin embargo los triterpenoides, que poseen propiedades medicinales, sólo se han aislado en hongos. De hecho sólo en los cuerpos fructíferos de los de la familia *Polyporaceae* y *Ganodermataceae* se han encontrado más de 100 diferentes, entre los que se encuentran ácidos ganodéricos, ácidos ganodenéricos y ácidos ganodérmicos entre otros (Moradali, Mostafavi et al. 2007).

Uno de los hongos más estudiados en este aspecto es *G. lucidum*; estudios con triterpenoides aislados del mismo han revelado poseer actividades antiinfecciosas, citotóxicas e inmunomoduladoras. El ácido ganodérico T (GA-T) purificado a partir de un extracto metanólico del micelio de *G. lucidum* resultó ser citotóxico para una línea celular de carcinoma humano de una manera dosis dependiente (Tang, Liu et al. 2006). De la misma manera, el ácido ganodérico Me (GA-Me), inhibe el crecimiento tumoral así como la metástasis de las células de cáncer de pulmón (Wang, Zhao et al. 2007).

- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están presentes en una extensa de variedad de organismos vivos, pero especialmente en las plantas, debido a que ejercen en ellas una amplia gama de respuestas ante factores genéticos y ambientales (Del Signore, Romeo et al. 1997).

El contenido fenólico de los hongos viene determinado por la presencia mayoritaria, aunque no exclusiva, de ácidos fenólicos, ya que también se dan otras clases de compuestos fenólicos dependiendo de las especies analizadas. Los flavonoides, representan los compuestos fenólicos que menos se dan en los hongos (Barros, Dueñas et al. 2009). De hecho son pocas las fuentes que prueban su presencia en escasas, y muy concretas, especies de los mismos (Iwashina 2000) (Ribeiro, Valentao et al. 2007).

Los compuestos fenólicos se encuentran entre las sustancias bioactivas más potentes desde el punto de vista terapéutico, proporcionando beneficios para la salud asociados con un menor riesgo de enfermedades crónicas y degenerativas. Muchos de sus efectos biológicos se han atribuido a su actividad antioxidante así como a la de eliminación de radicales libres (Soobrattee, Neergheen et al. 2005).

Las actividades biológicas de los compuestos fenólicos de procedencia vegetal han sido tradicionalmente muy estudiados por lo que sus efectos están bien definidos: antioxidantes, antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, antialérgicos, antihiperlipidémicos, inhibidores enzimáticos, protectores frente a enfermedades cardíacas y cáncer (Martínez-Flórez, González-Gallego et al. 2002). El estudio de estos compuestos en los hongos es mucho más reciente. Aún así, sus efectos biológicos son ya una evidencia (Palacios, Lozano et al. 2011). Una de las propiedades más estudiadas es su actividad antioxidante, tanto por sus implicaciones beneficiosas directas sobre la salud, como por la positiva influencia sobre determinadas enfermedades crónicas, en cuya patogénesis se ve implicada la acción de los radicales libres como isquemias

cardíacas y cerebrales, diabetes, arteriosclerosis, artritis reumatoide, inflamación e incluso en el inicio de ciertos tipos de cánceres, así como en el proceso de envejecimiento (Scalbert, Johnson et al. 2005).

Además de la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos presentes en los hongos tienen otros efectos menos estudiados como efectos antimicrobianos, anticancerígenos, hepatoprotectores, y antiinflamatorios (García-Lafuente, Moro et al. 2010).

I.3.5. Los hongos como alimento funcional

A medida que la ciencia de la nutrición avanza, el papel de la dieta en la salud parece estar variando. La principal función de la alimentación como tal es la de aportar la energía en forma de nutrientes de un modo correcto y suficiente como para cubrir las necesidades fisiológicas, biológicas y metabólicas de los individuos. Sin embargo, hoy en día las investigaciones sobre la alimentación se están centrando en los beneficios que los diferentes alimentos son capaces de aportar a la salud y bienestar, más allá de su aspecto puramente nutricional (Isolauri 2001). El descubrimiento de los potenciales efectos beneficiosos de distintos nutrientes y otros componentes de la dieta ha llevado al concepto de alimentación funcional, basada no en el valor nutritivo de los alimentos de la dieta, sino en el potencial de los mismos para promocionar y favorecer la salud así como para reducir el riesgo de padecer enfermedades. Por tanto, hoy en día podemos decir que un alimento es funcional, cuando se ha demostrado experimentalmente que afecta positivamente a una o varias funciones del organismo, favoreciendo la salud y bienestar o disminuyendo la incidencia de enfermedades (Valencia and Román 2004).

En base a esta definición, los alimentos funcionales se clasifican en diferentes categorías:

-Alimentos que no han sufrido modificación alguna: dentro de estos se encuentran los hongos, las legumbres, frutas, hortalizas...

-Alimentos modificados: aquellos que han sido enriquecidos con algún tipo de nutriente, aumentando su contenido natural de fitoquímicos o aquellos a los que se les ha retirado alguno de sus componentes.

-Alimentos desarrollados por medio de la ingeniería genética y de la biotecnología (Valencia and Román 2004).

Los hongos como alimento, son apreciados en todo el mundo por sus sabores, aromas y texturas. Además de sus propiedades nutricionales, expuestas anteriormente, varios estudios demuestran que el consumo regular de hongos o de compuestos bioactivos presentes en los mismos es beneficioso para la salud (Lakhanpal and Rana 2005). Su rica composición en sustancias bioactivas les confiere una serie de propiedades biológicas desde el punto de vista de la salud como hepatoprotectora, antiosteoporótica, antimicrobiana, antiaterogénica, inmunomoduladora o antiinflamatoria, entre otras (De Diego Calonge 2011).

1.3.5.1. Actividad hepatoprotectora

Diversos estudios demuestran que los hongos, en concreto extractos acuosos, alcohólicos o hidroalcohólicos de cuerpos fructíferos o micelios de hongos basidiomicetes y ascomicetes, poseen actividades hepatoprotectoras.

Esta actividad hepatoprotectora de los hongos se ha demostrado en modelos *in vivo*, alimentando animales con hongos íntegros o con extractos no purificados de los mismos, o incubando preparaciones de tejidos hepáticos con extractos semi o totalmente purificados (Soares, de Sa-Nakanishi et al. 2013). Extractos obtenidos a partir de especies de hongos comestibles como *Panus giganteus*, *L. edodes* o *G. frondosa* han demostrado actividad hepatoprotectora en modelos de daño hepático *in vivo* (Wong, Abdulla et al. 2012).

Se han identificado distintos mecanismos a través de los cuales los hongos ejercen esta acción. Algunos extractos de *G. lucidum* actúan a través de su capacidad antioxidante y de secuestro de radicales libres (Shieh, Liu et al. 2001), otros como

extractos de *Agaricus blazei*, mediante la acción directa sobre la membrana plasmática de los hepatocitos (Al-Dbass, Al-Daihan et al. 2012).

También se han logrado identificar distintos compuestos responsables de este efecto como triterpenoides, polisacáridos y péptidos de *G. lucidum* (Zhou, Jia et al. 2002), un compuesto llamado antrhaquinol de *Antrodia camphorata* (Kumar, Chu et al. 2011a), polisacáridos del micelio de *P. ostreatus* (Nada, Omara et al. 2010) (Refaie, Esmat et al. 2010) y *P. eryngii* (Chen, Mao et al. 2012), polisacáridos endo-miceliales de *H. erinaceus* (Zhang, Lv et al. 2012) o una lectina de *Pleurotus florida* (Rana, Bera et al. 2012).

1.3.5.2. Actividad antiosteoporótica

Se ha demostrado que varias especies de hongos poseen potencial para tratar o prevenir la osteoporosis:

Según el CMA (Centro Médico Adaptógeno, Medicina Sistémica), en base a ensayos llevados a cabo con ratas, extractos provenientes de *P. eryngii* cuentan con efectos estimulantes para los osteoblastos, puesto que tras 4 semanas de tratamiento con el extracto, produjeron masa ósea de un modo más rápido que aquellas que no recibieron el tratamiento, cuyos huesos permanecieron más frágiles, además de sufrir pérdida de peso. *P. eryngii* cuenta con principios activos que estimulan, *in vitro*, los osteoblastos mientras inhiben la acción de los osteoclastos (De Diego Calonge 2011).

Qi et al., trabajando con ratas a las que se les había inducido la osteoporosis, demostraron cómo el tratamiento oral de dichas ratas con un extracto de *C. sinensis* acompañado de estroncio, mejoraba el estado de osteoporosis, puesto que producía un aumento de los niveles de osteocalcina y estradiol (Qi, Wang et al. 2011).

1.3.5.3. Actividad antimicrobiana

La cada vez mayor prevalencia de enfermedades infecciosas se está convirtiendo en un gran problema a nivel mundial, la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a fármacos, están haciendo que la efectividad de los tratamientos destinados a combatir sus infecciones, se haya visto disminuida (Donadio, Carrano et al. 2002). Por ello, es urgente el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos que sean efectivos frente esos microorganismos patógenos resistentes.

El reino Fungi es muy apreciado desde el punto de vista biomédico debido a los antibióticos que se han conseguido extraer de ciertas especies (la penicilia, extraída del hongo filamentoso *Penicillium*, representa el mejor ejemplo). Muchos de los metabolitos secundarios de los hongos son capaces de combatir bacterias (Obuchi, Kondoh et al. 1990) y virus (Brandt and Piraino 2000). Sin embargo la presencia de antibióticos dentro de la clase Basidiomycetes, que es la que representa a la mayoría de las especies que comúnmente conocemos como hongos, apenas está documentada (Wasser and Weis 1999). A pesar de haberse demostrado que extractos provenientes de hongos basidiomicetes tienen actividad antibacteriana (Hirasawa, Shouji et al. 1999) todos los antibióticos de origen fúngico que se comercializan hoy en día, provienen de hongos microscópicos.

Diversos estudios demuestran que distintas especies de hongos presentan actividad antibacteriana tanto frente a bacterias Gram + como -: el micelio de *F. velutipes* posee actividad antibacterial frente a las Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Ishikawa, Fukushi et al. 2001). El extracto proveniente del cuerpo fructífero de *Armillariella mellea* también posee actividad antibacterial frente a *Bacillus cereus*, *in vitro* (Obuchi, Kondoh et al. 1990). *Laetiporus sulphureus*, además de poseer capacidad inhibitoria sobre las Gram positivas, incluyendo *B. cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Micrococcus flavus*, también posee un estrecho espectro antibacteriano frente a las Gram negativas (Turkoglu, Duru et al. 2007). Extractos de *L.*

edodes poseen actividad antibacterial frente a los dos tipos de bacterias (Hirasawa, Shouji et al. 1999).

Varios trabajos demuestran que triterpenos y sesquiterpenos provenientes de hongos son potentes agentes antibacterianos (Ishikawa, Fukushi et al. 2001; Wilkens, Alarcon et al. 2002). El ácido armillárico, un terpenoide aislado del hongo *Armillaria mellea*, inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas (Obuchi, Kondoh et al. 1990).

Los polisacáridos aislados del cuerpo fructífero de *L. edodes*, lentinano y krestin, también presentan actividad antibacteriana (Jong and Birmingham 1993) (Hiroshi and Takeda 1993).

Tabla 4. Compuestos obtenidos de especies de hongos con actividad antibacteriana

HONGO	COMPUESTO	MICROORGANISMO FRENTE AL QUE ACTÚA	REFERENCIA
<i>A.mellea</i>	Ácido armillárico	Bacterias Gram positivas	(Obuchi, Kondoh et al. 1990)
<i>S. commune</i>	Schizophyllan	Bacterias Gram positivas y negativas	(Komatsu, Nagumo et al. 1973) (Matsuyama, Mangindaan et al. 1992)
<i>Agaricus xanthoderma</i>	Psalliotin	Bacterias Gram positivas	(Dornberger, Ihn et al. 1986)
<i>Trametes spp.</i>	Coriolin	Bacterias Gram positivas	(Takeuchi, linuma et al. 1969)
<i>L. edodes</i>	Lentinano	Bacterias Gram positivas y negativas	(Jong and Birmingham 1993)
<i>L. edodes</i>	Krestin	Bacterias Gram positivas y negativas	(Jong and Birmingham 1993) (Hiroshi and Takeda 1993)

1.3.5.4. Actividad antiviral

Se han descrito efectos antivirales de hongos comestibles, tanto en extractos como en compuestos aislados, mediante dos mecanismos:

- Mecanismos directos: llevados a cabo por moléculas pequeñas, como péptidos, lectinas, o ribonucleasas que inhiben directamente el desarrollo del virus. Son los llamados antivirales verdaderos.
- Mecanismos indirectos: en este caso el efecto antiviral lo llevan a cabo moléculas como polisacáridos y otros compuestos complejos, como consecuencia de su actividad inmunomoduladora (Brandt and Piraino 2000).

Diversos tipos de extractos poseen actividades antivirales. Extractos de *Fomes fomentarius* inducen la inhibición del virus del mosaico del tabaco (De Diego Calonge 2011). También se demostró que un extracto obtenido del medio de cultivo dónde se desarrolló el micelio de *L. edodes*, inhibía la replicación del virus del sida *in vitro* (Tochikura, Nakashima et al. 1988). Además, se han aislado distintos compuestos con actividad antiviral, a partir de diferentes especies de hongos (Tabla 5).

Tabla 5. Compuestos obtenidos de especies de hongos con actividad antiviral

HONGO	COMPUESTO	VIRUS QUE AFECTA	REFERENCIA
<i>Cordyceps militaris</i>	Cordicepina	Leucovirus	(Mauvernay, Pourrat et al. 1978)
<i>Rozites caperatus</i>	Proteína RC-183	Virus de la gripe A Virus del sarcoma de Rous Virus del herpes simple Virus sincital de los pulmones Virus de la varicela	(Piraino and Brandt 1999)
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	Ácido aplanoxídico Ganodermediol Lucidadiol	Virus del herpes simple Virus de la gripe A	(Lindequist, Niedermeyer et al. 2005)
<i>G. lucidum</i>	Ácido ganodérico B Ganoderiol Ganodermanontriol Ácido ganodérico alfa	Virus del sida	(el-Mekkawy, Meselhy et al. 1998)
<i>L. edodes</i>	Lentinano	Virus del sida Virus de la estomatitis vesicular Virus de la gripe	(Brandt and Piraino 2000)

1.3.5.5. Actividad antitumoral

Lucas y su equipo fueron los primeros en demostrar las propiedades antitumorales de los hongos, cuando investigaron la influencia que tenían extractos obtenidos a partir de cuerpos fructíferos de *B. edulis* y otros *Homobasidiomycetes* sobre la línea 180 de sarcoma en ratones (Lucas 1957). Desde entonces y hasta ahora, se ha demostrado que hongos pertenecientes a una gran variedad de especies así como extractos obtenidos a partir de ellos, poseen efectos antitumorales (García-Lafuente, Moro et al. 2010). Entre ellos *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Ganoderma*, *Auricularia*, *Collybia*, *Flammulina*, *Pholiota*, *Tremella*, *Tricholoma*, *Fomes*, *Russula*, *Albatrellus*, *Lactarius*, *Xerocomus*, *Antrodia*, *Calvatia*, *Cordyceps*, *Clitocybe* y *Volvariella* (Mattila, Suonpaa et al. 2000) (Patel and Goyal 2012).

A partir de estas especies se han aislado distintos extractos con actividades antitumorales muy diversas.

Existen extractos de hongos que ejercen su actividad antitumoral mediante un único mecanismo de acción como, extractos ricos en β -glucanos, obtenidos a partir de *H. erinaceus*, cuya actividad antitumoral es debida a sus efectos inmunomoduladores (Kim, Kang et al. 2011), o un extracto obtenido de *Inonotus obliquus*, que ejerció su actividad antitumoral, inhibiendo el crecimiento de masas tumorales de melanoma B16-F10 en ratones (Sun, Yin et al. 2011). Por el contrario, otros extractos poseen más de un modo de acción. Extractos de *P. ostreatus* y de *A. camphorata* son capaces de detener el ciclo celular e inducir la apoptosis en líneas de cáncer de colon (HT-29) (Lavi, Friesem et al. 2006) y de mama (MDA-MB-231) (Yang, Kuo et al. 2011). Extractos obtenidos de *Phellinus linteus* han demostrado poseer actividad antitumoral mediada a través de efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios *in vivo* (Huang, Chieh et al. 2011), así como mediante efectos antiangiogénicos *in vitro* e *in vivo* (Lee, Kim et al. 2010).

Finalmente, mientras ciertos extractos presentan actividad antitumoral frente a una determinada línea celular, como algunos de los extractos obtenidos a partir de *Coprinus comatus*, que demostraron ser efectivos frente a la línea tumoral MCF7 de cáncer de mama (Asatiani, Wasser et al. 2011); otros, como el extracto acuoso del micelio de *Funalia trogii*, ejercen su actividad antitumoral frente a distintas líneas celulares cancerosas: LNCaP, HT29, MCF-7, MDA-MB-231 y PC3 (Rashid, Unyayar et al. 2011).

Actualmente se han identificado diversos compuestos con actividad antitumoral de diferente naturaleza: polisacáridos, proteínas, esteroides, glicopéptidos y otros complejos protéicos, alcaloides, compuestos fenólicos, etc. Entre todos ellos, destacan claramente los polisacáridos, especialmente los β -glucanos, que han sido identificados como los principales responsables de tal efecto (Chen and Seviour 2007). Estos compuestos son capaces de inhibir el crecimiento de tumores mediante dos vías: la

estimulación del sistema inmune, concretamente del sistema innato, aumentando la actividad de macrófagos, células NK o linfocitos T (Wasser 2002), y a través de la actuación directa sobre las propias células tumorales, puesto que son capaces de inhibir su proliferación e inducir la apoptosis (Wang, Zhao et al. 2007). Esto hace que resulten efectivos frente a un amplio espectro de líneas celulares cancerígenas. Polisacáridos obtenidos del micelio cultivado de *Lactarius flavidulus*, son capaces de inhibir el crecimiento del Sarcoma 180 al 100% tras ser administrados intraperitonealmente en ratones (Wu, Wang et al. 2011). Otros, como los obtenidos de *Fomes fomentarius* o *Phellinus linteus* muestran efectos antitumorales sobre las líneas celulares de cánceres de colon, SGC-7901 y SW40, respectivamente (Chen, Zhao et al. 2011)(Li, Kim et al. 2004). Finalmente, el proteoglicano purificado de *P. linteus* presenta un rango de actuación más amplio al ejercer efectos antiproliferativos sobre líneas celulares cancerosas humanas de colon (HT-29), de hígado (HepG2), de mama (Mcf-7) y de pulmón (NCI-H 460) (Li, Ji et al. 2011).

Otros compuestos de naturaleza no glucídica también cuentan con actividad antitumoral. Los ácidos ganodéricos T (GA-T) y Me (GA-Me), extraídos de especies del género *Ganoderma*, han demostrado efectos antitumorales sobre la línea HTC-116 de cáncer de colon (Chen and Zhong 2011) (Zhou, Shi et al. 2011). La agaritina, un derivado de la hidracina obtenida de *A. blazei* induce moderadamente la apoptosis en células de linfoma de monocitos U937 (Akiyama, Endo et al. 2011). Un esteroide de *Russula cyanoxantha* cuenta con actividad antiproliferativa y citotóxica frente a células HepG2, así como una lectina obtenida de la misma especie también demostró actividad anticancerígena sobre HepG2, además de en MCF-7 y S-180 (Zhang, Sun et al. 2010). Otra lectina, extraída de *L. flavidulus*, suprime la proliferación de las líneas cancerosas L1210 y HepG2 (Wu, Wang et al. 2011). El compuesto antroquinonol, de *A. camphorata*, es efectivo en la reducción de la proliferación de la línea A549 de carcinoma de pulmón humano, en función de la dosis y del tiempo, mediante la inducción de la apoptosis (Kumar, Yuan et al. 2011b).

Por tanto, no hay duda de que los hongos y los productos procedentes de los mismos, presentan un potencial muy grande para el tratamiento del cáncer. De hecho varias empresas farmacéuticas como: Zheijiang Fangge Pharmaceutical & Healthcare Products Co. Ltd., FineCo Ltd. ó Mushroom Wisdom, ya se dedican a la producción de drogas y fórmulas anti cáncer, y de suplementos para su prevención.

1.3.5.6. Actividad hipolipemiente

Las investigaciones pioneras acerca de las propiedades hipolipemiantes de los hongos comestibles datan del 1966 y fueron llevadas a cabo por Kaneda y su equipo, que estudiaron los efectos hipocolesterolémicos de las especies *L. edodes*, *A. polytricha*, *F. velutipes* y *A. bisporus*. La administración a ratas de una dieta que contenía un 5% de hongos deshidratados durante 10 semanas, produjo una disminución de los niveles de colesterol en plasma de las mismas (Kaneda and Tokuda 1966). Posteriormente este efecto fue demostrado también en otras especies de hongos: *P. ostreatus* (Bobek and Galbavý 1999), *G. lucidum* (Berger, Rein et al. 2004), *Auricularia auricula* (Chen, Luo et al. 2008) y *Tremella fuciformis* (Cheng, Hou et al. 2002), por ejemplo.

Este efecto se relaciona con ciertos compuestos de los hongos como son polisacáridos (Chen, Luo et al. 2008), fibra, esteroides y ácido nicotínico (Hu, Liang et al. 2006). Dichos compuestos pueden afectar tanto a la síntesis como a la excreción del colesterol. Por ejemplo, la fibra, actúa influyendo sobre la absorción y el reciclaje de los ácidos biliares, lo cual se traduce en un aumento del colesterol excretado. La fibra procedente de diferentes especies: *L. edodes*, *G. frondosa* y *F. velutipes* ha demostrado ser eficaz en la reducción del colesterol en suero de animales de laboratorio cuando se administra como parte de la dieta (Fukushima, Ohashi et al. 2001).

1.3.5.7. Actividad antiaterogénica

La patogénesis de la aterosclerosis se ve significativamente influenciada por las especies reactivas de oxígeno, así como por niveles elevados de lípidos en sangre. Por lo que un control sobre dichos lípidos, especialmente sobre el colesterol, es fundamental a la hora de reducir el riesgo de padecer aterosclerosis.

Un ejemplo lo constituye *P. ostreatus*. La alimentación de ratas con una dieta que incluía dicha especie, redujo la incidencia y el tamaño de placas de aterosclerosis. Este efecto se asoció a que *P. ostreatus*, combina el efecto hipocolesterolémico con el de inhibir la peroxidación lipídica (Bobek and Galbavý 1999).

1.3.5.8. Actividad antioxidante

El estrés oxidativo está altamente implicado tanto en varias enfermedades como en el proceso de envejecimiento (Sohal 2002). A pesar de que las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno desempeñan un papel importante para el mantenimiento de la salud, su exceso conduce a situaciones de estrés oxidativo que resultan perjudiciales (Alves, David et al. 2010).

El organismo cuenta con mecanismos intrínsecos para combatir el estrés oxidativo, como enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Niki, Shimaski et al. 1994). Además, los antioxidantes alimenticios pueden ayudar a estos mecanismos intrínsecos a luchar contra el estrés oxidativo, por lo que una dieta equilibrada es uno de los pilares de la terapia para la prevención de esta situación (Brown, Waslien et al. 2003). Entre los alimentos más ricos en antioxidantes naturales se encuentran los de origen vegetal como frutas y verduras, pero también los hongos, que a medida que se ha avanzado en su estudio y conocimiento, han pasado a considerarse como fuentes destacadas de sustancias antioxidantes (Kozarski, Klaus et al. 2012). Los hongos cuentan con distintos

componentes con actividad antioxidante como compuestos fenólicos, tocoferoles, ácido ascórbico, polisacáridos, terpenoides y complejos polisacáridos-proteínas (Kosanic, Rankovic et al. 2012). El estudio de 8 extractos obtenidos del género *Pleurotus* (*Pleurotus djamor*, *P. eryngii*, *P. citrinopileatus*, *P. ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *P. florida* y *Pleurotus flabellatus*) demostró que todas las especies presentaban una actividad quelante que era incluso superior, a la del agente utilizado como referencia (EDTA 100 pm), y que los extractos de *P. eryngii*, *P. djamor* y *P. flabellatus*, en su concentración más alta, ejercían una actividad de secuestro de radicales libres mayor que la de los estándares empleados (vitaminas C y E) (Mishra, Pal et al. 2013). Los géneros *Ganoderma* y *Lentinus*, también poseen especies con demostrada actividad antioxidante. Extractos de *G. applanatum*, *G. lucidum* y *L. edodes*, ricos en polisacáridos, compuestos fenólicos y proteínas revelaron capacidad para el secuestro de radicales libres, inhibición de la peroxidación lipídica, poder reductor y habilidad quelante de iones de hierro (Kozarski, Klaus et al. 2012). Extractos de otras especies como *Inonotus obliquus* o *Hypsizygus ulmarius*, también demostraron elevadas propiedades antioxidantes (Hu, Zhang et al. 2009) (Mishra, Pal et al. 2013).

La rica composición de los hongos en este tipo de compuestos, ha hecho que ya se disponga de fórmulas comerciales con demostrada actividad antioxidante, como es el caso de preparaciones en polvo de dos de los hongos comestibles más famosos y estudiados: *A. blazei* y *L. edodes* (Carneiro, Ferreira et al. 2013).

Por ello, los hongos podrían ser considerados como posibles ingredientes o alimentos funcionales, contra enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo. Aunque a la hora de administrarlos en la dieta, habría que tener muy en cuenta que durante los procesos de cocinado o procesado de los mismos, su actividad antioxidante puede verse afectada (Barros, Baptista et al. 2007b).

1.3.5.9. Actividad inmunomoduladora

Muchos de los efectos terapéuticos que poseen los componentes de los hongos son consecuencia de su actividad inmunomoduladora. De hecho se está investigando mucho en este sentido, en cuanto a la capacidad que tienen extractos o metabolitos de los hongos para estimular o disminuir la actividad de ciertos componentes del sistema inmune, puesto que podrían ser de gran utilidad en el tratamiento de ciertas patologías (García-Lafuente, Moro et al. 2010).

Entre los compuestos inmunomoduladores más efectivos de los hongos destacan un tipo de polisacáridos, los 1,3-β-glucanos ramificados en 1,6. Pero también cuentan con propiedades inmunomoduladoras otros compuestos como ciertas proteínas, proteoglicanos, terpenos, furanos, complejos polisacárido-péptido y polisacárido-proteína, y otros compuestos de bajo peso molecular (Borchers, Krishnamurthy et al. 2008).

Tabla 6. Ejemplos de compuestos de hongos con actividad inmunomoduladora (García-Lafuente, Moro et al. 2010)

COMPUESTO	ORIGEN	EFEECTO	ESTUDIO
Complejo polisacárido-péptido	<i>T. versicolor</i>	Activación de macrófagos y linfocitos	<i>In vivo</i>
Galactomanano	<i>M. esculenta</i>	Activación de macrófagos	Monocitos humanos THP
Proteoglicano	<i>P. ostreatus</i>	↑Citotoxicidad de NK ↑Producción de NO por macrófagos	<i>In vitro e in vivo</i>
Fracción-D	<i>G. frondosa</i>	Activación de macrófagos y DC Estimulación de la respuesta Th-2 ↑Respuesta Th-1 ↓Respuesta Th-2 Activación de NK	Ratones normales
Proteoglicano	<i>P. linteus</i>	Activación DC ↑Respuesta Th-1 ↓Respuesta Th-2	<i>In vitro e in vivo</i>
Polisacárido ácido	<i>P. linteus</i>	Activación de macrófagos	<i>In vitro e in vivo</i>
Polisacárido L-II	<i>L. edodes</i>	Activación de macrófagos y células T	Ratones con sarcoma 180
Lentinan	<i>L. edodes</i>	Respuesta Th-1	<i>In vitro</i>
Polisacáridos	<i>L. edodes</i>	Activación de macrófagos: producción de NO, expresión de citoquinas y fagocitosis	<i>In vitro</i> RAW 264.7

Tabla 6 continuación

Exopolisacárido	<i>L. edodes</i>	Activación de macrófagos	RAW 264.7
Glicoesfingolípido	<i>H. marmoreus</i> <i>P. eryngii</i>	Activación de DC Respuesta Th-1	Células de ratón <i>In vitro</i>
Polisacárido	<i>A. blazei</i>	Estimulación células Th	<i>In vivo</i>
Proteoglicano	<i>A. blazei</i>	Maduración DC	<i>In vitro</i>
Extracto Polisacárido (Ganopoly)	<i>G. lucidum</i>	↑ Actividad de NK	Pacientes con avanzados estados de cáncer
Extracto Polisacárido (Ganopoly)	<i>G. lucidum</i>	↑ TNF-α e IFN-γ ↑ Citotoxicidad de Tc ↑ Actividad de NK	Pacientes con avanzados estados de cáncer
Polisacárido	<i>G. lucidum</i>	Activación y maduración de DC Respuesta Th1	<i>In vitro</i> Ratones BALB/c
Polisacáridos	<i>G. lucidum</i>	Expresión de citoquinas Fagocitosis de macrófagos Maduración de DC Proliferación PBMC ↑ IL-12, IL-10	Macrófagos humanos J774.A <i>In vitro</i>
Fucogalactan	<i>S. aspratus</i>	Activación de macrófagos	<i>In vitro</i>
Albaconol	<i>Albatrellus confluens</i>	Inhibición de la maduración de DC y de la estimulación de células T	<i>In vitro</i>
Proteínas	<i>V. volvacea</i> <i>G. lucidum</i>	Activación de monocitos y células T	hPBMC

Los mecanismos de acción de los compuestos inmunomoduladores son muy variados, ya que pueden actuar sobre distintos tipos celulares del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, así como sobre las vías de señalización y las redes de citoquinas que dichas células producen.

- Efectos sobre el sistema inmune innato

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra organismos patógenos así como de otra índole como por ejemplo células tumorales malignas que puedan darse de manera espontánea. Lo constituyen diferentes tipos celulares: macrófagos, neutrófilos, NK y células dendríticas; y está regulado por moléculas que actúan como mensajeros químicos llamados citoquinas y por la activación de la respuesta inflamatoria y de la fase aguda.

Algunos componentes de los hongos pueden estimular la respuesta inmune innata a través de sus efectos sobre distintos tipos celulares:

Efectos sobre macrófagos.- Los macrófagos desempeñan un papel muy importante en todas las fases de la defensa inmunitaria, tienen un campo de actuación muy amplio que abarca la fagocitosis, la presentación y el procesamiento de antígenos, y la secreción de citoquinas que modulan el equilibrio Th1/Th2.

Tras el reconocimiento y la posterior fagocitosis, se activan numerosas enzimas (iNOS, COX-2, etc.) y como consecuencia de esto, se producen una gran variedad de moléculas bactericidas y citotóxicas, como NO. Además, los macrófagos activados liberan moléculas inflamatorias como PGE₂, numerosas citoquinas como IL-1, TNF- α , quemoquinas y quimioatrayentes como IL-8 y MIP-1, que activan otras células del sistema inmune (Lull, Wichers et al. 2005).

Numerosos estudios han demostrado que tanto extractos como metabolitos de hongos comestibles, pueden activar las funciones de los macrófagos. Investigaciones llevadas a cabo por diferentes grupos de trabajo demostraron que extractos obtenidos a partir de *A. blazei* inducen la activación de macrófagos y monocitos, provocando el aumento de la secreción de citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 β y TNF- α , y de NO, así como de sus expresiones génicas (Sorimachi, Akimoto et al. 2001) (Ellertsen, Hetland et al. 2006). Extractos provenientes de *Hericium erinaceum* también activaron a macrófagos; aumentaron la producción de NO e IL-1 β en la línea celular RAW 264.7 vía expresión génica, mediante la estimulación de la actividad del factor de transcripción nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Son, Shin et al. 2006a) (Son, Shin et al. 2006b). El extracto de *Lentinus lepideus* también aumentó la producción de citoquinas (IL-1 β , IL-10, IL-12, y TNF- α) de manera dependiente de la dosis, a través de la activación de NF- κ B (Jin, Jung et al. 2003).

En la actualidad se han identificado distintos compuestos activos como proteínas, péptidos y complejos polisacárido-péptido, aunque los polisacáridos han resultado ser los más efectivos.

Dentro de los polisacáridos, los β -glucanos, resultan ser particularmente activos. Son capaces de desencadenar una serie de acciones que modulan la respuesta innata de manera directa, influyendo también sobre la respuesta adaptativa de modo indirecto, principalmente mediante la liberación de citoquinas pro inflamatorias, (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) y de moléculas citotóxicas como los mediadores inflamatorios NO o H₂O₂ (Kaneko and Chihara 1992) (Vannucci, Krizan et al. 2013). Una de las especies más estudiadas al respecto es *G. frondosa* y el β -glucano más conocido aislado de dicha especie: el grifolan. Diversos estudios, *in vitro*, han comprobado que grifolán induce en macrófagos RAW 264.7, la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α (Adachi, Okazaki et al. 1994) y de NO a través de iNOS (Sanzen, Imanishi et al. 2001).

A parte de los β -glucanos, otros polisacáridos inducen la estimulación de los macrófagos. El polisacárido L-II, aislado de *L. edodes*, restablecía la inmunidad deprimida de ratones previamente inoculados con Sarcoma 180, mediante el aumento de la fagocitosis de los macrófagos hacia las células tumorales, el incremento de la producción de TNF- α , NO, IFN- γ , y la actividad catalasa (Zheng, Jie et al. 2005). Otras fracciones de polisacáridos obtenidas de este mismo hongo, a partir de diferentes extractos, también estimulan la activación de macrófagos, mediante la inducción de la fagocitosis, la expresión de citoquinas y la producción de NO (Lee, Lee et al. 2009). El polisacárido ácido de *Phellinus linteus*, PL, posee actividad inmunomoduladora y antitumoral, *in vitro* e *in vivo*, por mediación de las vías proteína quinasa C (PCK) y proteína tirosina quinasa (PTK) (Kim, Oh et al. 2003). Un fucogalactano aislado a partir de *Sarcodon aspratus*, y un galactomanano obtenido de un extracto polar de *M. esculenta* incrementaron la actividad de los macrófagos, aumentando la producción de NO y TNF- α , y de la expresión de NF-kB (Duncan, Pugh et al. 2002).

Los complejos polisacárido-proteína también son capaces de modular la respuesta inmunitaria. El complejo polisacárido-péptido de *L. edodes*, LE, induce la expresión y la producción *in vitro* de IL-2 y TNF- α (Liu, Li et al. 1998). Y el complejo polisacárido-péptido extraído de *Tricholoma mongolicum*, estimula en ratones la

proliferación de células T y aumenta la producción de NO de los macrófagos (Wang, Ng et al. 1996).

Efectos sobre las células natural killer (NK).- Las células natural killer son un tipo de linfocitos importantes en la respuesta inmune innata, ya que se encargan de destruir células tumorales y células que hayan sido infectadas por microorganismos patógenos así como de producir interferon- γ (IFN- γ). Además, una vez se han activado, estas células liberan citoquinas y quimioquinas que inducen respuestas inflamatorias, modulan a los monocitos, las células dendríticas y el crecimiento y diferenciación de los granulocitos. También influyen posteriormente en la respuesta inmunitaria adaptativa (Wu and Lanier 2003).

Varias especies de hongos comestibles han demostrado contar con metabolitos capaces de estimular estas células. Es el caso de extractos de dos especies del género *Agaricus*, *A. blazei* y *A. bisporus*, que aumentan la actividad de las células NK incrementando su producción de IL-12 e IFN- γ (Yuminamochi, Koike et al. 2007), y de IFN- γ y TNF- α (Wu, Pae et al. 2007), respectivamente.

G. frondosa, es muy valorado desde el punto de vista medicinal por sus propiedades anticancerígenas. El β -glucano, Fracción D, de dicho hongo presenta efectos antitumorales en ratones portadores de tumores mediante el aumento de sistema inmune a través de la activación de macrófagos, células T y NK (Hishida, Nanba et al. 1988). También inhibe la metástasis en un modelo de cáncer de pulmón de ratón por mediación de la activación de las células NK (Masuda, Murata et al. 2008).

De la misma manera, tres fracciones de proteoglicanos solubles en agua obtenidas a partir de micelio de *P. ostreatus* presentaban efecto inmunomodulador y anticancerígeno en ratones con Sarcoma-180. Estudios *in vitro* demostraron, que dicha actividad estaba mediada por el aumento de actividad citotóxica de células NK y la estimulación de macrófagos a la producción de NO (Sarangi, Ghosh et al. 2006). El pleurotán, un β -D-glucano obtenido a partir de *P. ostreatus* era capaz de reducir la

incidencia de las infecciones del tracto respiratorio en atletas cuando se les administró a éstos en forma suplemento alimenticio. Lo cual se asoció directamente al efecto que la administración de pleurotán tiene sobre las células NK (Majtan 2012).

Efectos en las células dendríticas.- Son células presentadoras de antígenos capaces tanto de inducir la respuesta adaptativa como de mantener la tolerancia a antígenos propios, por lo que son células de gran importancia para la inmunidad innata así como para la adquirida (Banchereau, Briere et al. 2000).

Ciertos hongos, así como algunos de sus componentes son capaces de activar la maduración de células dendríticas, aumentando así, la respuesta inmune. Ren y colaboradores demostraron, *in vitro*, que *A. bisporus* promueve la maduración de las células dendríticas y aumenta su función de presentación de antígenos. Este hecho, supone que dicho hongo, posee un importante potencial para ampliar tanto la inmunidad innata como aquella mediada por las células T (Ren, Guo et al. 2008).

Varios de los polisacáridos que contiene *G. lucidum* también cuentan con efectos sobre este tipo de células. Se ha comprobado, *in vitro*, que promueven la maduración de las células dendríticas provenientes de la médula ósea de ratón (Cao and Lin 2003). Este mismo efecto se ha demostrado en células dendríticas derivadas de monocitos humanos a través de la acción del factor de transcripción NF- κ B y de la proteína quinasa activada por mitógenos, p38 (Lin, Lee et al. 2006).

No obstante, hay otros hongos con compuestos capaces de actuar sobre la activación y maduración de las células dendríticas; componentes solubles de *Armillariella mellea*, proteoglicanos de *A. blazei* y de *Phellinus linteus*, o lentinan de *L. edodes* (García-Lafuente, Moro et al. 2010).

- Efectos sobre el sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo proporciona una respuesta inmunitaria más lenta pero con mayor especificidad que la respuesta innata. Una vez los leucocitos del

sistema inmune innato han sido activados, éstos producen citoquinas y presentan los antígenos a los linfocitos T y B, lo cual lleva a la activación de la respuesta inmune adaptativa (Plat and Mensink 2005).

Los hongos presentan efectos a distintos niveles de la respuesta inmune adaptativa:

Efectos sobre las células T.- Se cree que la polarización de los linfocitos Th0 hacia Th1 o Th2, juega un importante papel en el curso de enfermedades de carácter autoinmune e infeccioso. Por lo que el mantenimiento de un correcto equilibrio Th1 y Th2 es esencial para el tratamiento de dichas enfermedades.

Algunas especies de hongos pueden inducir la polarización de las células T hacia el tipo Th1 mientras que otros lo hacen hacia el tipo Th2 (Borchers, Keen et al. 2004). La administración del β -glucano, SSG, de *Sclerotinia sclerotiorum* a ratones previamente inmunizados con el antígeno trinitrofenilo ovoalbúmina (TNP-OVA) promovió especialmente el desarrollo de células Th1 mediante la inducción de IL-12 (Suzuki, Adachi et al. 2001). De la misma manera, la fracción D de *G. lucidum*, debe su actividad antitumoral a la activación de diferentes células inmunocompetentes y al equilibrio entre las células Th1 y Th2 (Inoue, Kodama et al. 2002). De hecho, en ratones BALB/c, en los que domina la respuesta Th2 como consecuencia de la introducción de células tumorales, la fracción D es capaz revertir la situación y aumentar la respuesta Th1 (Kodama, Harada et al. 2002) (Harada, Kodama et al. 2003).

Además de los polisacáridos, otros compuestos procedentes de hongos comestibles, también han demostrado efectos sobre los linfocitos T, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, varios glicoesfingolípidos de *H. marmoreus* y *P. eryngii* inducen la secreción, *in vitro*, de IFN-g e IL-4 por parte de células T (Nozaki, Itonori et al. 2008), mientras que la proteína inmunomoduladora de *F. velutipes*, FIP-fve, activa las células T vía P38 MAPK (Wang, Hsu et al. 2004). Por otro lado, un proteoglicano aislado de *Phellineus linteus*, inhibe *in vivo* el desarrollo de una masa tumoral esplénica en

ratones, mediante el incremento y la dominancia de la respuesta Th1, así como de la activación de las células dendríticas (Kim, Shin et al. 2004).

Efectos sobre las células B.- El proteoglicano (PL) de *Phellinus linteus* estimula selectivamente los las células B pero no las T, *in vitro* e *in vivo* (Kim, Park et al. 2003). Tres polisacáridos aislados del cuerpo fructífero de *G. lucidum*, aumentan la proliferación de linfocitos T y B, *in vitro* (Bao, Wang et al. 2002). Además, el proteoglicano GLIS aislado también del cuerpo fructífero de *G. lucidum* estimula la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B (Zhang, Tang et al. 2002).

Igualmente existen en los hongos compuestos que desencadenan el efecto contrario, la supresión de las funciones de las células B. Un β -D glucano aislado de esporas de *G. lucidum* posee un efecto supresor muy potente sobre la proliferación de linfocitos en ratones inducida por LPS y sobre la producción de anticuerpos y Conavalina A (Con A) (Bao, Fang et al. 2001). Otro β -glucano extraído del cuerpo fructífero de *G. frondosa*, denominado Fracción D, también inhibe la activación de las células B en ratones portadores del carcinoma MM-46 (Inoue, Kodama et al. 2002).

La administración de la proteína fúngica inmunomoduladora aislada de *F. velutipes*, FIP-fve, a ratones BALB/c inmunizados con OVA, indujo una disminución de la respuesta específica OVA Ig E (Hsieh, Hsu et al. 2003).

Efectos sobre la red de citoquinas.- Las citoquinas, son glicoproteínas solubles de crucial importancia para la inducción y regulación de las respuestas inmunes. Son producidas por una gran variedad de células inmunes tras estimulación. Cambios en los niveles de las citoquinas pueden desembocar en condiciones patológicas y causar alteraciones en la interacción entre la respuesta inmune innata y la adquirida (Jeurink, Noguera et al. 2008).

Ciertos componentes de los hongos comestibles poseen actividad inmunoestimuladora como consecuencia de su capacidad para actuar sobre la regulación de la red de citoquinas, como los complejos polisacárido-proteína, PSK, de

T. versicolor; PSPC, de *Tricholoma lobayense*; OL-2 de *Omphalia lapidescens* o el β -glucano de *L. edodes*, lentinan (Liu, Ooi et al. 1999).

El estudio de la actividad inmunomoduladora de varios extractos proteicos de diferentes hongos, demostró que ciertas proteínas de *V. volvacea* y *G. lucidum* inducían un determinado perfil de citoquinas, actuando directamente sobre los monocitos y las células T (Jeurink, Noguera et al. 2008).

1.3.5.10. Actividad antiinflamatoria

La inflamación se encuentra implicada en el desarrollo de varias enfermedades crónicas, tales como arteriosclerosis, obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas e incluso cáncer. Aunque los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) y los antiinflamatorios esteroideos se utilizan actualmente para tratar la inflamación aguda, estos fármacos no cuentan con un éxito completo para el caso de trastornos inflamatorios crónicos, y además frecuentemente suelen ocasionar efectos secundarios indeseables. Por consiguiente, existe un gran interés en encontrar nuevos, compuestos antiinflamatorios más seguros (García-Lafuente, Guillamón et al. 2009). Durante los últimos años se está haciendo un gran esfuerzo por encontrar productos naturales que puedan ser utilizados como agentes antiinflamatorios y, pese a que la actividad antiinflamatoria de los hongos no ha sido tan extensamente estudiada como otras de sus propiedades (actividad inmunomoduladora, por ejemplo), ya se han encontrado evidencias de que los hongos podrían suponer una excelente fuente potencial de compuestos antiinflamatorios (García-Lafuente, Moro et al. 2010).

En la actualidad ya hay trabajos que demuestran el potencial antiinflamatorio de algunas especies de hongos. El extracto metanólico de *A. camphorata*, reduce de modo significativo la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión génica de iNOS y COX-2 en macrófagos de ratón RAW 264.7, y en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), estimuladas con LPS. Además, este mismo extracto

resultó ser activo en un modelo *in vivo* de inflamación inducida por carragenina en ratones. Alivió los síntomas de los edemas que habían sido provocados y disminuyeron los niveles de NO y TNF- α en los edemas y en el suero de los ratones (Wen, Chang et al. 2011).

El extracto de micelio de *Lentinus polychrous* (LPME), compuesto por esteroides y compuestos fenólicos, también cuenta con actividad antiinflamatoria, demostrada en estudios *in vitro* e *in vivo*. LPME disminuyó significativamente la producción de NO y TNF- α en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS así como las expresiones génicas de iNOS y TNF- α . Igualmente, LPME redujo las expresiones de otros genes proinflamatorios como IL-1 β , IL-6 y COX-2 y disminuyó el edema producido en un modelo inflamatorio de rata, de manera dependiente de la dosis y del tiempo, en niveles similares a los de las drogas antiinflamatorias propionato de clobetasol y diclofenaco (Fangkrathok, Junlatat et al. 2013).

Un extracto de *P. florida*, compuesto por flavonoides y otros compuestos fenólicos, hidratos de carbono, aminoácidos y alcaloides, demostró resultados similares al disminuir significativamente edemas inducidos por carragenina (Ganeshpurkar and Rai 2013).

L. edodes y dos variedades de *A. bisporus* también ejercieron efectos antiinflamatorios al inducir la superproducción, *in vitro*, de IL-23 en la línea J.744.1 de monocitos de ratón e *in vivo*, en un modelo de colitis aguda inducida. Igualmente *Agaricus brasiliensis*, en bajas dosis atenuaba la inflamación pulmonar (Croccia, Lopes et al. 2013). A partir de este hongo, se aisló su metabolito secundario, agaricoglicérico, y se demostró que su administración en ratones alimentados con altos niveles de sacarosa, era capaz de restablecer la disfunción metabólica, disminuyendo las citoquinas inflamatorias mediante la vía NF- κ B (Yu, Han et al. 2013). Otros compuestos aislados de otras especies, como davallialactona de *Inonotus xaranticus*, también poseen efectos antiinflamatorios (Yang, Lee et al. 2013).

Aunque se ha demostrado la presencia de compuestos con actividad antiinflamatoria en algunos hongos, la mayoría de los trabajos se han limitado a unas pocas especies, en general, aquellas que tradicionalmente han sido más apreciadas por sus propiedades medicinales que por sus propiedades nutritivas, a excepción de *A. bisporus*. Sin embargo, el contenido en compuestos bioactivos presentes en los hongos comestibles abre un gran campo de trabajo en la búsqueda e identificación de nuevos agentes terapéuticos con posibles efectos antiinflamatorios.

I.V. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Desde hace un par de décadas, la preocupación de la población por la nutrición ha ido aumentando en paralelo a la divulgación de las evidencias científicas que relacionan dieta y salud. Un reciente estudio conjunto de la OMS y la FAO ha demostrado que diversos aspectos nutricionales, junto con otros relacionados con el estilo de vida son los principales factores de riesgo modificables en relación con el desarrollo de algunas enfermedades no transmisibles como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo 2, la obesidad, la osteoporosis, entre otras. Esta situación se ha traducido en un aumento de la búsqueda de alimentos que contengan compuestos funcionales con efectos en la prevención o en el tratamiento de enfermedades.

En este sentido, los hongos medicinales tienen una larga trayectoria a lo largo de la historia como remedio para una gran variedad de enfermedades. Por otro lado, los hongos comestibles han sido muy valorados por su composición nutricional puesto que constituyen una buena fuente de proteínas, vitaminas, minerales y fibra a la vez que presentan bajos contenidos calóricos y lipídicos. Más recientemente el interés se ha centrado en su composición funcional, considerando a los hongos como una fuente de compuestos bioactivos de diferente naturaleza, que les confieren demostrados efectos beneficiosos para la salud: antibacterianos, antivirales, inmunomoduladores, inmunodepresivos, antialérgicos, hipocolesterolémicos, hipoglicémicos y antiinflamatorios. Algunos de estos efectos han sido profundamente estudiados, sin embargo, la capacidad antiinflamatoria de los hongos comestibles, por el momento, no lo ha sido tanto.

Por otro lado, se está demostrando cada vez más que los procesos inflamatorios crónicos, para los que aún no existen tratamientos efectivos, están involucrados en el desarrollo de varias enfermedades que afectan a gran parte de la población como enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, enfermedades

neurodegenerativas e incluso cáncer, por lo que una búsqueda de compuestos antiinflamatorios de origen natural, está cobrando gran interés. Una de estas patologías crónicas, con incidencia creciente en los países desarrollados, es la enfermedad inflamatoria intestinal.

Entre los compuestos bioactivos naturales que se están estudiando, destacan los compuestos fenólicos con una gran variedad de efectos demostrados. En el presente trabajo se propone estudiar la composición fenólica de varias especies de hongos comestibles comúnmente consumidos en nuestro país, así como el potencial efecto antiinflamatorio de los mismos. Para ello se obtendrán extractos metanólicos ricos en compuesto fenólicos cuya capacidad antiinflamatoria se ensayará en una línea celular de macrófagos y en un modelo *in vitro* de inflamación intestinal.

Este trabajo plantea demostrar la presencia de compuestos fenólicos en los hongos comestibles con capacidad antiinflamatoria y pretende ser el punto de partida para el estudio de los hongos comestibles como fuente de agentes antiinflamatorios que puedan ser incluidos como parte de nuestra dieta, o se puedan utilizar para el desarrollo de suplementos alimenticios, con el fin de contribuir a mejorar e incluso prevenir los procesos inflamatorios, en general y la inflamación intestinal, en particular.

II. OBJETIVOS

El presente trabajo cuenta como objetivos generales:

- Obtener y caracterizar extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos a partir de varias especies de hongos comestibles.
- Evaluar *in vitro* la capacidad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de extractos metanólicos de hongos comestibles ricos en compuestos fenólicos.
- Estudiar el potencial efecto antiinflamatorio de los extractos en la inflamación intestinal.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Obtener extractos metanólicos, ricos en compuestos fenólicos, a partir de distintos hongos comestibles.
- Valorar el contenido total de compuestos fenólicos en dichos extractos.
- Analizar el perfil de compuestos fenólicos presentes en los extractos.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos:
 - Valorar la capacidad de absorción de radicales de oxígeno de los extractos metanólicos de hongos comestibles ricos en compuestos fenólicos.
- Estudiar la relación existente entre capacidad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos de los extractos.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos en una línea celular de macrófagos RAW 264.7:
 - Valorar el efecto de los extractos sobre la producción de mediadores inflamatorios: NO y citoquinas en células RAW 264.7 activadas con LPS.

- Valorar el efecto de los extractos sobre la expresión de distintos genes implicados en los procesos inflamatorios en células RAW 264.7.
- Evaluar el posible efecto antiinflamatorio en una línea de células epiteliales intestinales Caco-2:
 - Valorar el efecto de los extractos sobre la liberación del mediador inflamatorio NO en células Caco-2 estimuladas.
 - Valorar el efecto de los extractos en la expresión de distintos genes inflamatorios en células Caco-2 estimuladas.
- Estudiar la relación existente entre actividad antiinflamatoria de los extractos y el contenido fenólico de los mismos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. HONGOS COMESTIBLES

Se utilizaron los cuerpos fructíferos de diferentes especies de hongos:

- *Agaricus bisporus*
- *Lactarius deliciosus*
- *Cantharellus cibarius*
- *Pleurotus ostreatus*
- *Boletus edulis*
- *Calocybe gambosa*
- *Hygrophorus marzuolus*
- *Craterellus cornucopioides*

De ellas, 5 especies se obtuvieron de distribuidores comerciales de la zona: *A. bisporus*, *P. ostreatus*, *B. edulis*, *C. cibarius* y *C. cornucopioides*; el resto, *L. deliciosus*, *C. gambosa* e *H. marzuolus* se recolectaron en áreas locales.



Figura 11. *A. bisporus*



Figura 12. *L. deliciosus*



Figura 13. *C. cibarius*



Figura 14. *P. ostreatus*



Figura 15. *B. edulis*



Figura 16. *C. gambosa*



Figura 17. *H. marzuolus*



Figura 18. *C. cornucopioides*

III.1.1. Tratamiento de las muestras

Tras la recepción de las muestras se procedió a su registro y etiquetado. A continuación los hongos se limpiaron, trocearon, congelaron a -20°C y se sometieron a un proceso de desecado mediante liofilización en un liofilizador marca Telstar, modelo Cryodos.

La liofilización es un método de desecación basado en la eliminación del agua congelada del producto por sublimación del hielo en condiciones de vacío. Las muestras congeladas se someten a una atmósfera de muy baja presión y el agua, en estado sólido, pasa directamente a estado gaseoso sin pasar por estado líquido (sublimación). Se trata de una técnica más lenta y costosa que otros métodos tradicionales de secado, sin embargo, al evitar el calor, se consigue una preservación de la estructura molecular del producto liofilizado que se traduce en el mantenimiento de sus propiedades (Baxter 1999).

Una vez liofilizado el material se redujo a polvo en un molinillo (marca Ika, modelo M20), se envasó al vacío y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

III.2. OBTENCIÓN Y VALORACIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE HONGOS COMESTIBLES

III.2.1. Materiales y reactivos

Para la obtención de los extractos metanólicos de hongos comestibles se emplearon los siguientes materiales:

- Balanza de precisión, marca DENVER INSTRUMENT, modelo SI-64
- Centrífuga, marca Hettich, modelo MIKRO 320R
- Concentrador de muestras, marca Stuart, modelo SBH 130D/3
- Cartuchos de extracción, marca WATERS, modelo OASIS
- Placa calefactora con agitación, marca JP Selecta, modelo AGIMATIC-E
- Vortex, marca Scientific Industries Inc., modelo G560E
- Espectrofotómetro, marca Jenway, modelo 6305
- Mili-Q, marca Milipore, modelo Advantage

Y los siguientes reactivos:

- Metanol (VWR)
- Agua Milli-Q (agua obtenida del aparato Milli-Q Advantage A10)
- Ácido acético (Chromanorm, VWR)
- Ácido gálico (Merck)
- Folin Ciocalteu (Merck)
- Carbonato de sodio (VWR)

III.2.2. Obtención de extractos

III.2.2.1. Extracción

Para la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos se realizaron sucesivas extracciones metanólicas a partir del polvo de hongos. Se utilizó como disolvente MeOH, debido a que es una molécula polar que extrae muy bien los compuestos deseados y a que es una molécula pequeña, con un punto de ebullición de 65 °C y por tanto fácil de eliminar.

Procedimiento: A partir de 0,10 g de polvo de hongo se añadía un volumen de 2 mL de MeOH, y se mantenía en agitación a 65 °C al baño maría durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugaba a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 10 °C y se recogían los sobrenadantes. Estos se mantenían en refrigeración a 4 °C. Los residuos sólidos se sometían a una reextracción, para lo cual se añadían 3mL de MeOH, calentando al baño maría a 65 °C con agitación durante 6 horas. Finalmente, los sobrenadantes de dicha reextracción se juntaban con los de la primera extracción, y se concentraban en un concentrador mediante flujo de nitrógeno sobre la superficie, hasta un volumen final de 0,5mL, obteniéndose así extractos metanólicos de las distintas especies de hongos con una concentración de 200 mg de hongo/mL.

III.2.2.2. Purificación

La purificación de los extractos metanólicos obtenidos se llevó a cabo mediante Extracción en Fase Sólida (SPE). Esta técnica se basa en el paso de la muestra por una columna SPE que contiene un lecho absorbente de partículas gruesas, sostenido entre dos discos porosos. La fase sólida posibilita la preconcentración de la muestra minimizando el riesgo de su pérdida o contaminación. El compuesto de interés aparece retenido y los contaminantes e impurezas de la matriz se eluyen.

La extracción en fase sólida consta de 5 etapas:

1. Activación.- Consiste en la utilización de un solvente orgánico para humidificar la fase.
2. Acondicionamiento.- La fase estacionaria se acondiciona con el mismo solvente que la matriz.
3. Retención.- Los compuestos de interés se retienen en el absorbente, entretanto, los contaminantes, impurezas y la matriz se eluyen y desechan.
4. Eliminación de interferencias.- Mediante el empleo de un solvente o varios de fuerza creciente, se eliminan los contaminantes del absorbente hasta que finalmente sólo quedan retenidos los analitos deseados.
5. Elución.- Empleando eluyente adecuado, se consigue que los analitos eluyan, finalizando así la extracción de los mismos.

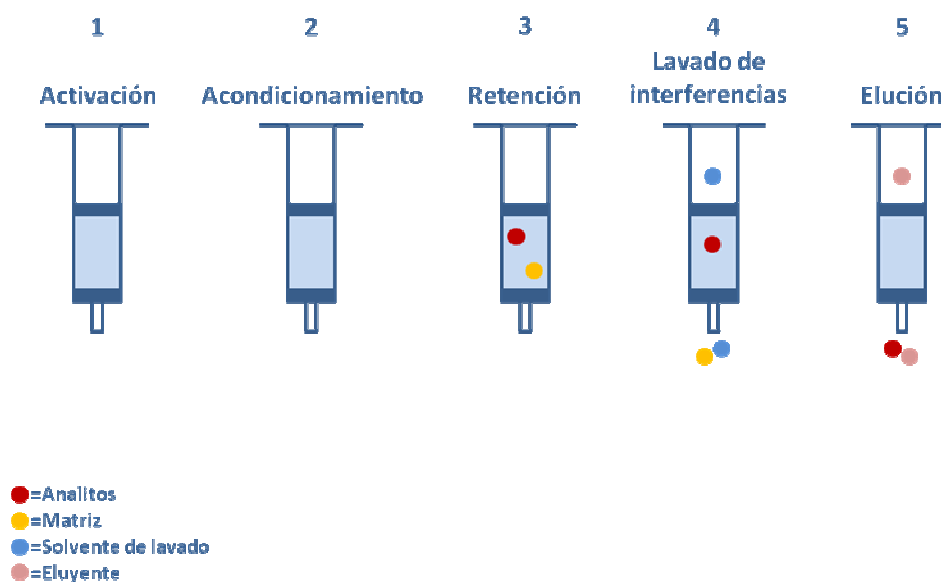


Figura 19. Esquema de las 5 etapas de la extracción en fase sólida

Los extractos obtenidos se purificaron mediante el empleo de cartuchos de extracción OASIS® MAX de Waters, que están especialmente diseñados para la extracción de compuestos cuyo pKa sea 2-8. Se trata de una SPE mixta que utiliza dos modos de retención (de fase inversa y de intercambio de iones) para aislar selectivamente compuestos ácidos y las interferencias, lo cual proporcionan una mayor sensibilidad (OASIS® simple extraction Products) (Waters 2014).

Procedimiento:

- Se acondicionan los cartuchos mediante el paso por gravedad de 6 mL de MeOH (0,1% ac. acético).
- Se equilibran los cartuchos mediante el paso de 6 mL de H₂O (0,1% ac. acético).
- Se diluyen las muestras en H₂O para reducir la concentración del MeOH al 5% (0,5 mL de extracto más 9,5 mL de H₂O) y se colocan en los cartuchos dejándolas pasar por gravedad.
- Se lavan los cartuchos con 6 mL de agua con 5% de MeOH (0,1% ac. acético).
- Se eluyen las muestras añadiendo 2 mL de MeOH (0,1% ac. acético), en dos series de 1 mL cada una, y se recogen los extractos.
- 50 µl se utilizan para la valoración de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, y el resto se conservan a -20 °C.

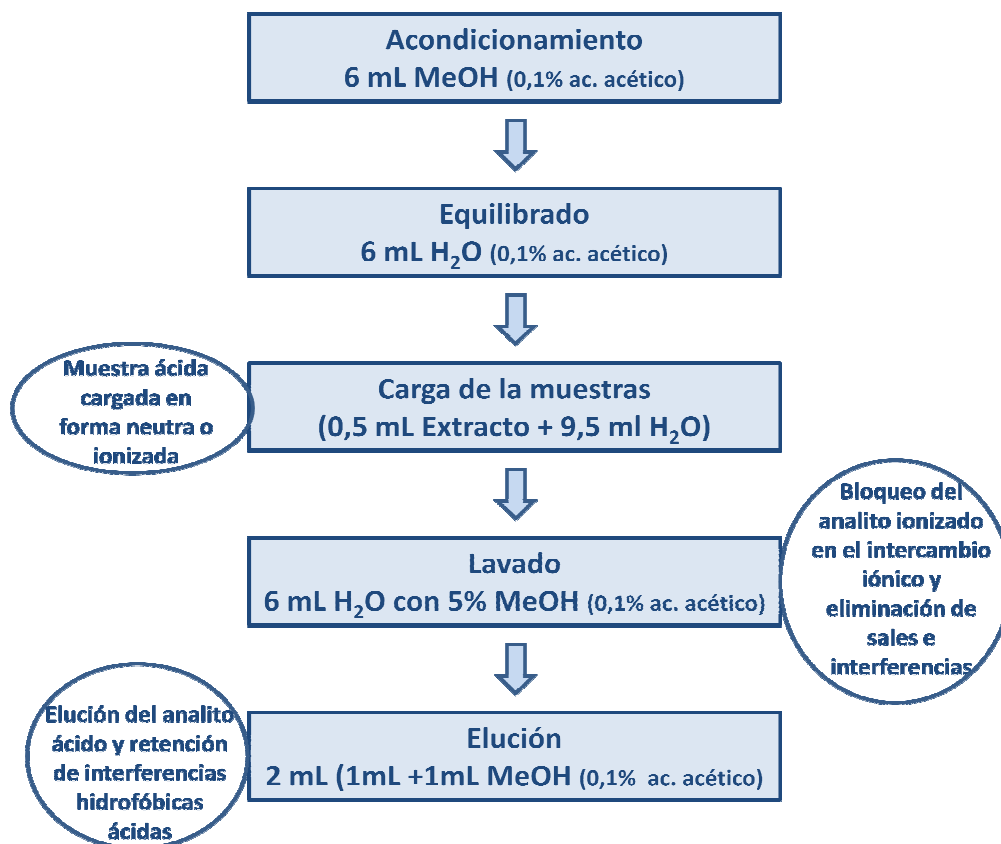


Figura 20. Esquema del proceso de obtención de extractos por el método optimizado oasis max

III.2.3. Valoración del contenido en compuestos fenólicos totales

Para la valoración del contenido de compuestos fenólicos de los extractos se empleó el método Folin-Ciocalteu.

Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiitto 1985).

Técnica

Se prepararon las muestras y el blanco, del siguiente modo:

- Muestras: 50 µl muestra + 450 µl de MeOH; Blanco: 500 µl MeOH.
- Se añadían 100 µl del reactivo Folin Ciocalteu y esperaban 3 minutos.
- Se añadía 1,5 mL de carbonato de sodio al 20% y posteriormente 3mL de H₂O. Se agitaba y se mantenía 2 horas en oscuridad agitando cada 30 minutos.
- Se centrifugaba a 4000 r.p.m durante 10 minutos a 10 °C.
- Lectura a 725 nm en un espectrofotómetro Jenway 6305.

El contenido en compuestos fenólicos se midió en mg de equivalentes de ac. gálico/g hongo seco (mg GAE/g), a partir de una recta de calibración que se construyó con ácido gálico. Partiendo de una solución inicial de ácido gálico de concentración 1,162mg/mL, se realizaron diluciones en MeOH, de manera que las concentraciones de los estándares utilizados fueron 0,1mg/mL, 0,05mg/mL, 0,025mg/mL, 0,0125mg/mL, 0,0625mg/mL. Las determinaciones se realizaron 6 veces.

III.2.4. Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

El análisis de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hongos comestibles se llevó a cabo en el laboratorio de química analítica del Centro para la Calidad de los Alimentos por la Dra. Villares.

III.2.4.1. Reactivos y equipos

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) Alliance 2695 (Waters) que contiene un módulo de separación (Waters 2695), con calentador de columna e inyector automático y un detector fotodiodo array (Waters 2998)

acoplado en línea con un detector de fluorescencia multi longitud de onda (Waters 2475).

Además se utilizaron los siguientes reactivos:

- Columna C₁₈ de fase reversa de 75 mm y 4,6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula 3,5 µm , (Symmetry, de Waters)
- Agua MilliQ (agua obtenida del aparato Milli-Q Advantage A10)
- Ácido acético (Chromanorm, VWR)
- Acetonitrilo (VWR)
- Estándares:
 - Catequina (Sigma Chemical Co)
 - Ácido cinámico (Sigma Chemical Co)
 - Ácido gálico (Merck)
 - Ácido homogentísico (Aldrich)
 - Ácido p-hidroxibenzoico (Aldrich)
 - Ácido protocatéuico (Sigma Chemical Co)
 - Pirogalol (Sigma)
 - Ácido caféico (Sigma Aldrich)
 - Ácido clorogénico (Aldrich)
 - Ácido p-cumárico (Sigma)
 - Ácido ferúlico (Fluka)
 - Ácido gentísico (Sigma Chemical Co)

- Miricetina (Extrasynthèse)
- Naringina (Sigma Chemical Co)

Para la separación de los distintos compuestos fenólicos se utilizó el método previamente descrito por Kim et al. (Kim, Seguin et al. 2008). Se empleó una columna de fase reversa C₁₈ termostaticada a 25 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µL. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y la fase móvil empleada consistía en 0,1% de ácido acético en agua como solvente A y acetonitrilo como solvente B. Se utilizó un gradiente que comenzaba con 100% de solvente A, para obtener 5% de solvente B en 2 minutos, 40% de B en 20 minutos y 80% de B en 22 minutos. Los compuestos fenólicos fueron identificados en base a sus tiempos de retención, comparándolos con los de los estándares correspondientes. Para la cuantificación se elaboraron curvas de calibración con los diferentes estándares ($r^2 > 0,99$) recogiendo la absorbancia a 280 nm para catequina, ácido cinámico, ácido gálico, ácido homogentísico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatéuico y pirogalol; y a 320 nm para ácido caféico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido gentísico, miricetina y naringina.

III.2.5. Capacidad antioxidante de los extractos

La valoración del poder antioxidante se basa en la valoración de la reducción del daño oxidativo producido por un agente oxidante a un sustrato oxidable, como consecuencia de la presencia de un antioxidante. Dicha inhibición es directamente proporcional a la actividad antioxidante del compuesto que se valora.

La actividad antioxidante *in vitro* se puede determinar por distintos métodos (Cao and Prior 2001):

- Potencial antioxidante total (TRAP)
- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo hidrato (DPPH)
- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)

- Reducción del hierro - Poder antioxidante (FRAP)
- Capacidad de absorción del radical de oxígeno (ORAC)

El método que se utilizó para la valoración del poder antioxidante de los extractos metanólicos de setas comestibles, fue el método ORAC.

Este método que proviene del originalmente descrito por Glazer (Glazer 1990), se basa en la medición del descenso de la fluorescencia que la proteína ficoeritrina- β (β -PE) emite debido a la interacción con radicales libres presentes en el medio, que dañan su estructura.

En presencia de sustancias antioxidantes, ese descenso de fluorescencia queda reducido, debido a que dichos antioxidantes captan los radicales, protegiendo así a la proteína β -PE.

El método ORAC fue recientemente mejorado gracias a la sustitución de la proteína β -PE por fluoresceína (Ou, Hampsch-Woodill et al. 2001), de manera que ciertos inconvenientes como la pobre fotoestabilidad de β -PE y las interacciones de ésta con ciertos compuestos como los compuestos fenólicos, fueron solucionadas (Frankel and Meyer 2000). En este trabajo se siguió el protocolo descrito por Dávalos (Davalos, Gomez-Cordoves et al. 2004).

Técnica:

Se realizó una recta de calibrado usando como antioxidante estándar Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E. Para ello se utilizaron diluciones de una solución de Trolox en PBS, para obtener las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 μ M.

Se realizaron distintas diluciones de las muestras en PBS 75 mM (pH 7,4) para que las mediciones de las mismas se encuentren en el mismo rango que las del agente utilizado como referencia (Trolox).

Tabla 7. Tabla de diluciones de las muestras empleadas para la determinación de poder antioxidante mediante el método ORAC

Hongo	Diluciones
<i>A. bisporus</i>	1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400
<i>L. deliciosus</i>	1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 1/150, 1/200
<i>C. cibarius</i>	1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400
<i>P. ostreatus</i>	1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 1/150, 1/200
<i>B. edulis</i>	1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400
<i>C. gambosa</i>	1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400
<i>H. marzuolus</i>	1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 1/150, 1/200
<i>C. cornucopioides</i>	1/50, 1/75, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400

- En una placa negra de 96 pocillos se añadían 20 μ L/pocillo de los estándares, las muestras y blancos (PBS).
- Se añadía a cada pocillo 120 μ L de solución de fluoresceína (70 nM) en PBS.
- Incubación de 10 min a 40 °C.
- Se añadían 60 μ L de una solución de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) en PBS a una concentración final de 12 mM.
- Se leía la fluorescencia emitida por la fluoresceína cada minuto durante 80 minutos, previa agitación, en un lector de placas FLUOstar Omega de BMG LABTECH.

Todas las reacciones se realizaron por duplicado y en tres ensayos distintos para cada muestra.

Los datos sin procesar fueron exportados desde el software Fluostar Galaxy a una hoja de Excel (Microsoft, Roselle, IL) para los cálculos posteriores. En primer lugar, las curvas de las muestras (fluorescencia frente a tiempo) fueron primero normalizadas con las correspondientes curvas del blanco, multiplicando los datos originales por el factor de fluorescencia_{blanco,t=0}/fluorescencia_{muestra,t=0}. A partir de las curvas normalizadas, se calculó el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia (AUC) mediante la siguiente fórmula:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i/f_0$$

Dónde f_0 es la lectura de fluorescencia inicial a 0 minutos y f_i es la lectura de fluorescencia en el tiempo i .

Después el AUC neta correspondiente para cada muestra, se calculó restando las AUC correspondientes al blanco. Posteriormente se calcularon para todas las muestras, las ecuaciones de regresión entre el AUC y la concentración neta antioxidante, mediante el empleo de la curva estándar. De manera que X es la capacidad antioxidante e Y el valor AUC neta de cada muestra.

Por último los resultados finales se expresaron en μmol equivalentes de Trolox/g de hongo ($\mu\text{mol TE/g}$).

III.3. MODELO EXPERIMENTAL: LÍNEAS CELULARES

III.3.1. Equipos de cultivo celular

Para los trabajos realizados con cultivos celulares se utilizaron una serie de equipos específicos:

- Cabina de flujo laminar vertical, marca TELSTAR, modelo TELSTAR BV-100 1,5M. Es una cabina de seguridad biológica tipo II de flujo laminar vertical y provista con filtro HEPA < 0,3 μm . 15 Minutos antes de comenzar a operar en ella, se limpiaba mediante la pulverización de etanol al 70% sobre su superficie y todos los materiales eran puestos en su interior. Posteriormente, una vez terminada su utilización, se procedía a su limpieza mediante la pulverización de etanol al 70% sobre su superficie. Finalmente se proyectaba sobre ella luz ultravioleta de 254 nm hasta el siguiente momento de su utilización.



Figura 21. Cabina de flujo laminar TELSTAR BV-100 1,5M, utilizada para los trabajos realizados con cultivos celulares

- Incubadores de CO₂, temperatura y humedad, que proporcionan a las células las condiciones óptimas para su cultivo. Los cultivos celulares se realizaron en dos incubadores: la línea celular RAW 264.7 se cultivó en un incubador HEAL FORCE, modelo HF160W, y la línea celular Caco-2 en otro SL Shel lab, modelo CO₂.
- Microscopio óptico con contraste de fases que permite observar células sin colorear. Aprovechan las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una célula o tejido, de modo que las partes oscuras corresponden a las porciones densas; y las claras a las menos densas. Se utilizaron dos tipos de microscopios ópticos distintos:

. Microscopio binocular gama G, (EUROMEX, modelo GE 3030) para los contajes celulares en cámara de Neubauer.

Se trata de un microscopio vertical, con el que, tras tinción por azul tripán (1:1), se llevaron a cabo los contajes celulares en la cámara de Neubauer.

. Microscopio invertido (VWR, modelo IT 400) con cámara DV-2B, para la observación y fotografía de cultivos celulares en flasks, placas de cultivo, etc.

El microscopio invertido, presenta la particularidad de que posee la mayoría de sus componentes al revés, tan sólo el tubo binocular está en la posición habitual.



Figura 22. Microscopio invertido IT 400 de VWR con cámara DV-2B

Este tipo de microscopios permite la observación de células en cultivo sin necesidad de realizar una preparación previa de las muestras. La observación de las muestras se produce a través de los recipientes dónde las células están siendo cultivadas, tanto de plástico como de vidrio (flasks y placas de cultivo, placas de Petri, etc.).

- Cámara de Neubauer o hemocitómetro. Se utiliza para realizar los recuentos celulares. Se trata de un portaobjetos especial, que cuenta con dos depresiones de $0,1 \text{ mm}^3$ o 10^{-4} mL en las que presenta una cuadrícula con cuatro cuadrantes. Una vez hecho el recuento, se calcula la media de las células de los cuatro cuadrantes y se multiplica por 10^4 (ya que la capacidad de las depresiones es de 10^{-4} mL) y por el factor de dilución empleado para obtener nº de células/mL.

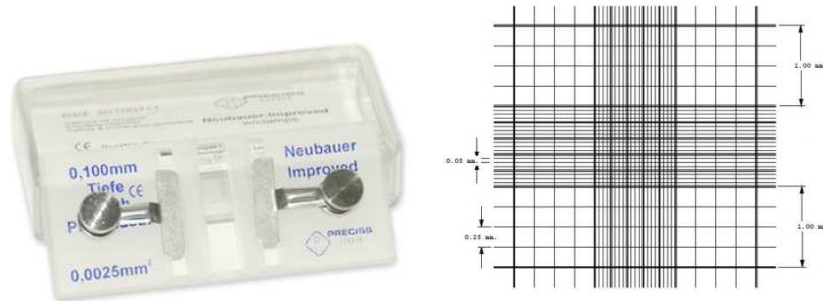


Figura 23. Cámara de Neubauer (izquierda) y vista ampliada de una de las dos depresiones que contiene la cuadrícula con los cuatro cuadrantes dónde se realiza el conteo celular (derecha)

III.3.2. Materiales y reactivos

Además de equipos específicos se utilizaron distintos materiales también específicos para cultivos celulares:

- Flasks o frascos de cultivos celulares. Se utilizaron para el mantenimiento de los cultivos celulares durante los sucesivos subcultivos. Para la línea celular RAW 264.7 se utilizaron flasks de 75 cm² mientras que para el caso de Caco-2, de 175 cm².
- Para los diferentes ensayos se utilizaron distintos tipos de placas de cultivo:
 - o Placas de 96 pocillos (marca Falcon) para los ensayos de citotoxicidad, producción de NO y citoquinas.
 - o Placas de 48 pocillos (marca Costar) para las valoraciones de NO en sobrenadantes de la línea celular Caco-2.
 - o Placas de 6 pocillos (marca Costar) para los estudios de expresión génica en ambas líneas celulares.
- Tanque de nitrógeno líquido, marca Arpege, modelo Arpege 110, para la conservación de los stocks celulares a -196 °C de temperatura.

Para la realización de los cultivos celulares se emplearon los siguientes reactivos:

- Medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM), de SIGMA
- Suero fetal bovino (FBS), de SIGMA
- Penicilina y estreptomicina, de SIGMA
- Tripsina-EDTA, de SIGMA
- L-glutamina, de SIGMA
- Aminoácidos no esenciales, de SIGMA
- DMSO, de VWR
- Solución de Colágeno tipo 1 de piel de becerro, de SIGMA

III.3.3. Línea celular RAW 264.7

Para este trabajo se utilizó la línea celular RAW 264.7 que se obtuvo de la ECACC (Colección europea de cultivos celulares).

Se trata de una línea celular de ratón que expresa propiedades de macrófagos. Fue clonada por Raschke et al., a partir de ascitis de un tumor, inducido por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abelson (A-MuLV), en un ratón macho BAB/14 (Raschke, Baird et al. 1978).

Los macrófagos componen una de las primeras líneas de defensa y representan uno de los tipos celulares más importantes en la inflamación. Por ello, constituyen un excepcional sistema para investigaciones *in vitro* sobre la respuesta inflamatoria, así como para la evaluación del potencial antiinflamatorio tanto de fármacos como de productos naturales.

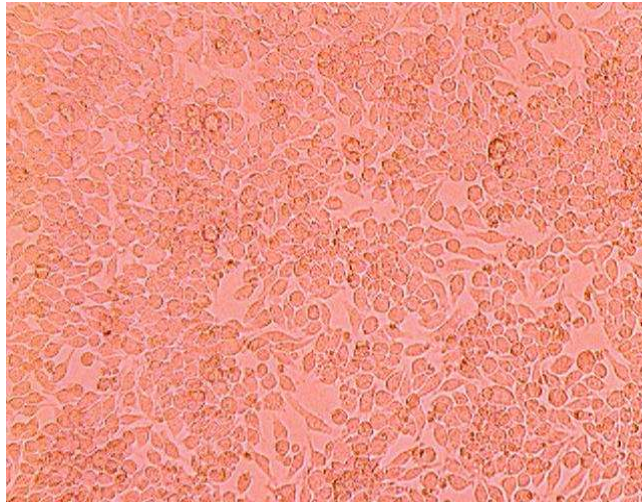


Figura 24. Fotografía de la línea celular RAW 264.7

Cultivo de RAW 264.7

La línea celular RAW 264.7 se cultivó en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado con 10% de FBS inactivado, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina. El cultivo celular se mantuvo en un incubador de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$, con un 5% de CO_2 y una humedad relativa del 95%, mediante sucesivos subcultivos.

Al mismo tiempo que se realizaba el mantenimiento del cultivo celular, se preparó un stock de células en distintos pases, que se mantienen congeladas en nitrógeno líquido.

Medio de cultivo

El medio de cultivo además de aportar a las células los nutrientes principales (hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos y proteínas, ácidos grasos y lípidos, sales inorgánicas, vitaminas, minerales), suministra una serie de condiciones físico-químicas (pH, viscosidad, temperatura, osmolaridad) imprescindibles para el crecimiento celular.

En el presente trabajo se utilizó el medio de cultivo DMEM, cuya composición se muestra en la tabla.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo DMEM

COMPONENTES	Peso Molecular	Concentración (mg/L)	Molaridad (mM)
Aminoácidos			
Glicina	75	30	0,400
Hidrocloruro de L-Arginina	211	84	0,398
L-Cistina 2HCl	313	63	0,201
L-Glutamina	146	584	4,00
Hidrocloruro de L-Histidina-H₂O	210	42	0,200
L-Isoleucina	131	105	0,802
L-Leucina	131	105	0,802
Hidrocloruro de L-Lisina	183	146	0,798
L-Metionina	149	30	0,201
L-Fenilalanina	165	66	0,400
L-Serina	105	42	0,400
L-Treonina	119	95	0,798

Tabla 8 continuación

L-Triptófano	204	16	0,0784
L-Tirosina dihidrato de sal disódica	261	104	0,398
L-Valina	117	94	0,803
Vitaminas			
Cloruro de Colina	140	4	0,0286
Pantotenato D-Cálcico	477	4	0,00839
Ácido Fólico	441	4	0,00907
i-Inositol	180	7,2	0,0400
Niacinamida	122	4	0,0328
Hidrocloruro de Piridoxina	206	4	0,0194
Riboflavina	376	0,4	0,00106
Hidrocloruro de Tiamina	337	4	0,0119
Sales inorgánicas			
Cloruro Cálcico (CaCl₂) (Anhid)	111	200	1,80
Nitrato Férrico (Fe(NO₃)₃·9H₂O)	404	0,1	0,000248
Sulfato de Magnesio (MgSO₄) (Anhid)	120	97,67	0,814

Tabla 8 continuación

Cloruro Potásico (KCl)	75	400	5,33
Bicarbonato Sódico (NaHCO₃)	84	3700	44,05
Cloruro Sódico (NaCl)	58	4750	81,90
Fosfato Sódico Monobásico (NaH₂PO₄-H₂O)	138	125	0,906
Otros Compuestos			
D-Glucosa (Dextrosa)	180	4500	25,00
HEPES	238	5958	25,03

Suero fetal bovino

Para que las células en cultivo se multipliquen en medios sintéticos necesitan que dicho medio sea suplementado con suero o factores de crecimiento. El suero aporta al medio hormonas y factores estimulantes del crecimiento, factores de adherencia y extensión, proteínas transportadoras, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerales y elementos traza (Ca, Fe, Cu, Se...). Además, inactiva enzimas proteolíticas, tampona el medio de cultivo y aumenta la viscosidad del mismo originando un efecto protector frente al pipeteo, congelación, agitación, raspadores, etc.

En este trabajo se empleó FBS, que es uno de los más utilizados por sus características: pobre en anticuerpos, pobre en lípidos, rico en factores de crecimiento, tiene bajo riesgo de contaminación y se puede usar para todos los tipos celulares.

Composición del suero fetal bovino

- . Hormonas y otros factores de crecimiento (nepidermina, insulina, hormonas tiroideas...)
- . Factores de adherencia y extensión (fibronectina y vitronectina)
- . Componentes de la matriz extracelular (laminina, glicosaminoglicanos, colágeno...)
- . Proteínas transportadoras (transferrinas, albúmina...)
- . Lípidos (ac. linoléico, fosfolípidos, colesterol...)
- . Vitaminas
- . Minerales (Cu, Fe, Se, Zn...)
- . Nutrientes y metabolitos
- . Otras sustancias (sustancias detoxificadoras, inhibidores de proteasas...)

Inactivación del complemento

El FBS se mantenía congelado y se sometía a un proceso de descomplementación antes de su uso. Para ello se descongelaba el suero a 4 °C y se incubaba en un baño a 56 °C durante 30 minutos, agitando regularmente, después se enfriaba rápidamente en hielo y se alicuoteaba.

Al calentar a 56 °C, se consigue que el factor C3 del complemento se destruya, lo cual disminuye la toxicidad, puesto que evita las uniones antígeno-anticuerpo, perjudiciales para las células. Además se reduce el riesgo de contaminaciones y se destruyen proteasas y otros enzimas (como LDH, por ejemplo).

Elaboración de un stock de células congeladas

Con los sucesivos pases las células van perdiendo sus características de manera que van perdiendo su capacidad de respuesta frente a estímulos. Por ello, no se pueden utilizar células que hayan sufrido un elevado número de pases, por lo que es imprescindible disponer de un *stock* de reserva de células congeladas en el mismo pase.

Se elaboró un stock de células RAW 264.7 entre los pases 16 y 18, que se conservaron a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por inmersión en tanque de nitrógeno líquido.

Durante la congelación, las células pueden sufrir daños celulares debidos a variaciones de la presión osmótica, formación de cristales, cambios de pH, desnaturalización de las proteínas, deshidratación, etc. Para evitarlo, se realizó una congelación lenta (descenso de temperatura inferior a $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y además se añadió DMSO como agente protector y FBS con el fin de aumentar la viscosidad del medio de cultivo, aumentando así la protección de las células frente a la congelación.

Las células de cultivos que se encontraban en fase exponencial de crecimiento, se despegaban y se resuspendían en medio de cultivo conteniendo 10% DMSO y 25% de FBS a una concentración entre $0,7 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$ células/mL y se congelaban en criotubos (VWR).

Para llevar a cabo la congelación lenta, los criotubos se introducían en un recipiente que contenía alcohol isopropílico (Mister Frosty, marca Nalgene) y se mantenían a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Después, los criotubos se introducían en el tanque de nitrógeno líquido para una óptima conservación a largo plazo.

Descongelación de las células

La descongelación de las células, se realizaba rápidamente para preservar su integridad. El criotubo se introducía en un baño previamente calentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se mantenía en agitación durante unos 2 minutos. Posteriormente y para evitar el daño

celular que el agente protector DMSO puede ocasionar, eran diluidas con medio de cultivo fresco. Finalmente se reservaban 50 μL para valoración del rendimiento y el resto se sembraban en un *flask* de cultivo de 5 cm^2 .

Subcultivos

La línea celular se mantenía mediante subcultivos que se realizaban una vez a la semana cuando las células habían alcanzado el 80-90% de confluencia en cada pase. Para ello se despegaban por métodos mecánicos con ayuda de un raspador, se recogían mediante centrifugación a 1160 r.p.m. durante 5 minutos, para después resuspenderse en medio de cultivo fresco y realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer. Para ello, se tomaba un volumen de 20 μL de la suspensión celular y se mezclaba con 20 μL de una solución de azul tripán. Éste, es un colorante muy utilizado en conteos celulares en los que se pretende diferenciar células vivas de muertas. Penetra en las membranas de las células muertas tiñéndolas, mientras que por el contrario no es capaz de teñir a las células vivas, puesto que las membranas de éstas excluyen el colorante. Tras el conteo, en cámara de Neubauer, se resuspendían en medio de cultivo fresco y se diluían a la concentración adecuada para su siembra en frascos de cultivo de 75 cm^2 ($0,6 \times 10^6$ células).

Para los experimentos se utilizaron las células procedentes de no más de 10 pases consecutivos.

Tratamientos

En primer lugar se valoraba la citotoxicidad de los extractos a distintas dosis con el fin de determinar la dosis de trabajo.

Una vez establecida la dosis de trabajo, se valoró la capacidad antiinflamatoria de los extractos sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. El LPS es un componente de la membrana celular de bacterias Gram negativas, que activa a los macrófagos, haciendo que se inicien varias cascadas de señalización que conducen a la

secreción de citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión etc. como NO, TNF- α , IL-6, etc. (Xagorari, Roussos et al. 2002). Para estudiar la capacidad antiinflamatoria de los extractos se valoró la liberación de NO y citoquinas en el sobrenadante del cultivo y la expresión génica de distintos genes inflamatorios.

Para los estudios de citotoxicidad se sembraron, en placas de 96 pocillos, 5×10^3 células/pocillo, mientras que para las valoraciones de NO y de citoquinas en sobrenadante se emplearon 2×10^5 células/pocillo, también en placas de 96 pocillos. Las células se dejaban adherir al pocillo durante una noche y después se trataban con los extractos de hongos durante 1 hora, posteriormente se estimulaban con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS y tras 24 horas de estimulación se recogían los sobrenadantes para la valoración de NO y citoquinas. El NO se determinó inmediatamente tras la recogida de los sobrenadantes en 50 μL y el resto se mantenía a -20°C hasta su utilización para las valoraciones de ILs y TNF- α .

Para los ensayos de expresión génica se sembraban 10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos, se cultivaban durante una noche, se administraban los extractos y tras una hora se llevaba a cabo la estimulación con LPS. Transcurridas 6 horas desde la estimulación se procedía a la lisis de las células para la extracción de ARN.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y al menos en 3 experimentos diferentes. En todas las placas destinadas para ensayos de citotoxicidad y valoración de mediadores inflamatorios en sobrenadante se incluían 3 pocillos que no recibían ningún tratamiento y que se consideraban basales y otros 3 que sólo recibían tratamiento con LPS. En el caso de las placas para ensayos de expresión génica, se incluía un pocillo sin tratamiento (basal) y otro al que exclusivamente se le añadía LPS.

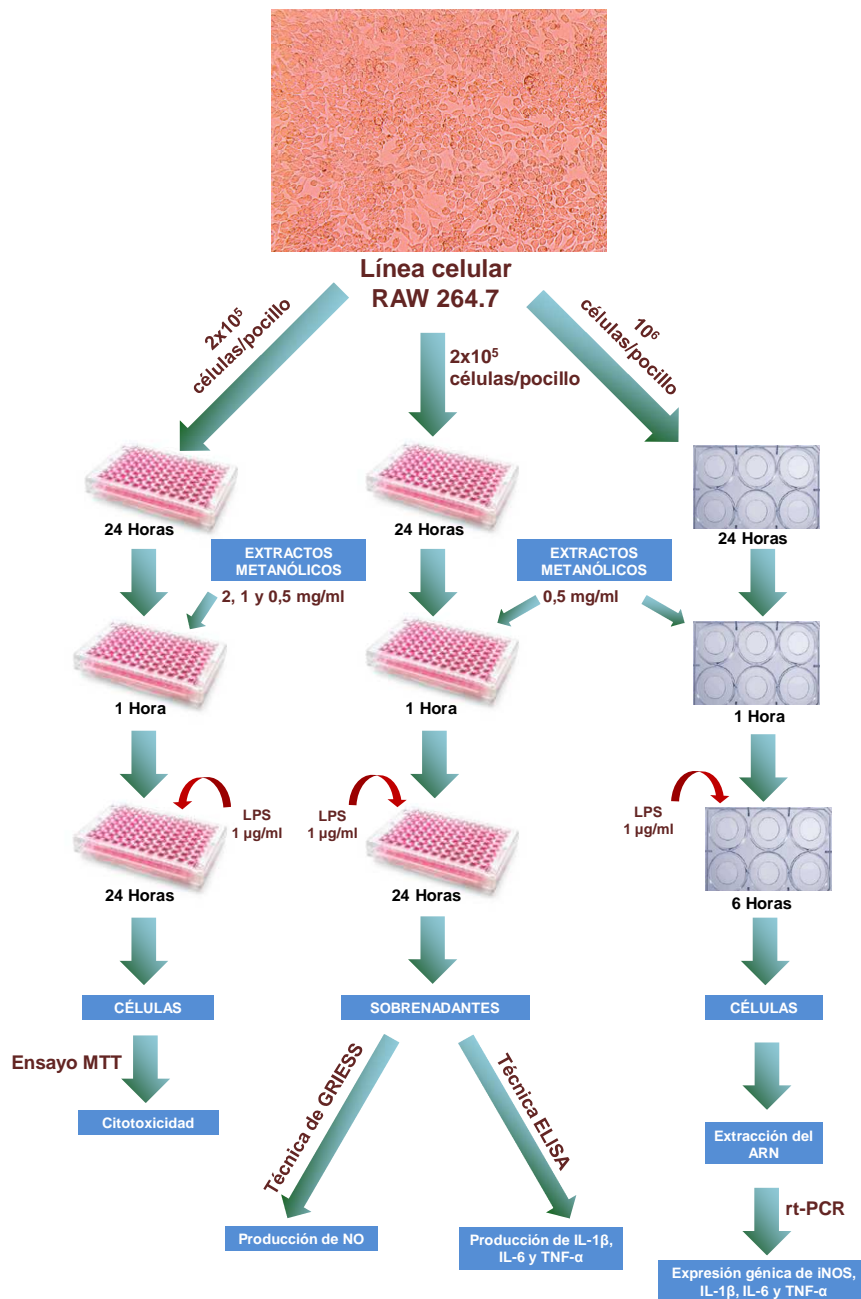


Figura 25. Diseño experimental de los ensayos llevados a cabo con la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7

III.3.4. Línea celular Caco-2

Para el estudio de los efectos de los distintos extractos en células intestinales, se empleó un clon de la línea celular de adenocarcinoma de colon humano, establecida por Fogh en 1977 (Fogh, Wright et al. 1977), la línea Caco-2. Dicha línea celular expresa un fenotipo semejante al de los enterocitos, gracias a su capacidad para formar una monocapa y diferenciarse (Hidalgo, Raub et al. 1989), lo cual la hace ideal para el estudio de la fisiología intestinal.

Los enterocitos regulan tanto el mantenimiento del óptimo estado de salud del intestino, como la defensa del mismo. Son capaces de secretar mediadores inflamatorios así como de responder ante ellos, además de modular la permeabilidad del epitelio intestinal.

Las células Caco-2 al crecer en cultivo lo hacen adheridas a un sustrato de modo que forman una monocapa. Al alcanzar el estado de confluencia, éstas se diferencian de manera espontánea, constituyendo así una monocapa polarizada que cuenta con muchas de las características funcionales y morfológicas de las que poseen los enterocitos maduros humanos (Hidalgo, Raub et al. 1989).

En este trabajo se utilizó el clon celular C2E, que fue donado por el equipo del Dr. Schenider del Instituto de Ciencias de la Vida (ISV) de la Universidad Católica de Lovaina (UCL), Louvain-La-Neuve, Bélgica.

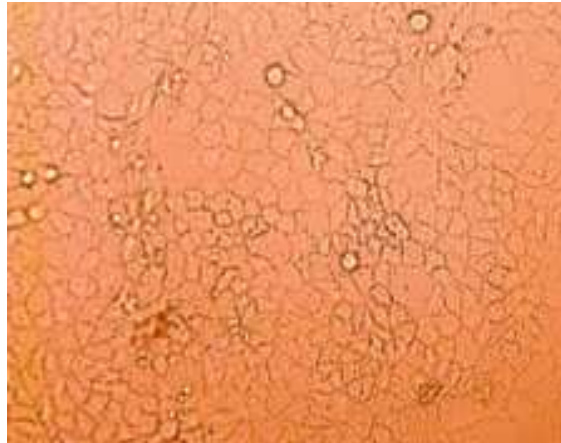


Figura 26. Fotografía de la línea celular Caco-2

Cultivo de células Caco-2

El mantenimiento de la línea celular Caco-2 se realizó mediante continuos subcultivos, en un incubador de CO₂, que proporcionaba las condiciones óptimas para su crecimiento: 37°C de temperatura, una atmósfera con 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa.

Para el cultivo de la línea celular Caco-2 se empleó el medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) de SIGMA®, suplementado con 10% de FBS inactivado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, una solución al 1% de aminoácidos no esenciales y con 1% de L-glutamina, todo ello de SIGMA®.

Se realizó un *stock* de células congeladas en nitrógeno líquido de igual modo al que se procedió con la línea RAW 264.7, detallado anteriormente y a partir de las células congeladas se mantenía el cultivo celular.

Subcultivos

La línea celular se conservaba en cultivo continuo mediante sucesivos subcultivos que tenían lugar una vez a la semana, antes de que las células alcanzaran el 80% de la confluencia total, se despegaban mediante tripsinización.

Tripsinización del cultivo celular

En este caso el despegado de las células se hace mediante la adicción al cultivo de la enzima proteolítica tripsina. Se trata de una proteasa pancreática que rompe las uniones peptídicas (grupos carboxílicos de lisina y arginina), permitiendo así la separación y dispersión de las células del cultivo. Además de la enzima se suelen emplear ciertos agentes quelantes (EDTA, EGTA, citrato) que eliminan los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} que favorecen las uniones entre las células.

Para el presente trabajo se utilizó una solución de Tripsina-EDTA de la marca Gibco BRL cuya composición es:

- . Tripsina, 5 g/l
- . EDTA, 2 g/l
- . NaCl, 8,5 g/l
- . Sin Ca^{+2} y Mg^{+2}

El proceso de tripsinización y subcultivo fue el siguiente:

1. Se eliminaba el medio de cultivo del frasco.
2. Lavado del cultivo celular con 25 mL de PBS (2 veces).
3. Se añadía al frasco de cultivo celular 10 mL de Tripsina-EDTA y se agitaba durante 30 segundos.

4. Se retiraban 8 mL de Tripsina-EDTA de modo que en el frasco de cultivo sólo quedaran 2 mL, asegurándose de que la Tripsina-EDTA tocara toda la superficie del frasco de cultivo.
5. Se mantenía el frasco en el incubador de CO₂ durante 10 minutos agitándolo periódicamente.
6. Se añadían rápidamente 18 mL de medio de cultivo completo para evitar el daño que la tripsina puede ocasionar al cultivo celular y se pasaba todo el contenido a un tubo de 50 mL.
7. Se pasaba la suspensión de células por una jeringa dos veces para disgregar los grupos celulares que pudieran haber quedado.
8. Contaje en cámara de Neubauer mediante la tinción azul tripán.
9. Una vez realizado el contaje se sembraban $2,5 \times 10^6$ células en un nuevo frasco de cultivo de 175 cm² con 50 mL de medio completo.

Para los experimentos se utilizaron células que se encontraban entre los pases 10 y 30, a las que cada 2 días se les renovaba el medio de cultivo.

Tratamientos

Para evaluar la posible citotoxicidad de los extractos metanólicos de hongos sobre las células Caco-2, se sembraron las células en placas de 96 pocillos pretratadas con 1% de colágeno 1 hora, a una concentración de 10^4 células/pocillo. Transcurridas 18 horas, se retiraba el medio de cultivo y se añadían los extractos en medio de cultivo fresco sin FBS. Finalmente, tras 24 horas de exposición celular a los extractos, se llevaban a cabo los ensayos de citotoxicidad MTT y LDH.

Para la valoración del NO en sobrenadante, las células se sembraban en placas de 48 pocillos, pretratadas con 1% de colágeno durante 1 hora, en concentraciones de 3×10^4 células/pocillo. Transcurridos 15 días, se añadían los extractos y 1 hora más

tarde, se llevaba a cabo la estimulación mediante la adición de un cóctel inflamatorio compuesto por: IL-1 β (5 μ g/mL), TNF- α (10 μ g/mL), IFN- γ (10 μ g/mL) y LPS (1 μ g/mL). Finalmente, transcurridas 48 horas desde la estimulación se procedía al ensayo de valoración del NO en sobrenadante.

Para los ensayos de expresión génica, la siembra se realizó a concentraciones de 10⁶ células/pocillo en placas de 6 pocillos, pretratadas con 1% de colágeno durante 1 hora. 15 Días después se añadían los extractos, para efectuar el pre-tratamiento de las células con los mismos durante 1 hora. Posteriormente se estimulaban las células añadiendo a los pocillos el cóctel inflamatorio, y finalmente, tras 6 horas de exposición de las células a dicho cóctel, se iniciaban los estudios de expresión génica.

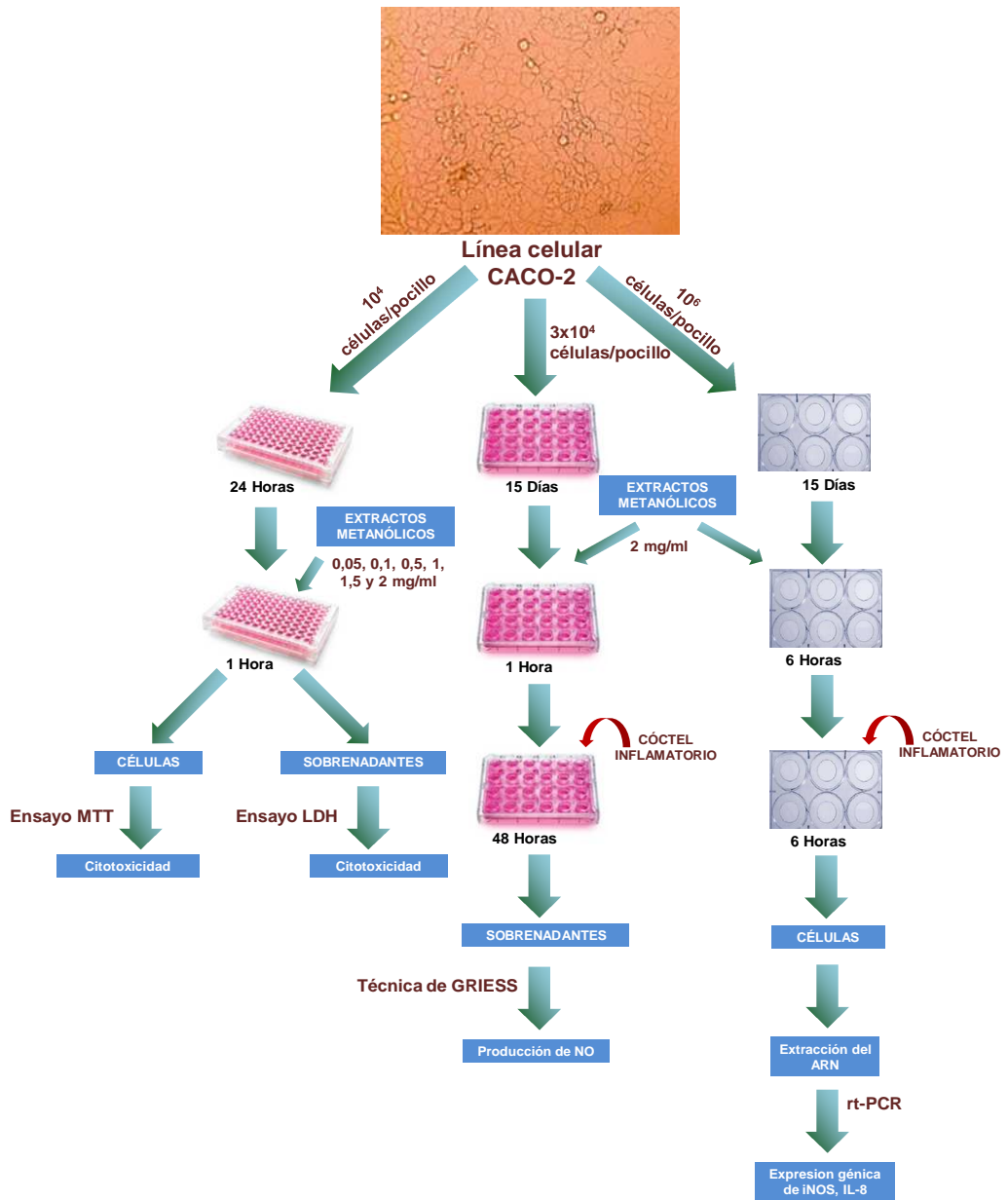


Figura 27. Diseño experimental de los ensayos realizados sobre la línea celular Caco-2

III.4. VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS

III.4.1. Ensayos de citotoxicidad

El ensayo MTT es uno de los más empleados para estudios de citotoxicidad *in vitro*. Se trata de una medida colorimétrica para la cuantificación de células que se utilizó para evaluar los efectos sobre la proliferación y la viabilidad celular de los extractos metanólicos de los hongos sobre las líneas celulares RAW 264.7 y Caco-2.

La técnica fue descrita por Mosmann en 1983 (Mosmann 1983) y se basa en el análisis de la actividad metabólica celular. La sal soluble de bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2 il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), es transformada en cristales de formazán mediante la actividad de la enzima de la cadena respiratoria mitocondrial succinato-reductasa. Esta enzima se encuentra activa únicamente en las células viables, de manera que en el ensayo, el número de células vivas será directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para estudiar la viabilidad de la línea celular Caco-2, se empleó además, el ensayo LDH (lactato deshidrogenasa). La LDH es una enzima estable que se encuentra presente en el citosol de todas las células y cataliza la oxidación del lactato a piruvato. Ante un agente citotóxico, las membranas plasmáticas de las células muertas o moribundas permeabilizan liberando al medio la LDH, de modo que el incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo, es proporcional al número de células lisadas.

III.4.1.1. Ensayos de citotoxicidad en la línea celular RAW 264.7

Para estudiar la citotoxicidad de las distintas dosis (0,5 mg/mL; 1 mg/mL; 2 mg/mL) de los extractos metanólicos de los hongos sobre la línea celular RAW 264.7, se realizó el Ensayo MTT 24 horas después de la adicción de los extractos y la estimulación con LPS.

Técnica

En primer lugar se desechaban los sobrenadantes del cultivo, y seguidamente las células se incubaban con 200 μ L de una solución de MTT en medio de cultivo incoloro a una concentración de 500 μ g/mL, durante 3 horas. En ese tiempo, las células vivas, metabolizan el MTT transformándolo en pequeños cristales de formazán, un derivado azul de este, gracias a la actividad enzimática de sus mitocondrias (Ferrari, Fornasiero et al. 1990).

Una vez transcurrida la incubación, el sobrenadante se retiraba y los cristales de formazán se disolvían en 200 μ L de DMSO. Por último, se leía la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm mediante lector de placas FLUOstar Omega de BMG LABTECH.

La absorbancia es proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. El valor obtenido para las células tratadas con LPS se tomó como referencia (100% de viabilidad) y a partir de él se calculó el % de viabilidad de las células expuestas a los distintos extractos.

III.4.1.2. Ensayos de citotoxicidad en la línea celular Caco-2

La citotoxicidad de las distintas dosis (0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL; 1,5 mg/mL; 2 mg/mL) de los extractos de hongos sobre la línea celular Caco-2, se realizó también mediante el ensayo MTT. El procedimiento fue el mismo que para RAW 264.7 con las siguientes variaciones:

- El tiempo de incubación de las células con 500 μ g/mL de MTT fue de 1 hora.
- Los cristales de formazán se disolvieron con 50 μ L de DMSO.
- La lectura de la DO se llevó a cabo a 490 nm mediante lector de placas FLUOstar Omega de BMG LABTECH.

Paralelamente al ensayo MTT, para estudiar la citotoxicidad de los extractos metanólicos de los hongos sobre la línea celular Caco-2, se llevó a cabo el ensayo LDH.

La valoración de la citotoxicidad de los extractos por el Ensayo LDH se realizó mediante el empleo del Cytotoxicity Detection Kit de Roche, que cuenta con 2 pasos: En el primero, durante la oxidación del lactato a piruvato que la LDH liberada al medio realiza, el NAD^+ es reducido a NADH/H^+ . En el segundo paso, un catalizador transfiere 2 átomos de H del NADH/H^+ a la sal de tetrazolio amarilla, la cual se reduce a formazán. El formazán es soluble en agua y puede ser detectado midiendo su absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro. El incremento en la cantidad de formazán producido en el sobrenadante de cultivo se correlaciona directamente con el número de células muertas.

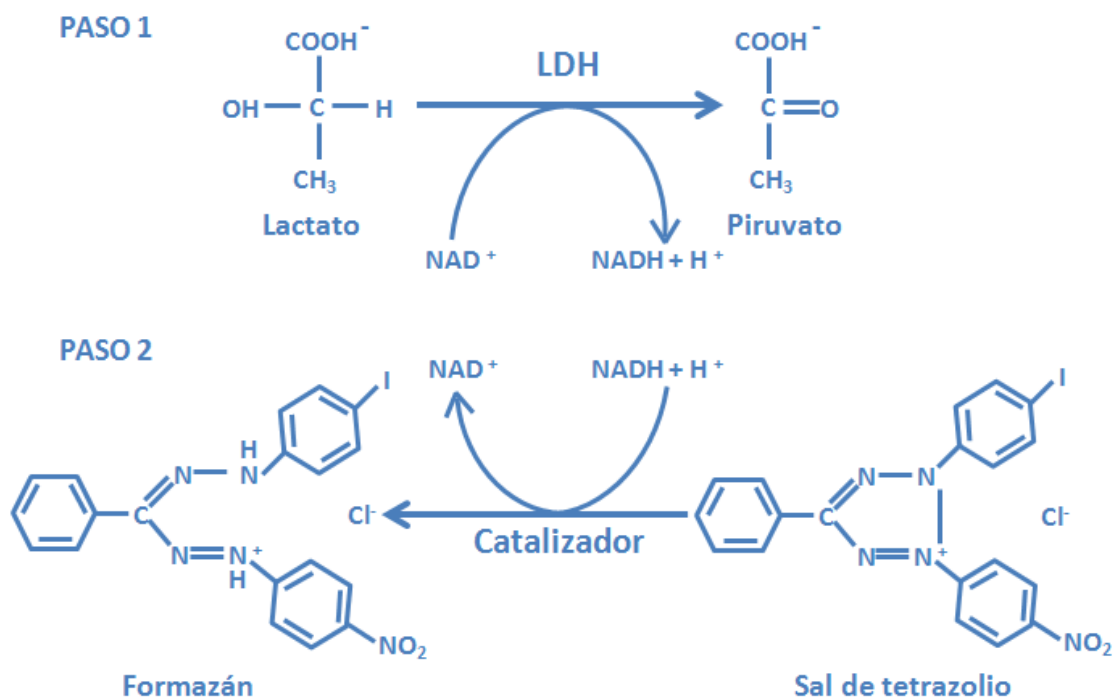


Figura28. Esquema de los dos pasos en los que se fundamenta el ensayo LDH

Técnica

Se recogían los sobrenadantes celulares, y se sometían a una centrifugación de 13000 r.p.m. durante 3 minutos. Después se añadían en placas de 96 pocillos, 20 μL de sobrenadantes y 80 μL de PBS, de modo que los sobrenadantes eran diluïdos 5 veces en un volumen final de 100 μL /pocillo. Posteriormente se añadían 100 μL del reactivo LDH a cada pocillo. La placa se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para finalizar, se leía la absorbancia a 490 nm, corregida a 650 nm, la cual, era proporcional a la cantidad de células vivas.

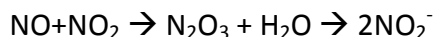
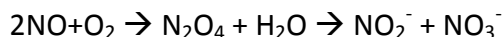
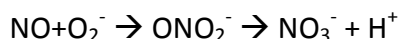
La viabilidad celular se calculó mediante la realización de porcentajes de viabilidad para las muestras de los extractos, respecto al valor de aquellas células sin tratar (Basales) que fueron consideradas como referencia (viabilidad 100%).

III.4.2. Ensayos de actividad antiinflamatoria

III.4.2.1. Valoración de producción de óxido nítrico

Los organismos en condiciones fisiológicas normales producen NO en cantidades traza para el mantenimiento de un óptimo estado de salud. Sin embargo, el NO también es producido en concentraciones micromolares como respuesta a estímulos perjudiciales (inflamatorios, mitogénicos, etc.) con el fin de proteger al organismo de patógenos exógenos a través de su toxicidad oxidativa.

La molécula de NO posee una vida media muy corta en el organismo (4 segundos), y además presenta una alta tendencia a reaccionar con varias moléculas presentes en los fluidos biológicos. De modo que los productos finales del NO, *in vivo*, son nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) (Moncada, Palmer et al. 1992):



Valoración de producción de NO en células RAW 264.7

El NO es un gas inestable que origina otros productos como nitratos y nitritos. Para su valoración se suelen emplear métodos indirectos como el ensayo de Griess, que determina los productos estables de la oxidación del NO mediante la valoración colorimétrica de la concentración de nitritos presentes en la muestra (Weissman and Gross 2001).

Griess en 1879 (Griess 1879) describió por primera vez un ensayo fundamentado en la reacción de diazotización a partir de naftiletildiamina y sulfanilamida, bajo condiciones ácidas, que da origen a un compuesto coloreado azóxico. El reactivo de Griess está compuesto por una solución de N-1-(naftil) etildiamina dihidrocloruro y una solución de sulfanilamida. La sulfanilamida

reacciona con los nitritos en medio ácido y esto, seguido del acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro, origina un complejo coloreado púrpura adecuado para la determinación espectrofotométrica de los nitritos (Miranda, Espey et al. 2001).

Técnica de Griess

Se incubaban 50 μ L de sobrenadante celular con igual cantidad del reactivo de Griess de SIGMA® (1% sulfanilamida, 0,1% naphthylethylenediaminedihydrochloride, y 2% ácido fosfórico), durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de la incubación se llevaba a cabo la lectura de la DO a 540 nm usando un lector de placas FLUOstar Omega de BMG LABTECH. Las concentraciones de nitritos de las muestras se calcularon mediante la interpolación en una recta de calibración que se elaboraba a partir de una solución madre de nitrito de sodio de concentración 1mM diluida en medio de cultivo DMEN sin FBS ni antibióticos. Las concentraciones de los estándares empleados fueron: 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M y 2,5 μ M. El valor obtenido para las células estimuladas (LPS) se tomó como 100% de producción de NO y se utilizó como referencia para calcular el % de producción de NO de las células estimuladas y tratadas con los distintos extractos.

Valoración de producción de NO en células Caco-2

La valoración de la producción de NO por las células Caco-2 se llevó a cabo mediante el kit Nitrate/Nitrite Assay de Cayman, que mide la concentración total de nitrato/nitrito en dos pasos:

El primero es la conversión de nitratos en nitritos mediante la acción de la enzima nitrato reductasa. El segundo, es la adición de los reactivos de Griess para convertir el nitrito en el compuesto azul, azo (Green, Wagner et al. 1982).

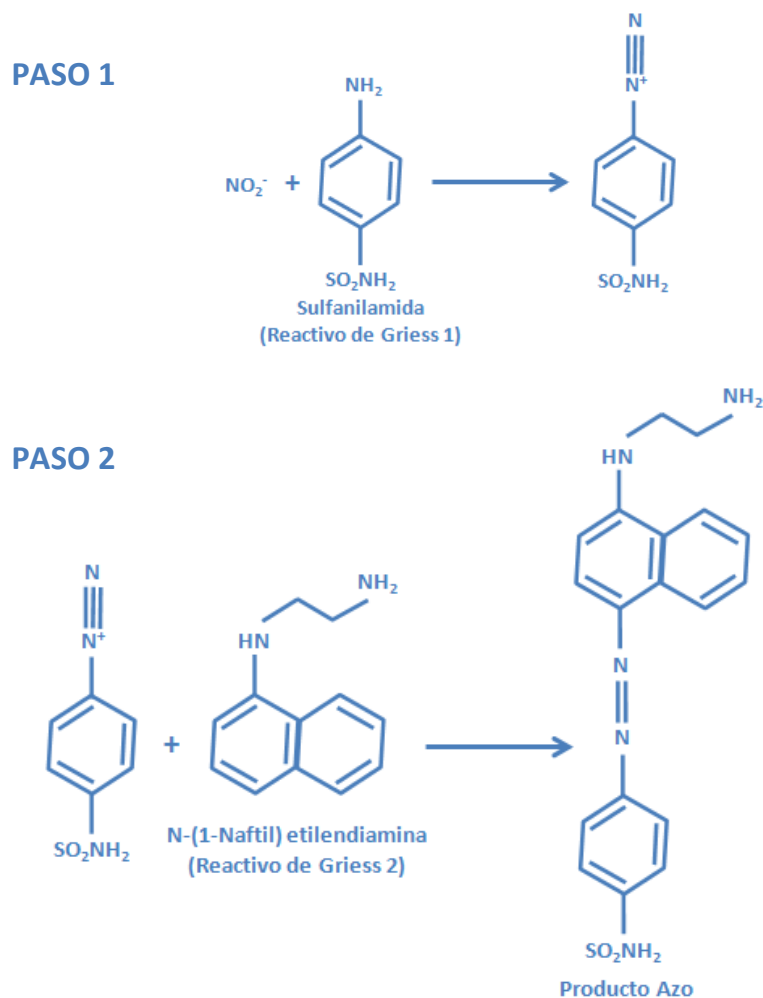


Figura 29. Transformación de Nitrito al compuesto Azo mediante la acción del reactivo de Griess

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante:

Se añadían 80 μL de los estándares y las muestras a los correspondientes pocillos. A continuación se les incorporaba 10 μL del cofactor para la enzima nitrato reductasa, y seguidamente 10 μL de la enzima nitrato reductasa. Se incubaba la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se añadían 50 μL del reactivo de Griess 1 e inmediatamente después otros 50 μL del reactivo de Griess 2. Se incubaba la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se

efectuaba la lectura de la DO del cromóforo azo a 540 nm en el lector de placas FLUOstar Omega de BMG LABTECH.

La cantidad de nitrito presente en las muestras se calculó por medio de una curva estándar, generada utilizando diluciones seriadas de NaNO₂ en medio de cultivo fresco. El valor obtenido para las células estimuladas sin tratar con extractos (Cóctel) se tomó como el 100% de producción de NO y se tomó como referencia para calcular el % de producción de NO en las células estimuladas expuestas a los distintos extractos.

III.4.2.2. Valoración de citoquinas en sobrenadantes

Las citoquinas son mediadores solubles de la inmunidad innata y adaptativa. Son polipéptidos producidos por las células inmunes, aunque también pueden ser sintetizadas por diferentes células tisulares como endoteliales y algunas epiteliales, en respuesta a microorganismos y otros antígenos. Además, median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias, de manera que diferentes citoquinas estimulan distintas respuestas celulares.

En la presente tesis, la valoración de citoquinas en sobrenadantes de cultivo celular se realizó mediante la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Este tipo de ensayos se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida a través de anticuerpos que producen de un modo directo o indirecto una reacción cuyo producto final, puede determinarse mediante un espectrofotómetro (Crowther 1995).

En este trabajo se utilizó el ELISA tipo sándwich "DAS" (Double Antibody Sandwich, en español: sándwich de doble anticuerpo). En este ensayo el analito queda unido a dos anticuerpos, uno de captura, que se encuentra fijado a la superficie del

pocillo, y otro de detección, que está biotinilado para unirse posteriormente a una enzima y desencadenar la reacción enzimática que dará lugar a un producto coloreado.

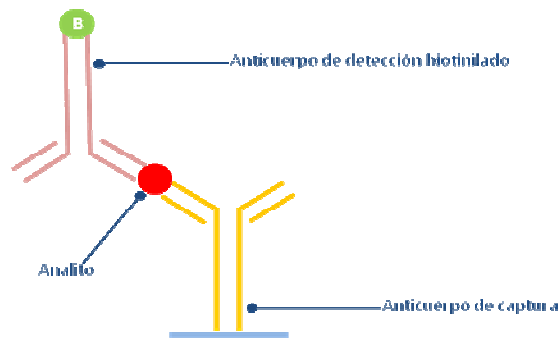


Figura 30. Esquema de la estructura/unión característica de los ELISAs tipo sándwich “DAS

Este tipo de ELISA consta de 4 etapas fundamentales:

1) Fijación del anticuerpo de reconocimiento o de captura (anti IL-1 β , anti IL-6 o anti TNF- α) previa a la incorporación del medio de cultivo celular dónde se encuentran la citoquina a valorar (IL-1 β , IL-6 o TNF- α).

2) Adición de un anticuerpo de detección biotinilado, específico para la citoquina, capaz unirse a ella en un epítipo diferente.

3) Incorporación de la enzima estreptavidina-peroxidasa de rabanillo picante (HRPO), que se une covalentemente con rapidez al anticuerpo de detección por estar biotinilado.

4) Producción de la reacción enzimática mediante la adición de las soluciones sustratos (peróxido de hidrógeno y el cromógeno tetrametilbencidina) y detención de la misma, a través de la agregación de solución stop (ácido clorhídrico).

La lectura de la absorbancia será proporcional a la concentración de la citoquina detectada (Crowther 1995).

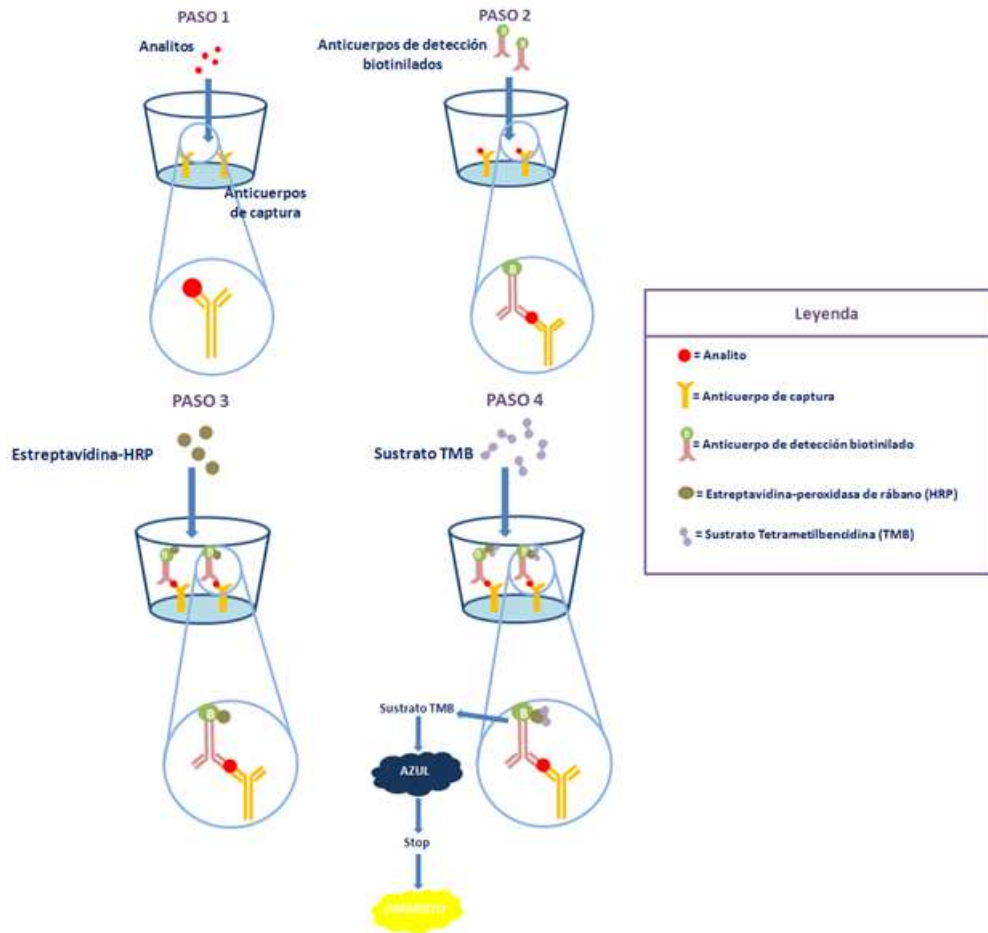


Figura 31. Esquema de las 4 etapas fundamentales de la técnica ELISA según protocolo de DUO SET de R&D. (Adaptación de http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_duoSetelisaassayprinciple.aspx)

Para la valoración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , producidas por la línea celular RAW 264.7, se utilizaron los kits ELISA IL-1 β , ELISA IL-6 y ELISA TNF- α DUO SET de R&D.

Las muestras se analizaron a las siguientes diluciones:

Tabla 9. Diluciones empleadas para los ELISA de IL-1 β , IL-6 y TNF- α

Interleuquina-1- β	Dilución
Basales	1/2
LPS y Muestras	1/4
ELISA Interleuquina-6	Dilución
Basales	1/2
LPS y Muestras	1/50
Factor de necrosis tumoral- α	Dilución
Basales	1/5
LPS y Muestras	1/200

El ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante, procediendo de la siguiente manera:

1. Se incuban los pocillos de la placa con 100 μ L de anticuerpo de captura durante 18 horas a temperatura ambiente.
2. Se efectúan 3 ciclos de lavado de 400 μ L de tampón de lavado cada uno (en un lavador de placas marca Biotek, modelo ELx50), para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido a la superficie de los pocillos.
3. Se añaden 300 μ L de tampón de bloqueo para rellenar los espacios libres que hayan podido quedar en la superficie con el fin de evitar posibles futuras interferencias, y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Se efectúan otros 3 lavados y se incuba la placa con 100 μL / pocillo de muestras y estándares, dejando tres pocillos como blancos, a los que se les añade 100 μL de medio de cultivo.
5. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, se vuelve a lavar placa.
6. Se añaden 100 μL de anticuerpo de detección, que presenta un dominio afín para la citoquina en estudio (IL-1 β , IL-6 o TNF- α) y otro para la enzima estreptavidina-peroxidasa de rabanillo, y se incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente.
7. Se vuelve a lavar la placa, se añaden 100 μL de la enzima estreptavidina-peroxidasa de rabanillo y se incuba la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
8. Se efectúan 3 lavados y se añaden a los pocillos 100 μL / pocillo de la solución sustrato, y se incuba la placa de nuevo 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Durante ese tiempo, se desarrolla un color azulado a consecuencia de la reacción enzimática producida.
9. Para parar la reacción enzimática, se añaden a los pocillos 50 μL de la solución stop, que produce un color final amarillento.
10. Para concluir se mide la densidad óptica en un lector de placas FLUOstar Omega de BMG LABTECH a 450 nm-570 nm.

Las concentraciones de las muestras a estudio se determinan mediante interpolación de la curva estándar obtenida a partir de las densidades ópticas correspondientes a estándares de concentraciones conocidas, proporcionadas por la casa comercial.

III.4.2.3. Valoración de la expresión de genes proinflamatorios

La valoración de la expresión génica de los distintos marcadores inflamatorios estudiados se realizó mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, previa extracción de ARN y transcripción reversa.

En el caso de la línea celular RAW 264.7, se analizó la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α , y de la enzima iNOS. Mientras que la valoración de la expresión génica para la línea celular Caco-2, se realizó sobre la citoquina proinflamatoria IL-8, y la enzima iNOS.

Tabla 10. Genes estudiados en los ensayos de expresión génica en las líneas celulares RAW 264.7 y Caco-2

LÍNEA CELULAR RAW 264.7		
Nombre del gen	Símbolo	ID Genbank
Interleuquina-1 β	IL-1 β	NM_008361.3
Interleuquina-6	IL-6	NM_000600.2
Factor de necrosis tumoral-α	TNF- α	NM_013693.2
Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS	NM_010927.3
LÍNEA CELULAR CACO-2		
Nombre del gen	Símbolo	ID Genbank
Interleuquina-8	IL-8	HS_00174103
Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS	HS_01075529

III.4.2.3.1. Extracción y valoración de ARN

Para la extracción del ARN se sembraron las células RAW 264.7 o Caco-2 en placas de 6 pocillos a una concentración de 10^6 células. La lisis celular se realizó mediante el protocolo de aislamiento de alta calidad del Ribopure™ Kit de Applied Biosystems. El ARN extraído y purificado fue tratado con 2 μ l de ADNasa (TURBO DNA-free™ Kit de Applied Biosystems) para eliminar los restos de ADN genómico.

La cuantificación del ARN extraído se realizó por espectrofotometría a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 UA corresponde a 40 μ g de ARN. La pureza se determinó mediante el cociente de absorbancia 260/280 nm, siendo el valor óptimo de pureza el comprendido entre 1,8 y 2,1. Las muestras de ARN extraído que no alcanzaron este grado de pureza se desecharon.

La valoración de la calidad del ARN, se realizó por electroforesis capilar en base al protocolo del Experion™ RNA StdSens Analysis Kit de Bio-Rad. Este sistema permite determinar la calidad de una muestra de ARN, proporcionando al final del ensayo una imagen virtual del gel, en el que se visualizan las bandas 18S y 28S. Además el equipo calcula un indicador de calidad del ARN (RQI, por sus siglas en inglés RNA quality indicator), considerándose ARNs aptos para PCR, aquellos con un RQI igual o superior a 7. De este modo se asegura que el ARN que será utilizado para la qRT-PCR cumple con los requisitos que la guía MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), exige para la publicación de datos obtenidos con PCR a tiempo real (Taylor, Wakem et al. 2010).

La calidad e integridad del ARN extraído se valoró mediante electroforesis capilar siendo en todos los casos el índice RQI superior a 8, como se aprecia en la tabla, en la que se muestran los resultados representativos de uno de los experimentos.

Tabla 11. Índice RQI de los ARNs de células RAW 264.7 expuestas a los extractos metanólicos de hongos comestibles. Ejemplo representativo

Pocillo ID	Muestra Nombre	ARN Área	ARN (ng/ μ L)	Ratio [28S:18S]	RQI
L	Ladder	280.18	160.00		
1	PC1	314.35	179.51	1.99	10.0
2	PC1	323.90	184.97	2.05	9.9
3	M1	347.77	198.60	2.04	10.0
4	M1	282.68	161.43	2.09	9.9
5	S1	273.23	156.03	2.11	10.0
6	S1	318.26	181.75	2.14	10.0
7	TN1	252.58	144.24	2.22	9.7
8	TN1	280.94	160.44	2.25	10.0
9	R1	209.45	119.61	2.25	10.0
10	R1	206.50	117.93	2.29	9.7
11	P1	194.38	111.01	2.15	8.3
12	P1	150.98	86.22	2.26	9.4

El indicador de la calidad del ARN, RQI es un número, en una escala de 1-10, que se genera automáticamente para muestras de ARN total de células eucariotas de mamíferos. Un RQI igual a 1 representa un ARN altamente degradado, mientras que un RQI de valor 10, corresponde a un ARN intacto. RQI permite, por tanto, valorar

fácilmente la integridad de una muestra de ARN total. RQIs superiores a 7, se consideran de alta calidad y por tanto, aptos para ensayos de expresión génica (Denisov, Strong et al. 2008). Todas las muestras que se emplearon en este trabajo, presentaron valores superiores a 8.

El software Experion, genera la imagen de un gel virtual de electroforesis, que permite examinar de manera visual, la calidad de los ARNs a estudio. Como puede observarse en la imagen, la calidad de los ARNs de las células RAW 264.7 tratadas con los extractos metanólicos de hongos comestibles, contaron con unas bandas 18s y 28s de alta calidad.

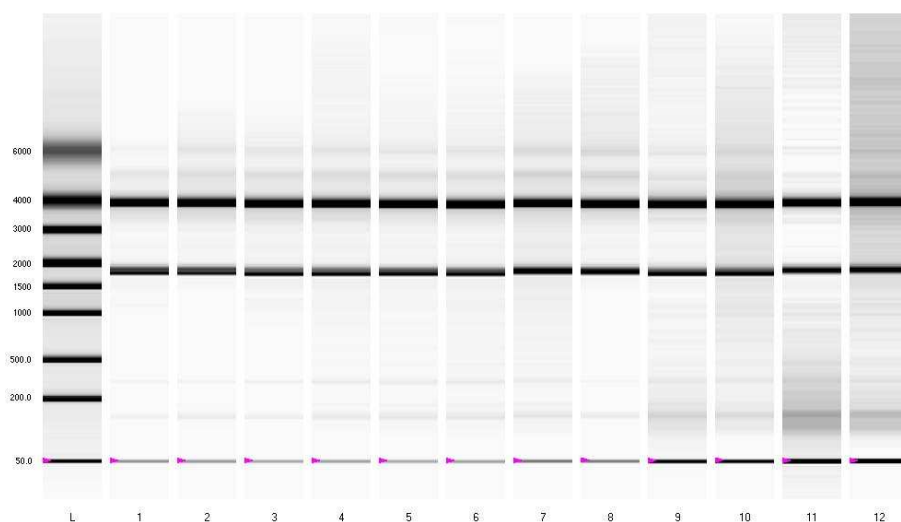


Figura 32. Gel con las bandas 18s y 28s de los ARNs de las células RAW 264.7 expuestas a los extractos metanólicos de hongos comestibles. Ejemplo representativo

La observación de dos bandas nítidas al estudiar los ARNs ribosómicos (ARNr), una para la subunidad pequeña y otra para la grande, en la que la intensidad de la

banda grande es aproximadamente dos veces la pequeña, es indicativa de que el ARN total está intacto (Denisov, Strong et al. 2008).

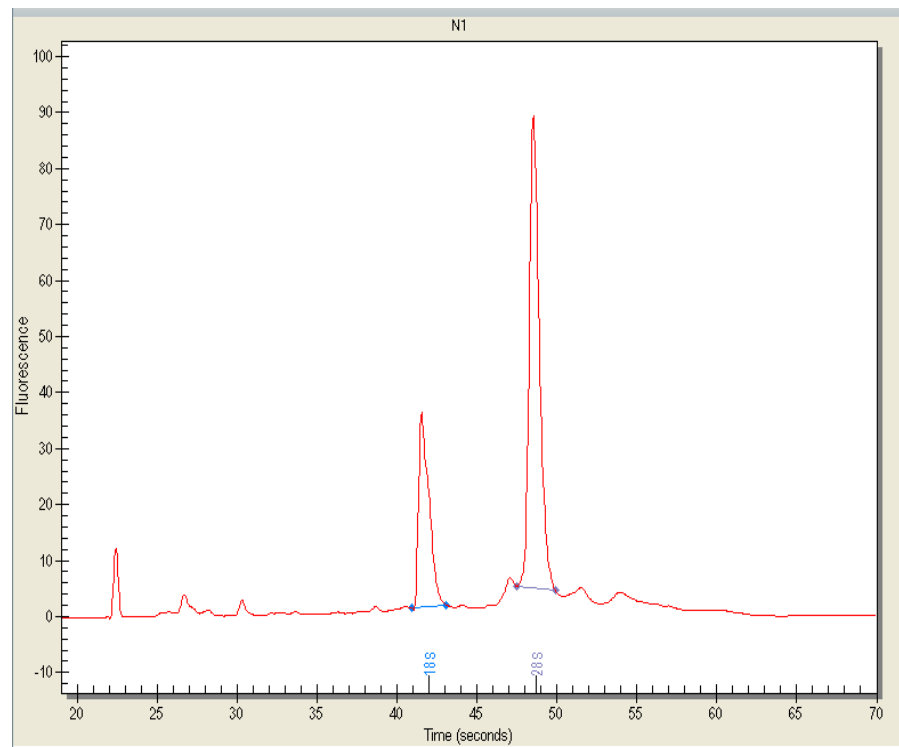


Figura 33. Ejemplo representativo de un gel con las bandas 18s y 28s de los ARNs de las células RAW 264.7 expuestas a extractos metanólicos de hongos comestibles

La Figura 33 muestra un electroferograma de una muestra generado automáticamente por el software Experion. En él se aprecia una correcta separación de ARN total, a partir de células RAW 264.7 tratadas con uno de los extractos metanólicos y activadas por LPS. Los dos picos señalados representan los ARNr 18S y 28S.

III.4.2.3.2. Retrotranscripción

Una vez cuantificada la cantidad de ARN extraído y analizada su calidad, se llevaba a cabo la transcripción reversa del mismo.

Para obtener el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN se utilizó el kit High RNA to cDNA de Applied Biosystems. Se realizó la retrotranscripción a partir de 0,5 µg de ARN siguiendo las indicaciones comerciales, en un termociclador Advanced Primus 96 de PEQLAB con las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 12. Etapas y condiciones de la Retrotranscripción

	Etapa	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
RT Hold	1	1	37°C	60 minutos
RT inactivación Hold	2	1	95°C	5 minutos
Hold	3	1	4°C	Indefinido

El ADNc así obtenido se conservaba a -80 °C hasta su utilización.

III.4.2.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (q-PCR)

Fundamento de la q-PCR

La PCR cuantitativa en tiempo real es la técnica de mayor sensibilidad para la detección de ácidos nucleicos (Aguilera, Ruiz-Tachiquín et al. 2014). Se trata de una variante de la tradicional PCR que Kary B. Mullis desarrolló en la década de los 80. A diferencia de ésta, la PCR en tiempo real permite monitorizar la reacción de manera que la amplificación y la detección se dan simultáneamente, ya que correlaciona el producto de la PCR de cada ciclo con una señal de fluorescencia. Además, el término cuantitativa indica que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra en cualquier momento de la amplificación, a diferencia de la PCR tradicional. Posee

como características principales su alta especificad, un amplio rango de detección (de 1 a 10^7 equivalentes genómicos de la secuencia inicial) y una gran rapidez en la visualización del producto (Aguilera, Ruiz-Tachiquín et al. 2014).

Para desarrollar la amplificación por PCR en tiempo real además de los elementos que se utilizan en la PCR convencional: los 4 desoxirribonucleótidos-fosfato (dNTP), al menos dos cebadores o iniciadores (primers, en inglés), iones divalentes (generalmente magnesio en forma de cloruro de magnesio), iones monovalentes (generalmente potasio), solución tampón, ADN polimerasa (o mezcla de diferentes polimerasas) y un molde de ADN; se necesita el empleo de un fluoróforo con afinidad por el ADN de doble hélice. De manera que mediante el empleo de un termociclador capaz de hacer incidir un haz de luz de una determinada longitud de onda sobre la muestra, y de detectar la fluorescencia emitida por el fluoróforo excitado, es posible medir la cantidad de ADN sintetizado durante cada ciclo de amplificación (Costa 2004). Existen casos, como este trabajo, en los que el molde empleado para la PCR no es inicialmente ADN, sino un ADN complementario (ADNc) de hebra simple, que ha sido previamente obtenido por retrotranscripción de ARN, mediante la acción de una transcriptasa inversa, en este caso se denomina RT-qPCR.

Los fluoróforos que permiten el seguimiento de la amplificación del ADN durante el transcurso de la PCR en tiempo real, pueden ser de dos tipos:

- Fluoróforos con afinidad por el ADN: bromuro de etidio y *SYBR Green*, principalmente.
- Sondas específicas para fragmentos del ADN: Son específicos para una secuencia de interés y se dividen en 3 clases:
 - . Sondas de hidrólisis
 - . Sondas de hibridación
 - . Sondas de horquilla

Todas se basan en el principio de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda. Cuando ambos están próximos, el apagador absorbe la fluorescencia del reportero, pero cuando estas moléculas se separan, el apagador no puede absorber la fluorescencia del reportero, permitiendo que el fotodetector la detecte (Kubista, Andrade et al. 2006).

El sistema de detección utilizado en este trabajo, es el de las sondas de hidrólisis, en concreto el de las sondas TaqMan[®], también conocidas como sondas 5' nucleasas, por utilizar la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa. Este sistema emplea una sonda, es decir, un oligonucleótido específico para la secuencia del gen de interés, marcado con dos fluoróforos: el reportero que se une al extremo 5' y el apagador al extremo 3'. Así, la sonda hibrida con el ADN presente en la muestra, de manera que inicialmente la fluorescencia del reportero está apagada, mientras que la sonda está intacta, por el fenómeno FRET. Sin embargo, una vez que la ADN polimerasa ha iniciado su actividad, cuando ésta se topa con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', de manera que los fluoróforos se separan, permitiendo así la emisión de fluorescencia por parte del reportero. Dicha fluorescencia está relacionada con la cantidad de amplicón producido, ya que la hidrólisis de la sonda produce un aumento de la señal del reportero y ésta crece proporcionalmente al aumento del amplicón (Heid, Stevens et al. 1996).

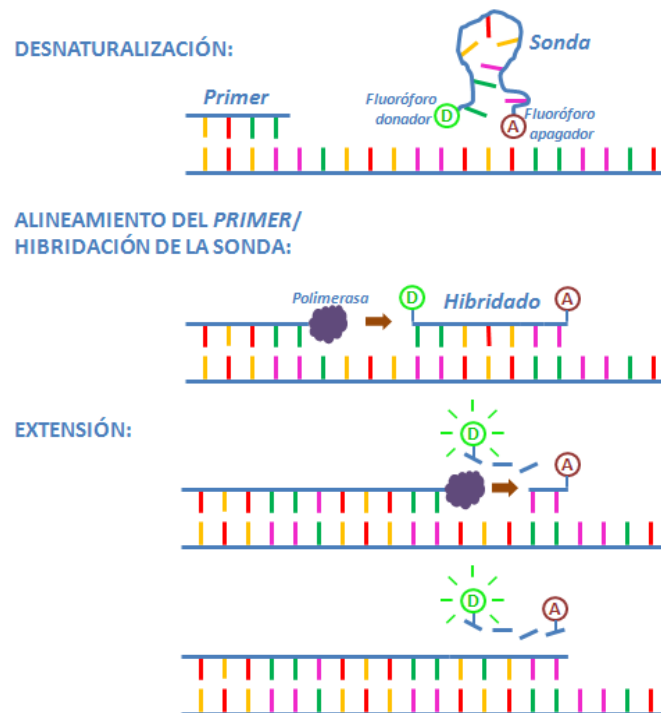


Figura 34. Esquema de las 3 etapas del sistema de detección de las sondas de hidrólisis TaqMan®

Método de cuantificación de la expresión génica

La cuantificación en la PCR en tiempo real puede llevarse a cabo en términos absolutos o relativos.

La cuantificación absoluta permite determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN en una muestra. Relaciona la señal de amplificación que se ha obtenido con el contenido de ADN, mediante el empleo de una curva de calibrado. Es imprescindible que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta posean la misma eficiencia de amplificación.

La cuantificación relativa mide los cambios de expresión de un gen diana en varias muestras en estudio, frente a la expresión de ese gen en una de las muestras tomada como referencia. Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizó el método comparativo de Ct, el cual calcula los cambios de expresión génica como un

cambio relativo de la misma (número de veces), utilizando para normalizar un gen endógeno que actúa como calibrador, en este caso un gen constitutivo, la β -actina (Livak and Schmittgen 2001).

La cuantificación relativa, a diferencia de la cuantificación absoluta, no requiere la realización de una curva de calibrado, por lo que es más fácil de desarrollar y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos. Sin embargo es imprescindible normalizar los datos entre los valores obtenidos para el gen en estudio y el endógeno, de manera que los resultados reflejen los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra que se ha añadido (Aguilera, Ruiz-Tachiquín et al. 2014).

La qPCR se realizó mediante la metodología desarrollada para Step One de Applied Biosystems. Los reactivos para el análisis de expresión génica de los diferentes genes a estudiar y de los controles endógenos se obtuvieron de Applied Biosystems, y las condiciones experimentales se ajustaron a las indicaciones del fabricante, mediante la utilización de StepOne Real-Time PCR System de Applied Biosystems:

Tabla 13. Etapas y condiciones de la PCR

	Etapa	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
UDG Incubación Hold	1	1	50°C	2 minutos
Activación enzima Hold	2	1	95°C	10 minutos
PCR (ciclo)	3	40	95°C	15 segundos
			60°C	1 minuto

La amplificación y detección de los genes específicos se llevó a cabo con el sistema de detección de secuencias TaqMan.

Se realizó una curva estándar de validación para cada primer-sonda con diluciones seriadas de varias muestras para asegurarse que el final de la reacción se encontraba en la parte media de la curva exponencial de amplificación. Para normalizar los datos, los genes en estudio se refirieron al gen ACTB que se utilizó como gen endógeno compensando así cualquier diferencia en la eficiencia de la retrotranscripción. Todas las muestras se amplificaron por duplicado.

Tabla 14. Sondas TaqMan® y diluciones de la muestra para cada gen, utilizadas en la qRT-PCR para células RAW 2647

Nombre del gen	Sondas TAQMAN	Dilución del ADNc
ACTB	Mm 01205647_g1	1/4000
IL-1β	Mm 0043228_m1	1/8
IL-6	Mm 99999064_m1	1/8
iNOS	Mm 1309902_m1	1/8
TNF-α	Mm 0043228_m1	1/20

Tabla 15. Sondas TaqMan® y diluciones de la muestra para cada gen, utilizadas en la qRT-PCR para células Caco-2

Nombre del gen	Sondas TAQMAN	Dilución del ADNc
ACTB	HS99999903_m1	1/4000
IL-8	HS 00174103_m1	1/8
iNOS	HS 01075529_m1	1/8

Cálculo de la expresión génica por el método de cuantificación relativa

Los datos de expresión génica se calcularon utilizando el método de cuantificación relativa, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems) donde la cantidad de expresión del gen a estudiar, normalizado a un gen referencia endógeno y relativa a una muestra de referencia, se expresa por la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Para llegar a los resultados de dicha fórmula aritmética, los datos de la amplificación del gen obtenido por la qRT-PCR fueron exportados como valores Ct (*threshold cycle*, ciclo de amplificación en el cual la señal de fluorescencia emitida se encuentra considerablemente por encima de los niveles de amplificación inespecífica y es inversamente proporcional al número de copias iniciales de la muestra).

Los valores de la expresión de cada gen en estudio se calcularon por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalizados al gen ACTB como gen endógeno y relativo al valor de expresión de las muestras estimuladas por LPS o cóctel inflamatorio (referencia). Así, los cálculos llevados a cabo fueron los siguientes:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gen problema}} - \Delta Ct_{\text{gen problema de la muestra referencia}}$$

$$\text{Expresión relativa del gen problema} = RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde, $Ct_{\text{gen problema}}$ es el ciclo para el gen a estudiar; $Ct_{\text{gen endógeno}}$ es el ciclo de ampliación para el gen de referencia (ACTB).

Los resultados se expresan en valores de expresión relativa (RQ), en función del valor de referencia (LPS o Cóctel), cuya expresión relativa (RQ) siempre es 1.

III. 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa de análisis estadístico SPSS Statistics 17.0.

Los datos se representan con la media \pm DE. En los ensayos de citotoxicidad, producción de mediadores inflamatorios y de expresión génica, las comparaciones entre los valores de referencia y los de las muestras tratadas con extractos, se llevaron a cabo mediante el test T de Student. Los estudios de correlación se desarrollaron a través del modelo del coeficiente de correlación de Pearson (r). El nivel de significación estadística para todos los casos fue $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad anti-inflamatoria de extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos, obtenidos a partir de distintas especies de hongos comestibles, unas silvestres y otras cultivadas.

Los extractos se prepararon a partir de los carpóforos de los distintos hongos. En primer lugar dichos carpóforos fueron deshidratados mediante liofilización y molidos hasta obtener un polvo fino con el fin de minimizar la variabilidad debida a los distintos estadios de maduración o distintos grados de hidratación de las muestras. A partir de este polvo liofilizado se obtuvieron extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos mediante sucesivas extracciones, se evaluó la composición fenólica de dichos extractos y su capacidad antiinflamatoria.

IV.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE HONGOS COMESTIBLES

IV.1.1. Valoración del contenido en compuestos fenólicos totales

Para determinar el contenido fenólico total de los extractos metanólicos obtenidos a partir de hongos comestibles, se empleó el método del reactivo Folin-Ciocalteu, que es una combinación de fosfomolibdato y fosfotungstato, empleada para determinar tanto antioxidantes fenólicos como polifenólicos (Singleton, Orthofer et al. 1999).

Como se puede observar en la figura 35, el contenido fenólico total de los extractos se situó entre un valor mínimo de 0,712 GAE/g y uno máximo de 5,862 GAE/g obtenidos en los extractos de *H. marzuolus* y *B. edulis*, respectivamente.

Los extractos de *A. bisporus* y *C. cibarius* también presentaron elevado contenido en compuestos fenólicos con valores de 3,314 y 2,262 mg GAE/g, respectivamente.

Los cuatro extractos restantes: *L. deliciosus*, *P. ostreatus*, *C. gambosa* y *C. cornucopioides* presentaron valores muy parecidos comprendidos entre 1,4 y 1,9 GAE/g. Así, *L. deliciosus*, contenía 1,447 GAE/g, *P. ostreatus* 1,529 GAE/g, *C. cornucopioides* 1,552 GAE/g y *C. gambosa* 1,920 GAE/g.

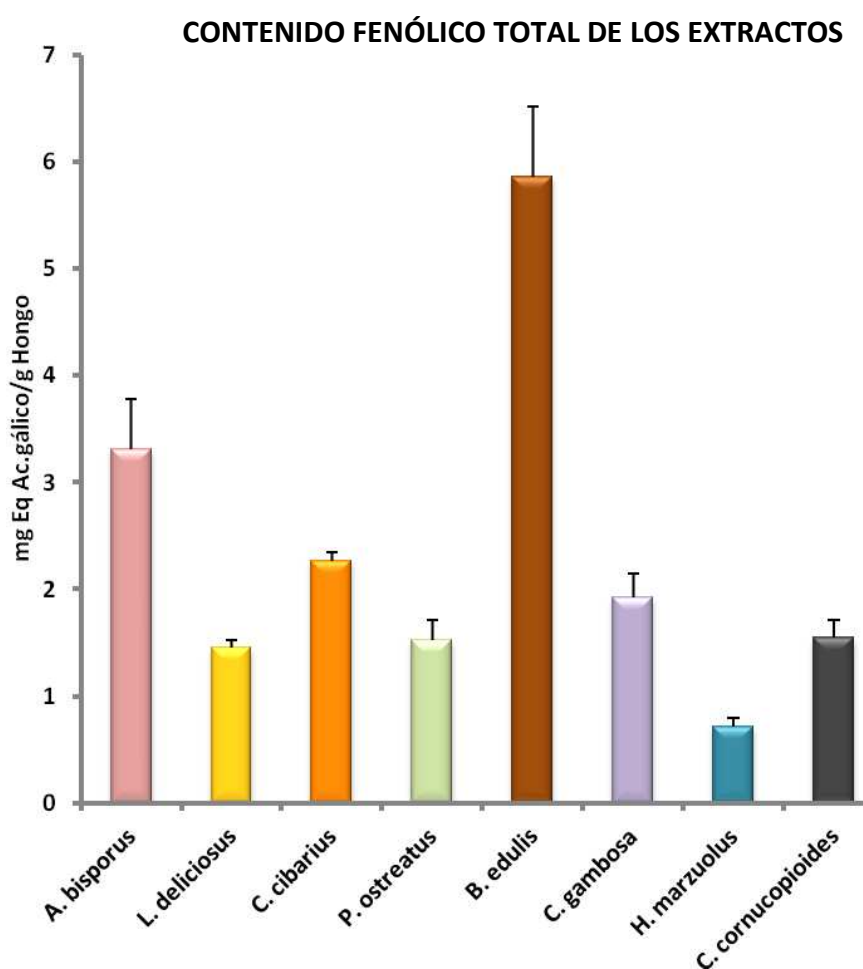


Figura 35. Contenido fenólico total de los extractos estudiados expresado en GAE/g. Se representa la media y la desviación estándar de 6 determinaciones

El contenido fenólico total de distintas especies de hongos ha sido evaluado en un gran número de trabajos. La mayor parte de ellos corresponden a especies cultivadas y medicinales, aunque en los últimos tiempos, el creciente interés por los hongos comestibles y su capacidad funcional ha llevado al estudio de una mayor variedad de hongos silvestres comestibles. Los resultados obtenidos por los distintos autores presentan una gran variabilidad incluso dentro de cada especie, no sólo debido a la variabilidad interlaboratorio de toda técnica, sino debido a factores que afectan al propio hongo. Además, la falta de uniformidad en la expresión de los resultados, dificulta enormemente la comparación entre diferentes trabajos. En la tabla 16 se muestran los resultados de algunos trabajos cuyos valores se expresaron en distintas unidades, lo que impide la comparación entre ellos.

Tabla 16- Contenidos fenólicos totales de *B. edulis*, *A. bisporus*, *C. cibarius*, *P. ostreatus* y *C. gambosa*, expresados en distintas unidades

HONGO	CONTENIDO FENÓLICO TOTAL	REFERENCIA
<i>B. edulis</i>	5,73 y 5,81 mg/g extracto	(Tsai, Tsai et al. 2007)
	18,96 GAE/100g extracto	(Vamanu and Nita 2013)
	10,19mg/g extracto	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)
<i>A. bisporus</i>	4,49 GAE/g extracto	(Barros, Cruz et al. 2008)
	23,34 y 37,33 GAE/g extracto	(Reis, Martins et al. 2012)
	$4,32 \times 10^{-3}$ y $4,69 \times 10^{-3}$ mg/g MS	(Mattila, Konko et al. 2001)
	0,54 mg/g MS	(Kim, Seguin et al. 2008)
	0,03 mg/g MS	(Barros, Falcao et al. 2008) (Barros, Correia et al. 2008) (Barros, Baptista et al. 2007c)
<i>C. cibarius</i>	2 mg/g extracto	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006) (Barros, Venturini et al. 2008) (Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi 2005)

Tabla 16. Continuación

	7,80 x 10 ⁻³ a 2,54 x 10 ⁻³ mg/g MS	(Mau, Lin et al. 2002), (Valentao, Andrade et al. 2005) (Barros, Dueñas et al. 2009)
	49,8 mg/g	(Kozarski, Klaus et al. 2015)
<i>L. deliciosus</i>	7,32 GAE/g extracto	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)
	17,12 mg GAE/g extracto	(Ferreira, Baptista et al. 2007)
<i>P. ostreatus</i>	0,71 mg/g MS	(Jayakumar, Thomas et al. 2009)
	0,09 mg/g MS	(Kim, Seguin et al. 2008)
	0,49 mg Catequina/g MF	(Pogoń, Jaworska et al. 2013)
	0,02 mg/g MS	(Barros, Baptista et al. 2007c) (Barros, Dueñas et al. 2009) (Valentao, Lopes et al. 2005)
<i>C. gambosa</i>	45,02 mg/Kg MS	(Vaz, Barros et al. 2011)

En el presente trabajo, el mayor contenido de compuestos fenólicos se encontró en los extractos de *B. edulis* (5,862 GAE/g). Otros trabajos con la misma especie muestran gran variabilidad en los resultados; desde valores muy superiores como 12,776 GAE/g (Keleş, Koca et al. 2011) a otros casos en los que no se encontraron compuestos fenólicos (Barros, Cruz et al. 2008) (Ferreira, Baptista et al. 2007).

Respecto al contenido de compuestos fenólicos totales en el extracto metanólico de *A. bisporus* (3,314 GAE/g), aunque inferior, se acercó al valor obtenido por Ali Keleş et al. (4,02 GAE/g) (Keleş, Koca et al. 2011). Igualmente existen trabajos donde este tipo de compuestos ni siquiera se detectaron (Jaworska, Bernas et al. 2008) (Elmastas, Isildak et al. 2007).

El valor del contenido fenólico total para *C. cibarius* fue 2,262 GAE/g, lo que concuerda con el trabajo de Barros et al. (Barros, Venturini et al. 2008), cuyo valor fue muy cercano (1,75 GAE/g).

L. deliciosus reveló un contenido de compuestos fenólicos de 1,447 GAE/g. Este resultado, aunque inferior, se acercó al obtenido por Keleş et al. (Keleş, Koca et al. 2011) (2,709 GAE/g).

El contenido de compuestos fenólicos total del extracto metanólico de *P. ostreatus* fue 1,529 mg GAE/g, lo cual concuerda con la investigación de Oyetayo et al. (Oyetayo and Ariyo 2013) en la que obtuvieron un rango de valores entre 0,89-2,63 GAE/g. Otros trabajos presentaron contenidos de compuestos fenólicos totales superiores al nuestro: 2,687 (Keleş, Koca et al. 2011) y 7,986 GAE/g (Yim, Chye et al. 2009), mientras que otros por el contrario, no detectaron compuestos fenólicos (Elmastas, Isildak et al. 2007) (Yang, Lin et al. 2002) (Mattila, Konko et al. 2001).

En el caso de *C. cornucopioides* se obtuvo un contenido total de compuestos fenólicos de 1,552 mg GAE/g, siendo esta la primera vez que se registraba este tipo de compuestos en dicha especie de hongo. Barros et al. (Barros, Cruz et al. 2008) también estudiaron el contenido fenólico de *C. cornucopioides*, pero no hallaron presencia de estos compuestos.

En la especie *C. gambosa* se encontró un contenido de compuestos fenólicos total de 1,920 mg GAE/g. Comparando este resultado con trabajos anteriores, observamos que el contenido fenólico total registrado fue inexistente (Barros, Cruz et al. 2008), por lo que el presente es el primer trabajo que documenta la existencia de compuestos fenólicos en dicha especie.

Finalmente, el extracto metanólico de *H. marzuolus*, fue el que menor contenido fenólico total presentó de las 8 especies valoradas: 0,712 GAE/g. Sin embargo, en la bibliografía no consta ningún dato al respecto. De manera que puede afirmarse que ésta es la primera vez que se realiza este tipo de estudio en la especie *H. marzuolus*, así como la primera vez que se documenta la existencia de compuestos fenólicos en dicha especie.

La gran variabilidad de resultados encontrada en los distintos estudios se puede explicar no sólo por la variedad de métodos de extracción empleados, las condiciones bajo las que se hayan llevado los procesos de recolección, transporte,

almacenamiento, etc. así como aquellas variables que están sujetas a los diferentes análisis a los que se someten las muestras; sino también por otros factores que afectan a la propia composición del hongo. En concreto, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, de manera que su producción está directamente influenciada por las condiciones de desarrollo y crecimiento del hongo. Factores como temperatura, humedad, composición del sustrato, etc. determinan en cierta medida su composición (Carneiro, Ferreira et al. 2013) (Ouzouni, Petridis et al. 2009). Esta variabilidad, que en el caso de hongos cultivados puede estar más reducida puesto que se desarrollan en condiciones controladas, afecta de manera especial a las especies silvestres, en las que dichos factores no sólo cambian en función de la procedencia de la especie sino que también pueden variar enormemente de una temporada de recolección a otra.

IV.1.2. Caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los extractos

La caracterización de los compuestos fenólicos presentes en los distintos extractos de hongos comestibles se realizó en el laboratorio de la Dra. Villares (Centro para la Calidad de los Alimentos-INIA), mediante técnica de HPLC. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos se identificaron por comparación del espectro de absorción y los tiempos de retención con los estándares correspondientes. En las especies de hongos comestibles evaluadas se identificaron varios tipos de compuestos pertenecientes a cuatro grandes grupos de compuestos fenólicos: derivados del ac. cinámico, derivados del ac. hidroxibenzoico, flavonoides y fenoles.

La fig. 36A muestra un cromatograma típico de compuestos fenólicos, la figura 36B, un cromatograma representativo de *C. cornucopioides*, recogidos ambos a 280 nm.

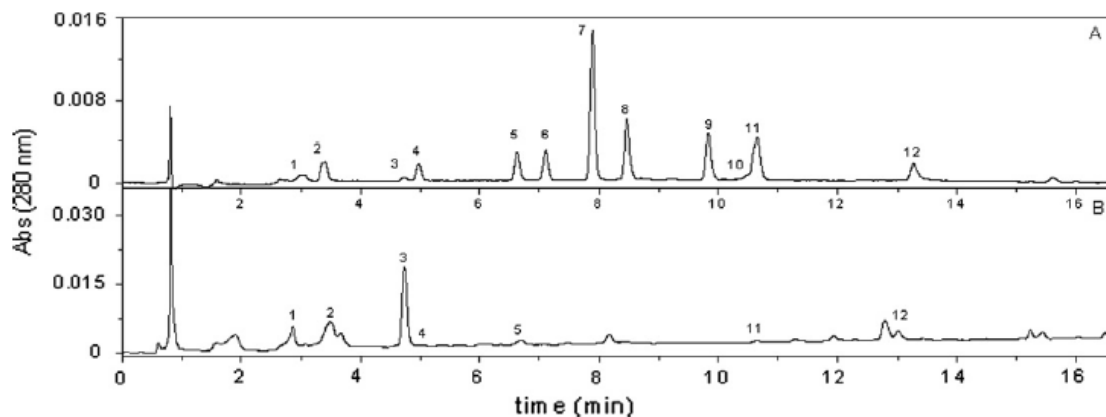


Fig 36.- Ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC del análisis de compuestos fenólicos. A) mezcla de estándares de compuestos fenólicos. B) extracto metanólico de *C. cornucopioides*. Los distintos compuestos se representan con números: 1, pirogalol; 2, ac. gálico; 3, ac. homogentísico; 4, ac. protocatéuico; 5, ac. p-hidroxibenzoico; 6, catequina; 7, ac. clorogénico; 8, ac. caféico; 9, ac. p-cumárico; 10, ac. gentísico; 11, ac. ferúlico; y 12, miricetina

La concentración de los distintos compuestos fenólicos encontrados en los extractos se determinó mediante HPLC y se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 17. Concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de 8 especies de hongos comestibles. Los resultados se expresan como ng de compuesto fenólico/mL de extracto y representan la media de n=6 determinaciones. Los valores de desviaciones estándar se representan entre paréntesis. n.d. Indica no detectado

	<i>A.bisporus</i>	<i>L.deliciosus</i>	<i>C.cibarius</i>	<i>P.ostreatus</i>	<i>B.edulis</i>	<i>C.gambosa</i>	<i>H.marzuolus</i>	<i>C.cornucopioides</i>
DERIVADOS DEL AC. CINÁMICO	53,01	44,82	13,36	15,655	39,375	46,24	9,64	7,015
Ácido Cafeico	7,77 (0,21)	7,755 (0,255)	8,17 (0,15)	n.d.	7,545 (0,535)	7,46 (0,01)	7,295 (0,035)	n.d.
Ácido Clorogénico	31,865 (0,37)	31,35 (0,105)	n.d.	n.d.	31,395 (0,35)	31,52 (0,31)	n.d.	n.d.
Ácido P-Cumárico	5,19 (0,05)	n.d.	n.d.	5,575 (0,425)	0,435 (0,005)	n.d.	2,345 (0,095)	n.d.
Ácido Ferúlico	8,185 (0,945)	5,715 (0,425)	5,19 (0,20)	10,08 (0,08)	n.d.	7,26 (0,275)	n.d.	7,015 (0,285)
DERIVADOS DEL AC. HIDROXIBENZOICO	1785,4	313,465	295,515	618,415	1378,655	2240,08	342,225	491,115
Ácido Gálico	47,45 (2,25)	81,21 (5,045)	80,915 (1,89)	145,17 (1,805)	106,48 (4,125)	56,62 (1,42)	82,6 (1,74)	59,39 (1,005)
Ácido Gentístico	n.d.	28,835 (0,945)	26,985 (0,655)	146,31 (1,71)	30,425 (1,985)	19,275 (1,25)	79,23 (1,24)	n.d.
Ácido P-Hidroxibenzoico	7,695 (0,355)	10,7 (0,82)	7,84 (0,515)	2,345 (0,795)	12,035 (0,445)	5,65 (0,165)	2,745 (0,24)	3,14 (0,135)
Ácido Homogentístico	1722,15 (7,935)	183,4 (3,955)	158,38 (4,73)	314,93 (0,77)	1145,485 (6,95)	2140,055 (3,515)	170,355 (1,585)	425,93 (4,885)
Ácido Protocatéuico	8,105 (2,39)	9,32 (0,16)	21,395 (0,71)	9,66 (0,42)	84,23 (2,8)	18,48 (1,27)	7,295 (0,40)	2,655 (0,125)
FLAVONOIDES	11,385	10,43	14,545	10,995	8,99	10,375	n.d.	17,955
Miricetina	11,13 (0,86)	10,43 (0,43)	11,635 (0,145)	10,995 (0,445)	8,99 (0,38)	10,375 (0,195)	n.d.	17,955 (0,49)
Catequina	0,255 (0,005)	n.d.	2,91 (0,37)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FENOLES	129,35	13,14	45,545	n.d.	n.d.	120,035	n.d.	46,17
Pirogalol	129,35 (1,975)	13,14 (0,15)	45,545 (0,415)	n.d.	n.d.	120,035 (1,69)	n.d.	46,17 (0,845)

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de ácido fenólicos como compuestos mayoritarios en los hongos estudiados, en consonancia con lo publicado por otros autores (Ferreira, Barros et al. 2009) (Karaman, Jovin et al. 2010), pero también se encontraron algunos flavonoides y otros fenoles como el pirogalol.

- **Ácidos fenólicos:**

Los ácidos fenólicos más extendidos fueron el ácido gálico, el ácido p-hidroxibenzoico y el ácido homogentísico, que fueron identificados en todos los extractos de las especies estudiadas, siendo este último el que estuvo presente en mayor cantidad en todos los casos.

El extracto de *C. gambosa* fue el que presentó un valor neto más alto de contenido de ac. fenólicos, mientras que *C. cibarius* fue el que menor contenido de ac. fenólicos mostró.

En total, se identificaron 9 tipos de ácidos fenólicos diferentes, 4 derivados del ácido cinámico: ac. caféico, ac. clorogénico, ac. p-cumárico y ac. ferúlico; y 5 derivados del ac. hidroxibenzoico: ac. gálico, ac. gentístico, ac. p-hidroxibenzoico, ac. homogentístico y ac. protocatéuico. Los extractos que contaron en su composición química con mayor variedad de ácidos fenólicos fueron los de *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *B. edulis* y *C. gambosa*, en los que se encontraron 8 de los 9 ácidos fenólicos identificados. El extracto de *C. cornucopioides* fue el que menor variedad de ácidos fenólicos presentó, ya que sólo contenía 5 tipos diferentes de ácidos fenólicos. El resto de extractos (*C. cibarius*, *P. ostreatus* e *H. marzuolus*) contaron con 7 tipos de ácidos fenólicos en su composición.

El ácido homogentísico fue el único ácido fenólico libre que estaba presente en cantidades significativas en todos los hongos, aunque previamente sólo había sido descrito en *P. ostreatus* (Tabla 17). El contenido varió considerablemente entre las distintas especies estudiadas. Así, *B. edulis*, *A. bisporus* y *C. gambosa* contenían entre 1.145,49 y 2.140,06 ng por mL de extracto (ng/mL), mientras que *C. cornucopioides*, *P. ostreatus*, *L. deliciosus*, *H. marzuolus* y *C. cibarius* presentaron menos de 500 ng/mL.

El ácido gálico estaba también presente en todos los hongos, aunque en menor concentración, siendo el segundo compuesto principal de los ácidos fenólicos en los hongos estudiados (47,45-145,17 ng/mL). La presencia de este compuesto en algunas de las especies estudiadas ha sido descrita también en ciertos trabajos.

Los ácidos protocatéuico e hidroxibenzoico estaban presentes en todos los hongos en una proporción similar (variando entre 2 y 21 ng/mL) excepto en *B. edulis*, donde el contenido de ácido protocatéuico fue considerablemente más alto (84,23 ng/mL). Todos los hongos excepto *A. bisporus* y *C. cornucopioides* contenían ácido gentísico, siendo *P. ostreatus* e *H. marzuolus* los que presentaron mayor contenido. El ácido clorogénico estuvo también presente en *A. bisporus*, *C. gambosa*, *B. edulis* y *L. deliciosus* en concentraciones similares (31,35-31,87 ng/mL). También se detectaron otros ácidos fenólicos como el caféico, cumárico y ferúlico.

No hay muchos estudios sobre los perfiles individuales de compuestos fenólicos en hongos comestibles. Los hongos cultivados, en general, están más estudiados, mientras que para los silvestres los datos son más escasos y en algunos casos como *C. cornucopioides*, *C. gambosa* y *H. marzuolus* la composición fenólica no ha sido descrita. La siguiente tabla resume los ácidos fenólicos descritos por otros autores en las distintas especies de hongos estudiados.

Tabla 18. Ácidos fenólicos encontrados en *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius*, *P. ostreatus* y *B. edulis*, documentados en otros trabajos

	<i>A.bisporus</i>	<i>L.deliciosus</i>	<i>C.cibarius</i>	<i>P.ostreatus</i>	<i>B.edulis</i>
Ácido caféico			+		+
			(Valentao, Andrade et al. 2005) (Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)		(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)
Ácido p-cumárico	+		+	+	+
	(Glamoclija, Stojkovic et al. 2015) (Reis, Martins et al. 2012)		(Valentao, Andrade et al. 2005) (Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)	(Glamoclija, Stojkovic et al. 2015) (Reis, Martins et al. 2012)	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)
Ácido ferúlico		+	+	+	
		(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	
Ácido gentístico		+			
		(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)			
Ácido p-hidroxibenzoico	+		+	+	+
	(Mattila, Konko et al. 2001)		(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	(Reis, Martins et al. 2012) (Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)
Ácido homogentístico				+	
				(Kim, Seguin et al. 2008)	
Ácido protocatéuico	+	+	+	+	+
	(Mattila, Konko et al. 2001) (Kim, Seguin et al. 2008)	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	(Kim, Seguin et al. 2008)	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)
Ácido gálico	+	+	+	+	
	(Kim, Seguin et al. 2008) (Reis, Martins et al. 2012) (Glamoclija, Stojkovic et al. 2015)	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)	(Puttaraju, Upparahalli et al. 2006)	(Kim, Seguin et al. 2008)	

Por el contrario, algunos ácidos fenólicos que en este trabajo no se detectaron se han descrito, recientemente, en algunas de las especies estudiadas.

Tabla 19. Otros ácidos fenólicos documentados en las especies de hongos comestibles *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius*, *P. ostreatus* y *B. edulis*

	<i>A.bisporus</i>	<i>L .deliciosus</i>	<i>C.cibarius</i>	<i>P.ostreatus</i>	<i>B .edulis</i>
Ácido cinámico	+	+	+	+	
	(Barros, Dueñas et al. 2009) (Mattila, Konko et al. 2001) (Reis, Martins et al. 2012) (Glamoclija, Stojkovic et al. 2015)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013) (Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013)	(Barros, Dueñas et al. 2009) (Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	(Barros, Dueñas et al. 2009) (Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	
Ácido sinápico		+	+	+	
		(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)	
Ácido vanílico		+	+		
		(Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013)	(Muszynska, Sulkowska-Ziaja et al. 2013)		
Ácido rosmarínico					+
					(Vamanu and Nita 2013)
Ácido p-hidroxifenilacético		+			
		(Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013)			
Ácido 3-4-dihidroxifenilacético		+			
		(Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013)			
Ácido siríngico		+			
		(Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013)			

Además, el presente trabajo muestra por primera vez la presencia de otros ac. fenólicos en determinadas especies de hongos comestibles como: ac. clorogénico en *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *B. edulis* y *C. gambosa*; y ac. gentísico en *C. cibarius*, *P. ostreatus*, *B. edulis*, *C. gambosa* e *H. marzuolus*. Anteriormente sólo habían sido descritos el ac. clorogénico en *P. ostreatus*, y el ac. gentístico en *L. deliciosus* (Kim, Seguin et al. 2008) (Puttaraju, Upparahalli et al. 2006).

Por otro lado, es la primera vez que se realiza la caracterización de los ácidos fenólicos presentes en los extractos de especies de hongos como *C. gambosa*, *H. marzuolus* y *C. cornucopioides* nunca antes descritas.

- **Flavonoides:**

Se identificaron dos tipos diferentes de flavonoides: la miricetina y la catequina. La miricetina se encontró en todos los extractos salvo en el de *H. marzuolus*, siendo el extracto de *C. cornucopioides* el que mayor cantidad presentó: 17,96 ng/mL, y el de *B. edulis* el menor 8,99 ng/mL. La catequina, por su parte, sólo se halló en los extractos de *C. cibarius* y *A. bisporus*, en cantidades de 2,91 ng/mL y 0,255 ng/mL, respectivamente. *A. bisporus* y *C. cibarius* poseen los 2 tipos de flavonoides identificados, mientras que de *H. marzuolus*, no cuenta con ninguno de los flavonoides.

Diversos trabajos han descrito la presencia de flavonoides en extractos de distintas especies de hongos comestibles (Robaszkiewicz, Bartosz et al. 2010) (Barros, Cruz et al. 2008) (Yim, Chye et al. 2009) (Vamanu and Nita 2013) (Pogoń, Jaworska et al. 2013). Entre ellos, la miricetina se ha identificado en *A. bisporus* y *P. ostreatus* (Kim, Seguin et al. 2008). Por el contrario, aunque la presencia de catequina se detectó en otra especie del género *Agaricus* (*A. blazei*), no se identificó en ninguna de las especies que se estudian en este trabajo (Kim, Seguin et al. 2008).

Además se han descrito otros flavonoides diferentes a los encontrados en este trabajo: camferol en *L. deliciosus* (Kalogeropoulos, Yanni et al. 2013); rutina en *C. cibarius* (Valentao, Andrade et al. 2005) y en *P. ostreatus* (Jayakumar, Thomas et al. 2009); crisina en *L. deliciosus* (Kalogeropoulos et al., 2013) y *P. ostreatus* (Jayakumar, Thomas et al. 2009); o naringina en *A. bisporus* y *P. ostreatus* (Kim, Seguin et al. 2008).

- **Otros fenoles:**

Además de los compuestos descritos hasta ahora, en 5 de las 8 especies estudiadas (todas excepto en *P. ostreatus*, *B. edulis* e *H. marzuolus*) se identificó otro compuesto, el pirogalol. El extracto de *A. bisporus* fue el que contó con un mayor contenido en pirogalol (129,35 ng/mL) y el de *L. deliciosus*, el menor (13,14 ng/mL).

En otros trabajos también se ha descrito la presencia de pirogalol en especies como *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius* (Dugler, Gonuz et al. 2004) (Witkowska, Zujko et al. 2011) (Kim, Seguin et al. 2008).

La variabilidad de resultados observada entre distintos trabajos sobre la composición fenólica de las distintas especies de hongos se puede explicar por la diversidad de procedencias de los hongos utilizados. Como se ha comentado anteriormente la producción de metabolitos secundarios como son los compuestos fenólicos está directamente influenciada por las condiciones de desarrollo y crecimiento de los hongos (Carneiro, Ferreira et al. 2013). Además, hay que añadir las condiciones bajo las que se hayan llevado los procesos de recolección, transporte, almacenamiento, etc. así como aquellas variables a las que están sujetas los diferentes análisis a los que se someten las muestras desde los métodos de extracción, hasta los de detección (Ouzouni, Petridis et al. 2009).

En este trabajo, por tanto se han caracterizado a nivel de composición fenólica, los extractos que serán objeto de estudio, con el fin de intentar establecer relaciones entre composición y actividad. En algunas especies se ha detectado la presencia de compuestos que no se habían descrito hasta ahora y en otras, se ha caracterizado por primera vez su composición fenólica como es el caso de *C. cornucopioides*, *H. marzuolus* y *C. gambosa*.

IV.1.3. Capacidad antioxidante de los extractos

La formación de radicales libres es un proceso que ocurre de forma natural como consecuencia del metabolismo de las células aeróbicas, puesto que la oxidación es necesaria para los procesos fisiológicos de muchos organismos vivos. El consumo de oxígeno por parte de esas células conlleva a la formación de una serie de radicales libres, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera que una producción excesiva de dichas moléculas puede ocasionar un daño oxidativo, lo cual está implicado en procesos patológicos como envejecimiento celular, enfermedades cardiovasculares, diabetes, inflamación o cáncer (Ames, Shigenaga et al. 1993). Además, la interacción de estas especies con moléculas de naturaleza lipídica produce nuevos radicales como hidroxiperóxidos o peróxidos que a su vez, pueden interactuar de modo citotóxico con variedad de sistemas biológicos.

Los antioxidantes, bien sean de origen natural o sintético, pueden ayudar al organismo a reducir el daño oxidativo que las ROS producen. Sin embargo, recientemente se sospecha que los antioxidantes sintéticos como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutil hidroquinona (TBHQ) y propil galato (PG) cuentan con efectos carcinogénicos (Zhang, Li et al. 2009). De manera, que el empleo de antioxidantes naturales es mucho más recomendable que el de los sintéticos. Por ello, existe actualmente una continua búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes efectivos que provengan de fuentes naturales.

Con el fin de estudiar el poder antioxidante de los extractos metanólicos de hongos comestibles se valoró la capacidad de absorción de radicales de oxígeno de los mismos, mediante el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 37, expresados en μmol equivalentes de Trolox/g de extracto ($\mu\text{mol TE/g}$). Todos los extractos estudiados presentaron cierta capacidad antioxidante, siendo *H. marzuolus* y *P. ostreatus* los que mostraron los resultados más bajos (5,701 y 8,651 $\mu\text{mol TE/g}$, respectivamente). *C. gambosa*, *B. edulis* y *C. cornucopioides* fueron las especies con mayor capacidad antioxidante

(20,942, 24,269 y 24,406 $\mu\text{mol TE/g}$, respectivamente), mientras que para *C. cibarius*, *A. bisporus* y *L. deliciosus*, se obtuvieron valores intermedios (19,592, 16,379 y 12,852 $\mu\text{mol TE/g}$, respectivamente).

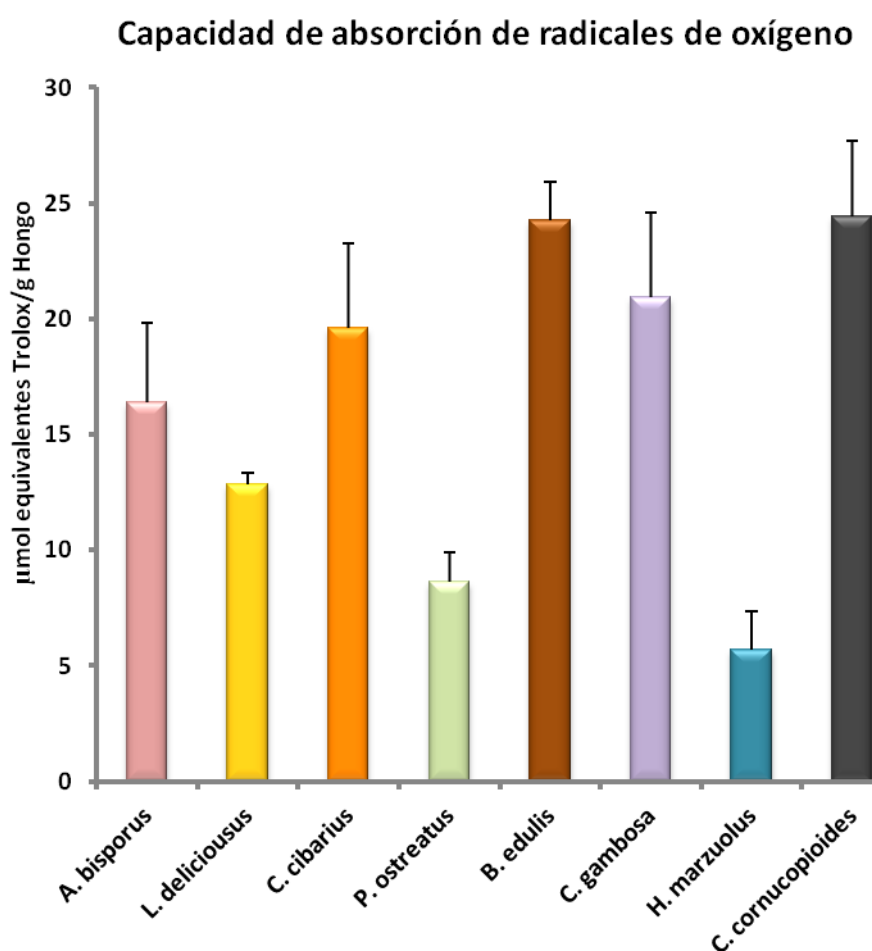


Figura 37. Capacidad antioxidante de los extractos estudiados expresado en $\mu\text{mol TE/g}$. Se representa la media y la desviación estándar de 6 determinaciones

Los trabajos sobre la actividad antioxidante de los hongos que emplean el método ORAC son escasos, no existiendo ningún otro precedente para las especies estudiadas en este trabajo. Bang et al. (Bang, Suhara et al. 2014), realizaron un estudio sobre la actividad antioxidante de los extractos etanólicos y acuosos de 29 especies de

hongos diferentes recogidas en Nepal. En todos los casos obtuvieron valores muy superiores a los que aquí se presentan, aunque las especies estudiadas fueron diferentes. Así, los valores oscilaron entre un mínimo de 342,8 y un máximo de 21015,4 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto para los extractos etanólicos; y un mínimo de 83,2 y un máximo de 1196,9 $\mu\text{mol TE/g}$ extracto para los extractos acuosos. Han et al. (Han, Lee et al. 2014) por su parte, al estudiar la capacidad antioxidante media por el método ORAC de 10 grupos de alimentos diferentes, obtuvieron para los hongos un valor: 331,6 $\mu\text{mol TE/g}$. En todos los casos los valores obtenidos fueron muy superiores a los nuestros, pero el hecho de que se trata de otras especies, con otras procedencias, otro tipo de extractos y que los resultados se expresan por g de extracto en lugar de g de hongo, como en nuestro caso, podrían justificar tales discrepancias.

Los organismos poseen mecanismos de defensa intrínsecos para combatir los radicales libres: superóxido dismutasa, catalasa y peróxido de glutatión. Sin embargo podría considerarse que existe otro mecanismo de defensa frente a los radicales libres adoptado por numerosos organismos: la ingesta de antioxidantes exógenos (Mayakrishnan, Abdullah et al. 2013). Los antioxidantes de la dieta mediante el secuestro de los radicales libres, previenen el daño que éstos son capaces de ocasionar, y protegen de este modo al organismo frente a diversas enfermedades importantes como cáncer, enfermedades cardiovasculares, disminución del sistema inmunológico, disfunción cerebral y cataratas (Ames, Shigenaga et al. 1993). De hecho, se ha demostrado que un consumo diario de alimentos ricos en antioxidantes, como frutas, verduras y sus derivados, está asociado a un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Diplock, Charleux et al. 1998) (Hu 2002).

Los hongos, recientemente, también han sido reconocidos como fuente de antioxidantes, puesto que poseen metabolitos secundarios capaces de proteger frente al daño oxidativo (Ferreira, Barros et al. 2009). Entre estos compuestos destacan los compuestos fenólicos: tanto los ácidos fenólicos, como los flavonoides y otros fenoles,

han demostrado tener una importante actividad antioxidante (Sroka and Cisowski 2003).

IV.1.4. Relación entre composición fenólica de los extractos y capacidad antioxidante

Algunos trabajos han demostrado que la actividad antioxidante de algunos hongos es debida en gran parte a sus compuestos fenólicos (Patthamakanokporn, Puwastien et al. 2008) (Barros, Ferreira et al. 2007), existiendo una correlación entre contenido fenólico y actividad (Thaipong, Boonprakob et al. 2006) (Cheung, Cheung et al. 2003).

En el presente trabajo no se encontró correlación entre el contenido fenólico total de los extractos procedentes de distintas especies de hongos y su capacidad antioxidante, medida por el método ORAC, como se muestra en la figura 38.

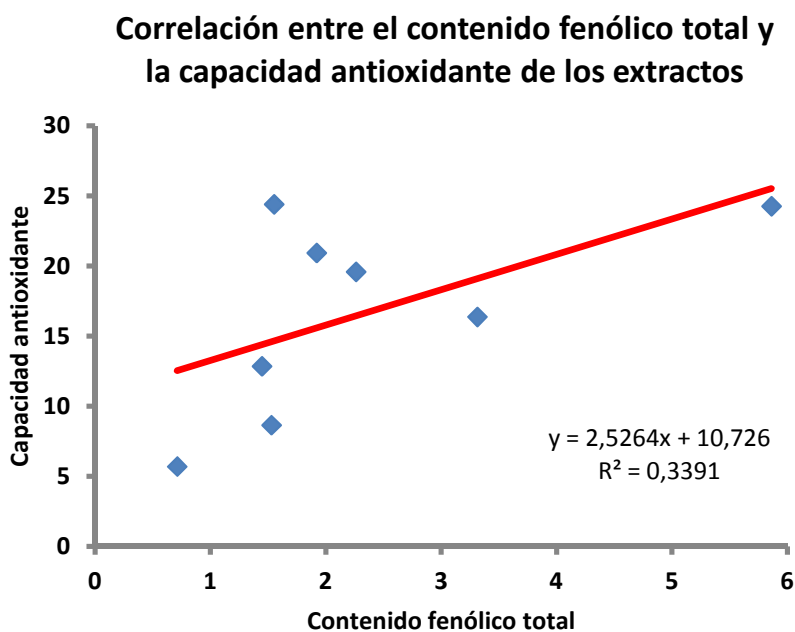


Figura 38. Correlación entre el contenido fenólico total de los extractos metanólicos de hongos comestibles expresado GAE/g y la capacidad antioxidante de los mismos expresada en µmol TE/g

El estudio de los parámetros valor P (valor de significación) y coeficiente de correlación de Pearson (r) reveló que, aunque existía una cierta relación positiva entre ambas variables ($r=0,582$), ésta no es estadísticamente significativa ($P=0,130$).

Existen numerosos trabajos que ponen de manifiesto una fuerte correlación entre los contenidos de compuestos fenólicos de extractos y la actividad antioxidante de los mismos (Barros, Ferreira et al. 2007) (Athanasakis, Aligiannis et al. 2013) (Li, Lee et al. 2014) (Kosanic, Rankovic et al. 2012) (Bang, Suhara et al. 2014), aunque también hay un buen número de investigaciones en las que dicha correlación es moderada (Lee, Huang et al. 2007) o inexistente (Tan, Baskaran et al. 2015) (Tsai, Mau et al. 2014) (Phan, David et al. 2014).

Estas discrepancias pueden ser explicadas por la diversidad de métodos existentes para la valoración de la capacidad antioxidante. Los mecanismos de acción por los que las sustancias antioxidantes ejercen sus efectos son variados: interacción directa con especies reactivas, prevención de la formación enzimática de especies reactivas, prevención de la formación de especies reactivas dependientes de metales (como agentes quelantes), y activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes (Balsano and Alisi 2009), por lo que el valorar la actividad por un solo método no siempre es un reflejo de la actividad antioxidante total de un material (Carvajal, Koehnlein et al. 2012) (Glamoclija, Stojkovic et al. 2015). En este trabajo en concreto se ha medido la capacidad de absorción del radical de oxígeno de los distintos extractos, pero los compuestos fenólicos pueden actuar a través de otros mecanismos que aumenten la capacidad antioxidante en mayor o menor medida. Por otro lado, los extractos metanólicos obtenidos, tienen un variado perfil fenólico. Los compuestos fenólicos individuales presentes en los mismos, podrían mostrar efectos antioxidantes marcadamente diferentes, y la contribución de cada uno de ellos a la capacidad antioxidante total puede ser variable.

Con el fin de ahondar en la posible influencia que los distintos grupos de compuestos fenólicos de los extractos pudieran ejercer sobre la capacidad

antioxidante de los mismos, se estudiaron las correlaciones entre los derivados del ácido cinámico, derivados del ácido hidroxibenzoico, flavonoides y fenoles (pirogalol), y la capacidad antioxidante, valorada como capacidad para secuestrar radicales de oxígeno.

Tabla 20. Correlación entre la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de hongos comestibles y sus diferentes tipos de componentes. P representa el valor de significación y r el coeficiente de correlación de Pearson

		DERIVADOS AC CINÁMICO	DERIVADOS AC HIDROXIBENZOICO	FLAVONOIDES	PIROGALOL
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	P	0,212	0,885	0,507	0,974
	r	-0,596	0,077	0,342	0,026

Como se observa en la tabla 20, no se encontró correlación entre los parámetros estudiados, aunque en algún caso había una cierta relación positiva (flavonoides, $r=0,342$), no se alcanzó en ninguno una significación estadística

Los componentes bioactivos individuales presentan la capacidad de cambiar sus propiedades en presencia de otros compuestos, como resultado de sinergismos, antagonismos, co-antioxidación o la presencia de retardadores de oxidación (Becker, Nissen et al. 2004), de manera que la ausencia de correlación en este caso, podría deberse a este tipo de interacciones entre los distintos compuestos presentes en los extractos. De hecho, los beneficios de una dieta rica en frutas y verduras se atribuyen a sinergismos de sus fitoquímicos, de modo que las complejas mezclas de estos que se dan en el alimento completo, serían los responsables de las potentes propiedades bioactivas de los mismos (Liu 2003).

IV.2. VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS

IV.2.1. Efecto antiinflamatorio en la línea celular RAW 264.7

Se estudió la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos, obtenidos a partir de distintas especies de hongos comestibles, en la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7.

En primer lugar para determinar la concentración de trabajo, se valoró el potencial efecto citotóxico sobre la línea celular de distintas concentraciones de los extractos: 0,5; 1 y 2 mg extracto/mL. Estas concentraciones se usaron para todos los hongos estudiados, excepto para *C. cornucopioides*, cuyo extracto a concentraciones de 1 y 2 mg/mL resultó poseer una tonalidad cromática demasiado oscura que interfería en las valoraciones colorimétricas. Por ello, en este caso, las concentraciones ensayadas fueron inferiores (0,12; 0,25 y 0,5 mg extracto/mL).

IV.2.1.1. Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular RAW 264.7 se examinó mediante el ensayo de MTT, que refleja la actividad mitocondrial de las células vivas. El porcentaje de viabilidad celular tras el tratamiento con los distintos extractos se determinó con respecto a las células estimuladas con LPS sin tratamiento previo, valor que se tomó como 100% de viabilidad. Como se muestra en las gráficas, la única concentración de extracto que no produjo efecto tóxico sobre las células en todos los casos, fue 0,5 mg/mL.

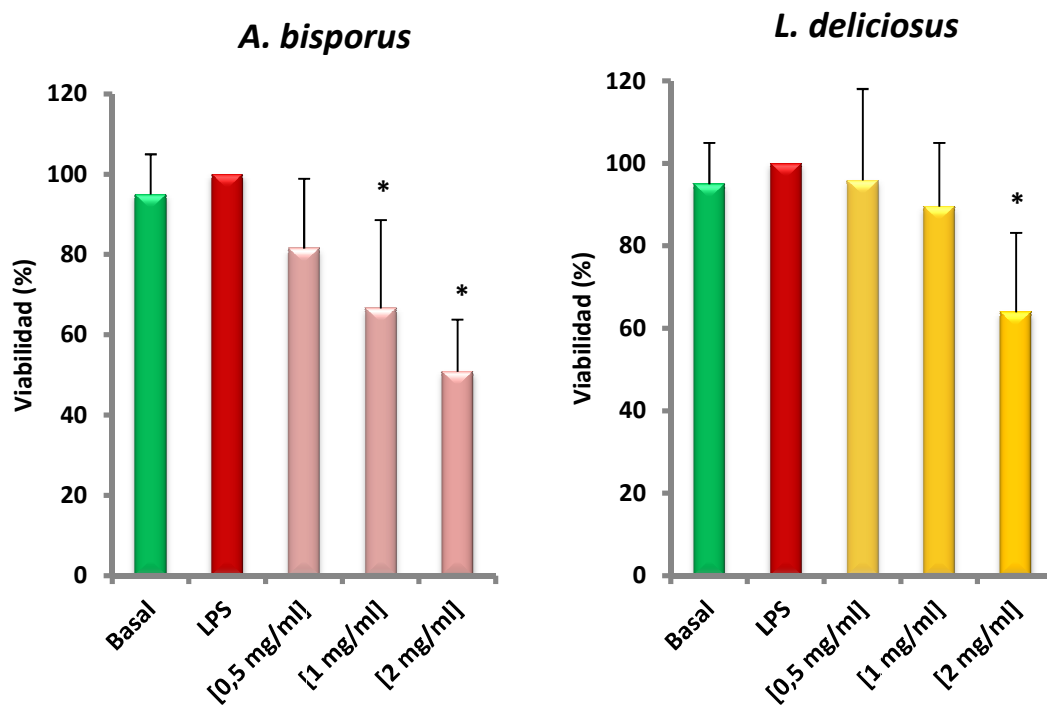


Figura 39. Efecto de la citotoxicidad de las distintas concentraciones de los extractos: *A. bisporus* y *L. deliciosus* sobre la línea celular RAW 264.7, evaluada mediante el método MTT. El valor de las células expuestas a LPS se consideró como referencia (viabilidad 100%). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de al menos 3 experimentos diferentes ejecutados por triplicado. * Señala significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

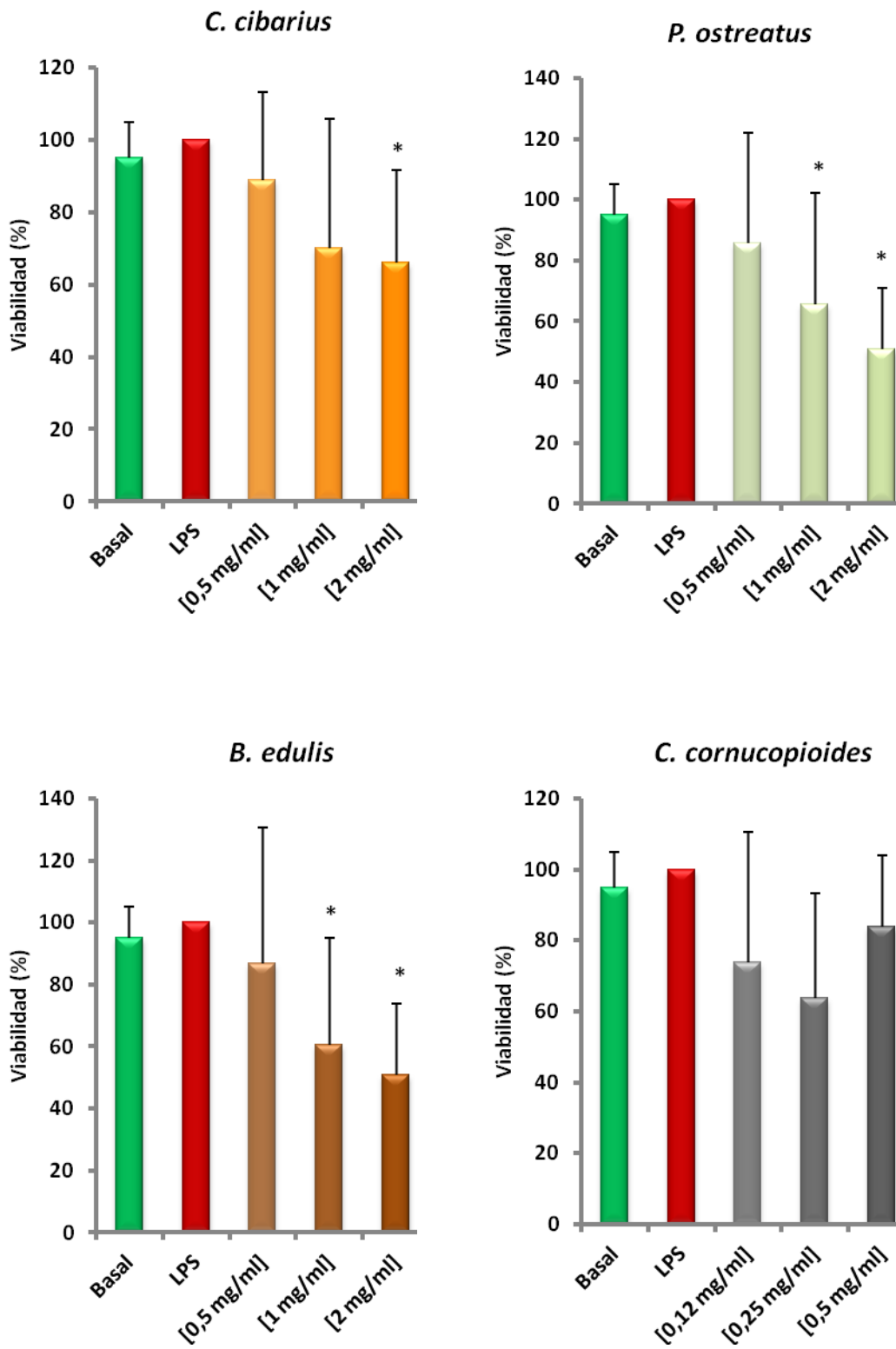


Figura 39 Continuación. Extractos de *C. cibarius*, *P. ostreatus*, *B. edulis* y *C. cornucopioides*

Puesto que la concentración de 0,5 mg/mL fue la única que no producía citotoxicidad en todas las especies estudiadas, se eligió como concentración de trabajo para los posteriores experimentos.

IV.2.1.2. Efecto de los extractos sobre la producción de NO

Durante los procesos inflamatorios se produce una sobreproducción de NO como consecuencia de la inducción de la enzima iNOS en distintos tipos celulares, sobre todo en macrófagos. Para valorar el efecto de los distintos extractos de hongos sobre la producción de NO inducida por LPS en macrófagos RAW 264.7, se determinó la concentración de nitritos (metabolito estable del óxido nítrico) acumulados en el sobrenadante del cultivo celular por la técnica de Griess, como índice de la síntesis de NO.

Como muestra la figura 40, la producción de NO en células no estimuladas con LPS (Basal) fue indetectable. La activación de los macrófagos con LPS (1 µg/mL durante 24 horas) causó una elevada producción de NO que fue tomada como valor de referencia (100% producción de NO). El pretratamiento de las células con los extractos (0,5 mg/mL), una hora antes de la estimulación con LPS indujo una reducción en la producción de NO, en el caso de determinados extractos.

Los extractos de *P. ostreatus* y *B. edulis* no tuvieron un efecto significativo sobre la producción de NO, mientras que el resto tuvieron un efecto inhibitorio que varió de unas especies a otras. *C. cibarius* presentó un potente efecto inhibitorio de la producción de NO en las células estimuladas con LPS (71% inhibición), mientras que *A. bisporus*, *L. deliciosus*, y *C. cornucopioides* presentaron un efecto moderado: 31%, 37% y 46 % de inhibición, respectivamente.

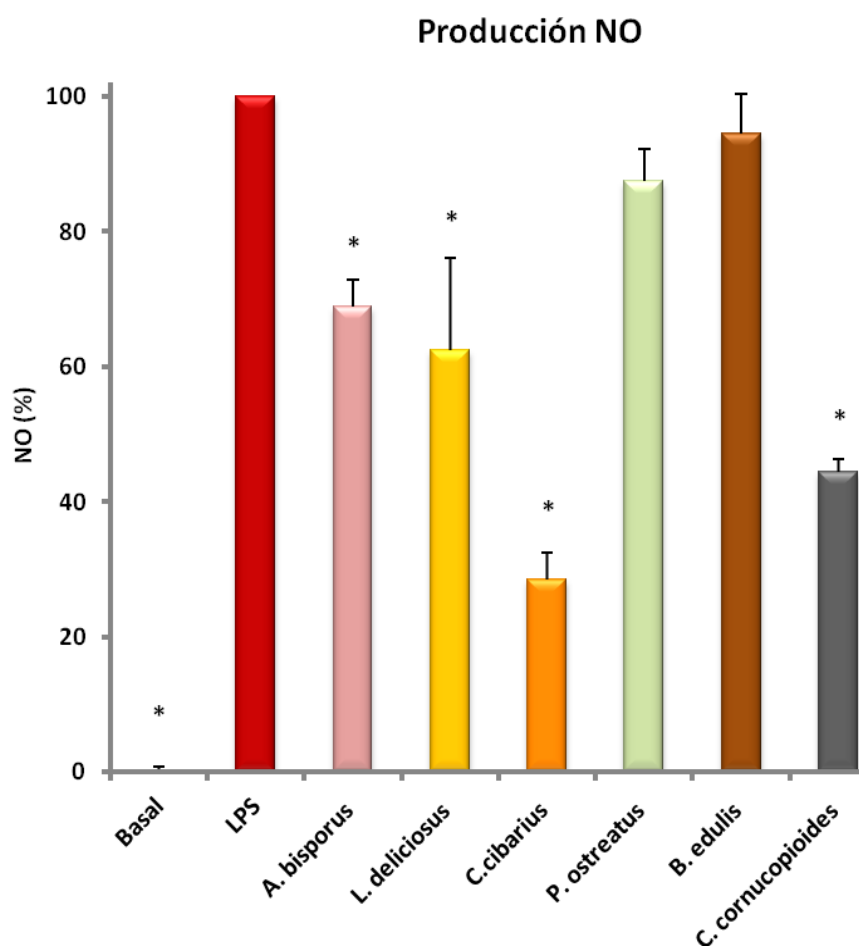


Figura 40. Producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y pretratadas con distintos extractos de hongos. Los resultados se expresan como % de producción de NO respecto a las células estimuladas por LPS (100%) y se presentan como medias y errores estándar de un mínimo de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

IV.2.1.3. Efecto de los extractos sobre la expresión de genes proinflamatorios

Efecto de los extractos sobre la expresión de iNOS

Para determinar si la inhibición de la producción de NO observada en los macrófagos estimulados y tratados con los extractos de hongos era debida a un efecto a nivel transcripcional, se valoró en las células tratadas la expresión del gen de la enzima inducible iNOS. Para ello se incubaron los macrófagos con los extractos durante 1 hora y después se estimularon con LPS 6 horas más. La valoración de la expresión de los ARNm se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa de la expresión por PCR cuantitativa a tiempo real.

La estimulación con LPS indujo una elevada expresión de iNOS con respecto a la situación basal de células no estimuladas. El tratamiento de pre-incubación de 1 hora de macrófagos RAW 264.7 con los extractos (0,5 mg/mL) indujo, en ciertos casos, una inhibición de la expresión del gen iNOS estimulada con LPS.

Como se muestra en la figura 41, la expresión génica de iNOS disminuyó significativamente para el caso de las células tratadas con cuatro extractos: *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius* y *C. cornucopioides*. Quedó reducida a un 52% en el caso del extracto de *A. bisporus*, y un 45% en el de *L. deliciosus*. Los extractos de *C. cornucopioides* y *C. cibarius*, por su parte, indujeron las mayores reducciones en la expresión de iNOS, siendo ésta de 21% en el caso de *C. cornucopioides* y de 19% para el extracto de *C. cibarius*. Los extractos de *P. ostreatus* y *B. edulis* no tuvieron efecto en la expresión del gen iNOS.

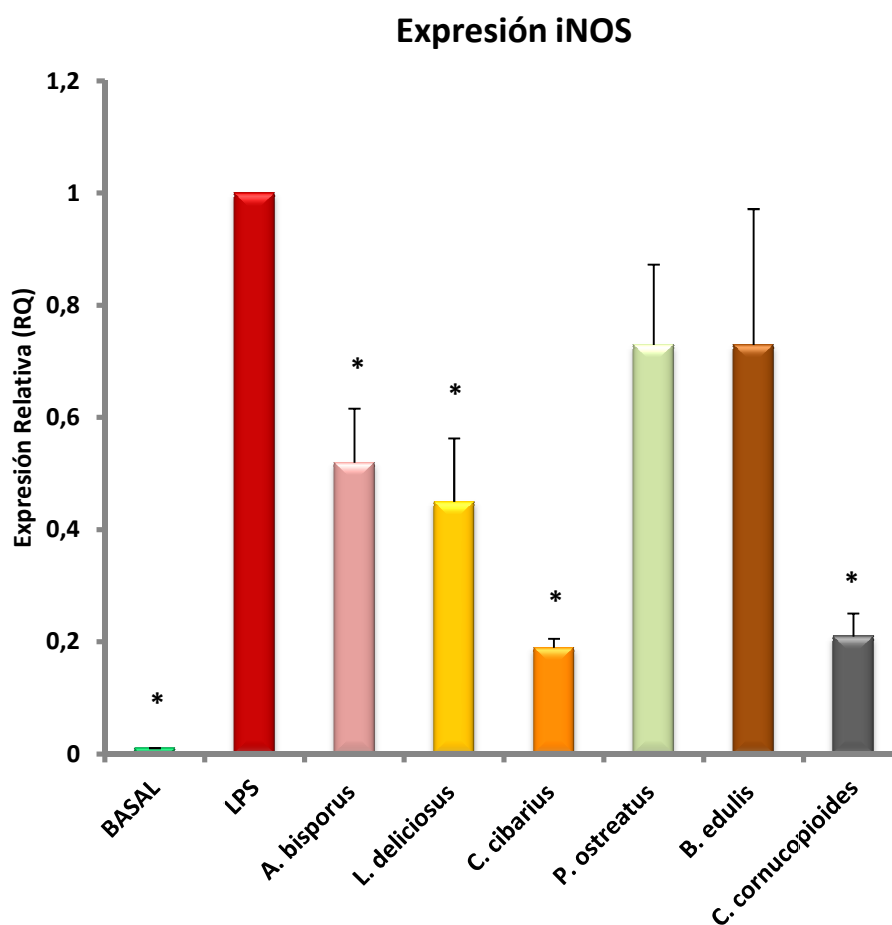


Figura 41. Efecto de los extractos metanólicos de hongos comestibles sobre la expresión de iNOS en células RAW 264.7 activadas con LPS. Los resultados se expresan como expresión relativa de cada muestra en función de la muestra de referencia (LPS). Los valores representan las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

* Señala significación estadística ($p < 0,05$) respecto al grupo tratado sólo con LPS

Los macrófagos activados, secretan diversos mediadores inflamatorios. Además de NO, producen interleuquinas como IL-1 β e IL-6, entre otras, TNF- α , prostaglandina E₂ (PGE₂), y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Laskin, Sunil et al. 2011).

Para ver si el efecto de los extractos observado en la expresión de iNOS afectaba también a otros genes inflamatorios que se activan con LPS, se valoró la expresión de los genes de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en las células RAW 264.7 estimuladas con LPS y pretratadas con los extractos objetos de estudio. El tratamiento de macrófagos RAW con los extractos durante 1 hora previa a la exposición a LPS tuvo un efecto variable sobre la expresión de los distintos genes.

Efecto de los extractos sobre la expresión de IL-1 β

La activación de las células con LPS indujo una marcada expresión del gen de la IL-1 β , valor que se tomó como referencia para evaluar el efecto de los distintos extractos. Como se observa en la figura 42 algunos de los extractos empleados fueron muy eficaces inhibiendo en gran parte esta expresión, mientras que otros no tuvieron efecto.

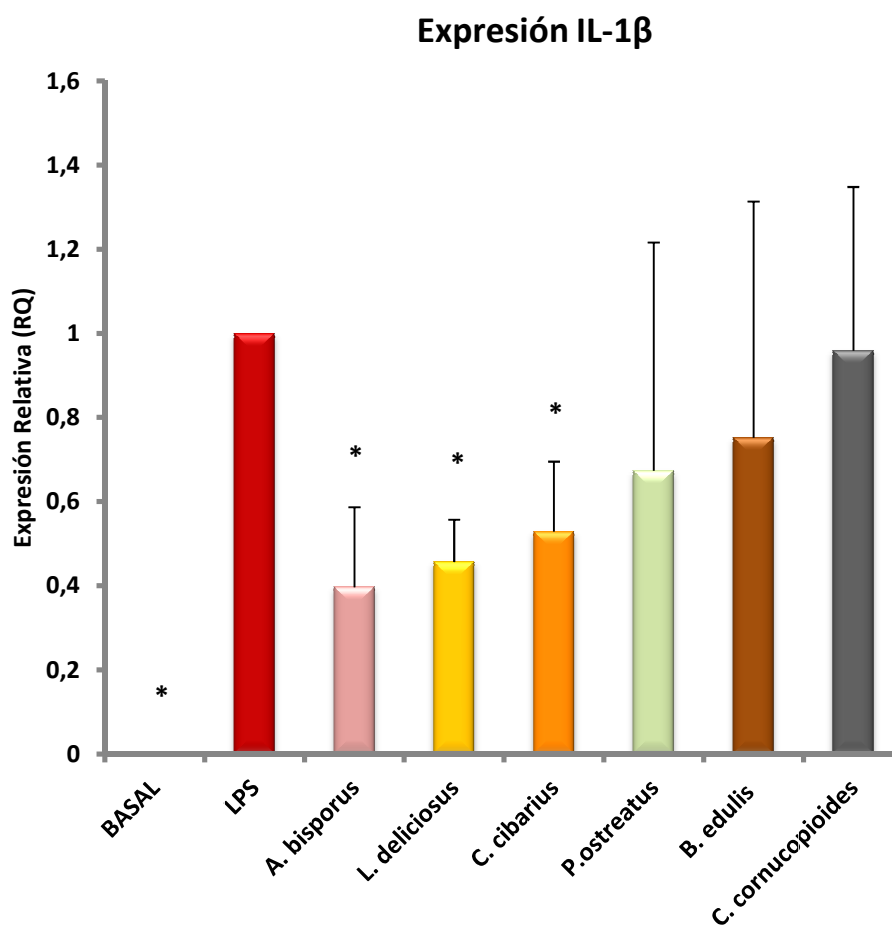


Figura 42. Efecto de los extractos metanólicos de hongos comestibles sobre la expresión de IL-1 β en células RAW 264.7 activadas con LPS. Los resultados se expresan como expresión relativa de cada muestra en función de la muestra de referencia (LPS). Los valores representan las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.

* Muestra significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

Los extractos de *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius*, causaron reducciones de la expresión de IL-1 β estimulada con LPS, que suponían valores de expresión entorno a la mitad del valor de referencia con sólo LPS. Así pues la expresión génica de IL-1 β para los casos de *C. cibarius*, *L. deliciosus* y *A. bisporus* fueron: 53%, 46% y 40%, respectivamente. El resto de los extractos no tuvo ningún efecto.

Efecto de los extractos sobre la expresión de IL-6

El estudio de la expresión del gen de la IL-6, mostró una elevada similitud con el caso de la expresión de IL-1 β , puesto que no sólo los mismos extractos resultaron ser efectivos (*A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius*) sino que además, contaba con el mismo patrón inhibitorio de la otra interleuquina estudiada.

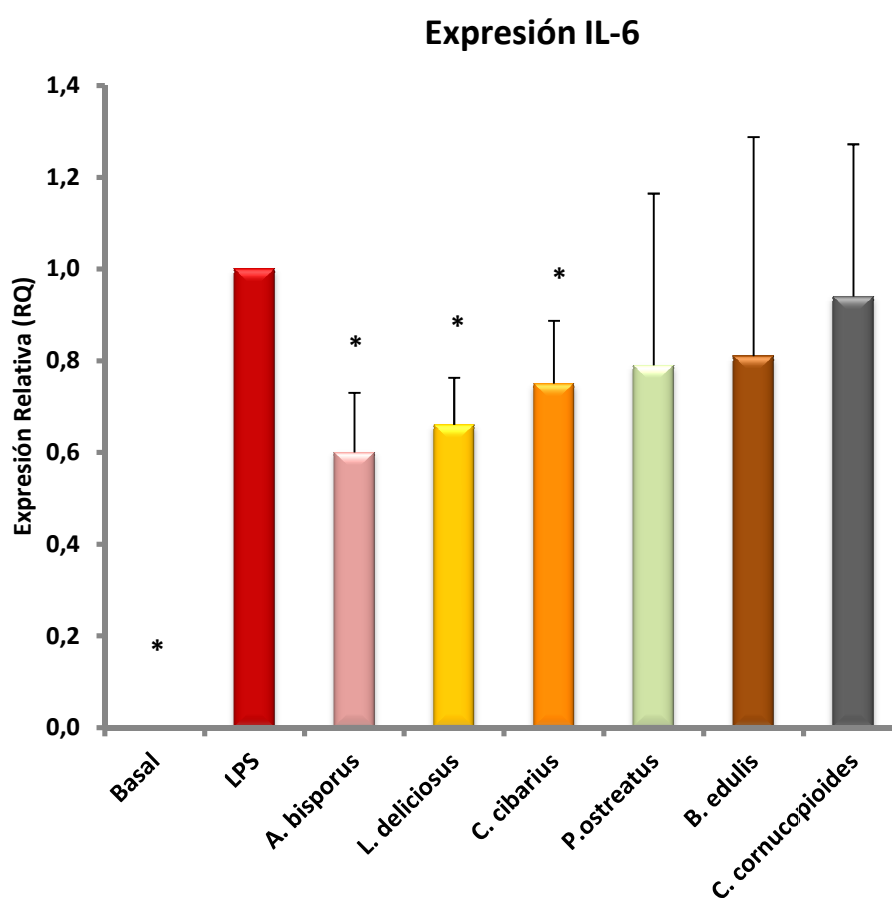


Figura 43. Efecto de los extractos metanólicos de hongos comestibles sobre la expresión de IL-6 en células RAW 264.7 activadas con LPS. Los resultados se expresan como expresión relativa de cada muestra en función de la muestra de referencia (LPS). Los valores representan las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.* Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

Como se observa en la figura, el extracto más efectivo fue el de *A. bisporus* con una expresión del gen de IL-6 del 60%, seguido por el de *L. deliciosus*: 66%, y finalmente por *C. cibarius*, cuya expresión de IL-6 fue del 75%.

Efecto de los extractos sobre la expresión de TNF- α

El tratamiento de las células RAW 264.7 con LPS indujo también una elevada expresión del gen de TNF- α , sin embargo ninguno de los extractos empleados fue capaz de inhibir dicha expresión.

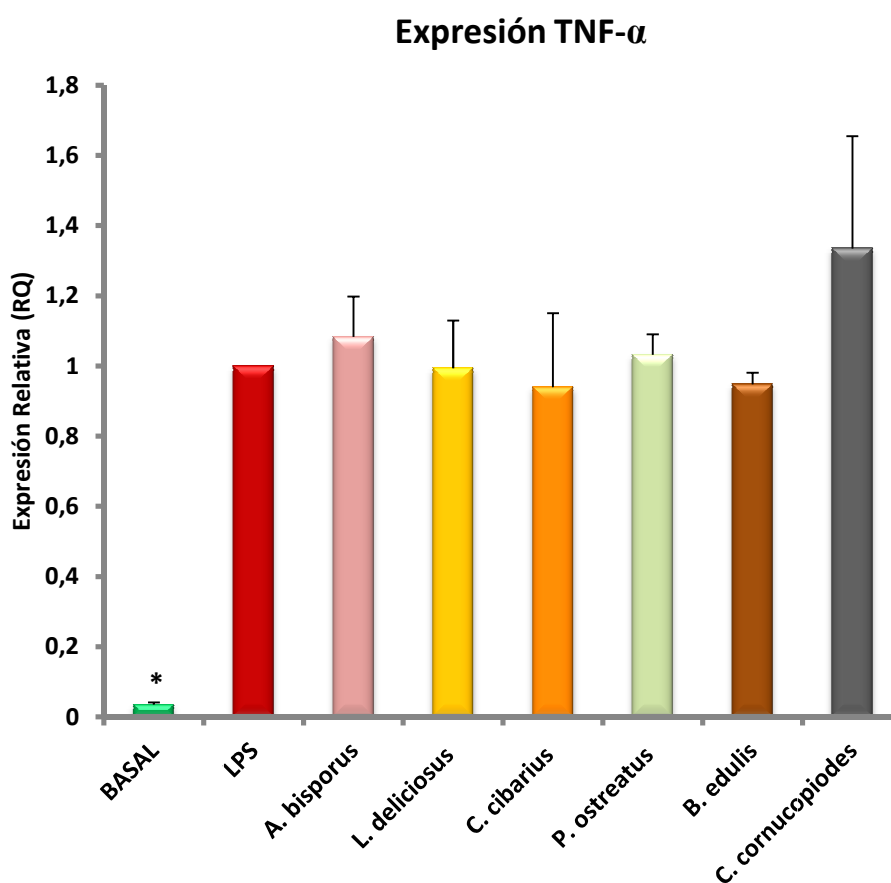


Figura 44. Efecto de los extractos metanólicos de hongos comestibles sobre la expresión de TNF- α en células RAW 264.7 activadas con LPS. Los resultados se expresan como expresión relativa de cada muestra en función de la muestra de referencia (LPS). Los valores representan las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes.* Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

Como se observa en la figura 44, el pretratamiento de las células estimuladas con LPS, con los extractos procedentes de las distintas especies estudiadas, produjo niveles de expresión génica para el TNF- α similares a los encontrados en las células no tratadas (grupo LPS).

IV.2.1.4. Efecto de los extractos sobre la producción de citoquinas proinflamatorias

Para investigar el efecto de los extractos metanólicos en la producción IL-1 β , IL-6 y TNF- α se valoraron dichas citoquinas mediante la técnica ELISA en el sobrenadante del cultivo celular, tras 24 horas de estimulación con LPS. El pretratamiento de los macrófagos con los extractos de hongos comestibles (0,5 mg/mL) durante 1 hora previo a la estimulación con LPS no indujo reducción significativa en la liberación de ninguna de las citoquinas estudiadas.

Efecto de los extractos sobre la producción de IL-1 β

Como se observa en la figura 45, la producción de IL-1 β por parte de las células no tratadas (Basal) fue indetectable. La exposición a LPS durante 24 horas indujo una producción elevada de IL-1 β (614,41 pg/mL) que fue considerada como valor 100% de producción. Los resultados que se obtuvieron para los pretratamientos con cada uno de los diferentes extractos sobre la línea celular de macrófagos RAW 264.7, revelaron que ninguno de los extractos metanólicos de hongos comestibles causaba una reducción significativa de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β , tras la estimulación por LPS.

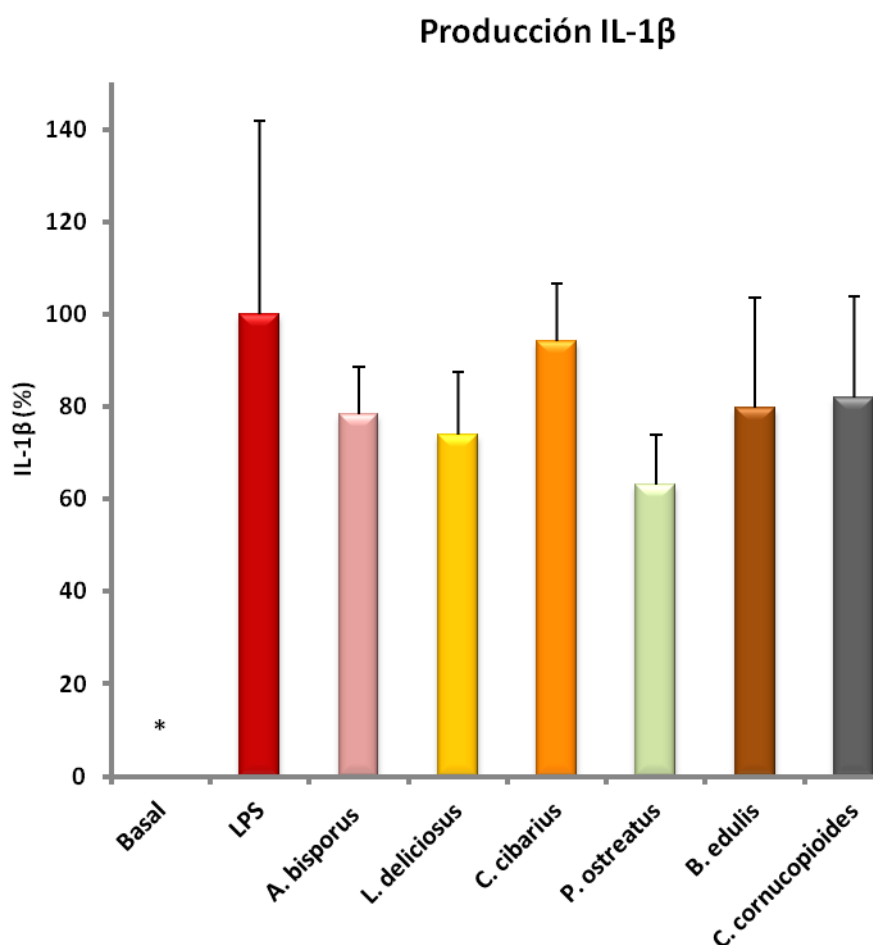


Figura 45. Producción de IL-1 β en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y pretratadas con distintos extractos de hongos. Los resultados se expresan como % de producción de IL-1 β respecto a las células estimuladas con LPS (100%) y se presentan como medias y errores estándar de un mínimo de 3 experimentos realizados por triplicado. * Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

Efecto de los extractos sobre la producción de IL-6

Al igual que ocurrió en el caso anterior, la liberación de IL-6 por las células no estimuladas fue indetectable, mientras que la exposición durante 24 horas a LPS inducía un alto nivel IL-6 liberada al medio (17.277,35 pg/mL), que se consideró como valor de referencia 100% producción.

El pretratamiento de los macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS con diferentes extractos tampoco produjo ningún efecto sobre la liberación de IL-6 al medio de cultivo como se puede ver en la siguiente gráfica. Aunque en el caso del extracto de *C. cibarius* si se observa una cierta reducción de la producción de IL-6, ésta no llega a ser significativa.

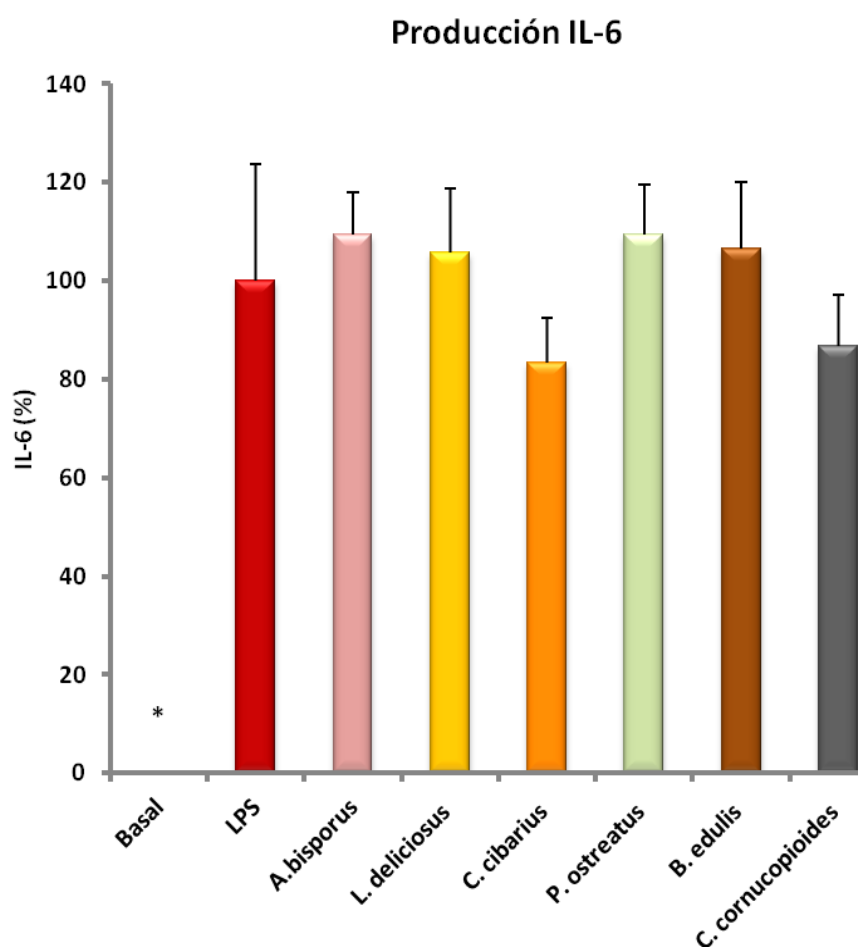


Figura 46. Producción de IL-6 en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y pretratadas con distintos extractos de hongos. Los resultados se expresan como % de producción de IL-6 respecto a las células estimuladas por LPS (100%) y se presentan como medias y errores estándar de un mínimo de 3 experimentos realizados por triplicado. * Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

Efecto de los extractos sobre la producción de TNF- α

La estimulación de las células RAW 264.7 por LPS indujo una elevada producción de TNF- α respecto a la situación basal; 219.857 pg/mL frente a 1.574 pg/mL. Los pretratamientos con los diferentes extractos, no fueron capaces de reducir la producción de TNF- α en ninguno de los casos.

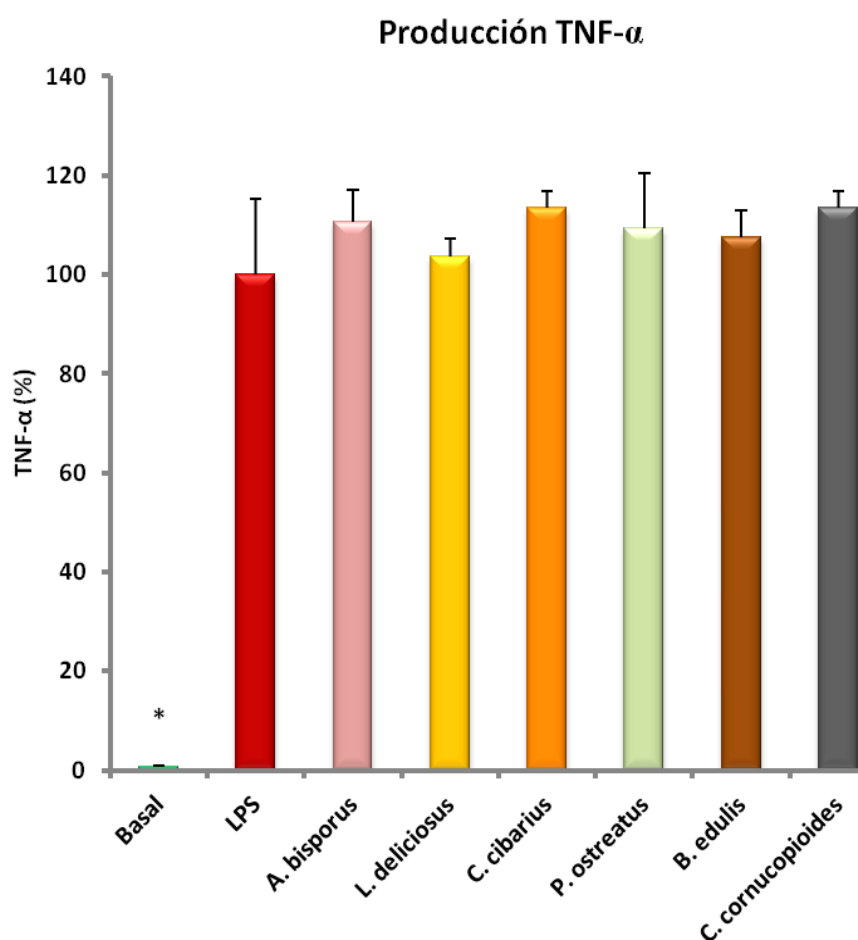


Figura 47. Producción de TNF- α en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y pretratadas con distintos extractos de hongos. Los resultados se expresan como % de producción de TNF- α respecto a las células estimuladas por LPS (100%) y se presentan como medias y errores estándar de al menos 3 experimentos realizados por triplicado. * Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto a LPS

Los resultados de este trabajo indican que varios de los extractos estudiados presentan efectos antiinflamatorios, en términos de inhibición de la expresión de algunos genes inflamatorios, en macrófagos estimulados por LPS. Ninguno de los extractos a la concentración de trabajo elegida (0,5 mg/mL), mostró toxicidad significativa sobre las células tratadas con LPS por lo que los efectos inhibitorios mostrados no fueron debidos a muerte celular sino al poder antiinflamatorio de los mismos.

Los extractos metanólicos de *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius* y *C. cornucopioides* resultaron ser potentes inhibidores de la expresión génica de iNOS, y de la producción de NO. Así mismo, los extractos de *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius*, también inhibieron de manera significativa la expresión de las citoquinas IL-1 β e IL-6 en macrófagos RAW 264.7 activados con LPS.

Los macrófagos, son uno de los tipos de células inmunológicas que desempeñan un papel crítico en la respuesta inflamatoria. Los macrófagos activados, secretan diversos mediadores inflamatorios, entre los que se encuentran el NO, interleuquinas (IL-1 β , IL-6, etc.), TNF- α , PGE₂ y especies reactivas de oxígeno. La LPS actúa como activador de estas células, ya que induce la producción de estos mediadores inflamatorios y además estimula la expresión génica de las enzimas iNOS y COX-2. La producción excesiva de NO, ILs y TNF- α desempeña un papel crítico en enfermedades inflamatorias crónicas, por lo que la inhibición de la expresión así como de la producción estos mediadores se asocia a un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Laskin and Pendino 1995).

El NO, producido en concentraciones fisiológicas por las isoformas constitutivas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), desempeña un papel crucial como vasodilatador, neurotransmisor y regulador inmunológico en una amplia variedad de tejidos (Moncada, Palmer et al. 1992). Sin embargo la superproducción de NO debido a la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), puede originar una respuesta inflamatoria desmesurada, por lo que iNOS constituye un importante punto

de control (Ahmad, Chen et al. 2002). Los potenciales inhibidores de iNOS se consideran como estrategias a tener en cuenta para prevenir y hacer frente a enfermedades inflamatorias.

Los extractos metanólicos de *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius* y *C. cornucopiodes* inhibieron de manera eficaz la producción de NO en macrófagos activados, a través de la inhibición de la expresión del ARNm de iNOS. Otros trabajos realizados con extractos metanólicos de algunas especies de hongos medicinales han dado resultados similares como por ejemplo, el extracto metanólico de *Inonotus obliquus*, un hongo medicinal con demostrada actividad inmunomoduladora (Park, Won et al. 2005) o el de *G. lucidum* otra especie ampliamente estudiada por su actividad anticancerígena (Woo, Man et al. 2005). En el caso de los hongos comestibles, aunque mucho menos estudiados que los medicinales, también hay algunos trabajos que demuestran esta misma actividad antiinflamatoria, aunque no existen precedentes de las especies aquí estudiadas. Por ejemplo, un extracto de *S. aspratus* reducía la producción de NO y la expresión génica de iNOS en un modelo *in vitro*, similar al usado en este trabajo (Chung, Jung et al. 2015).

Estímulos inflamatorios, como la LPS, inducen la activación de los macrófagos y la subsecuente producción de citoquinas, que media en las respuestas de los tejidos durante las diferentes fases de la inflamación de una manera secuencial y orquestada (Laskin and Pendino 1995). Sin embargo, cuando se expresan en exceso pueden dar lugar a inflamación crónica y otras enfermedades asociadas a inflamación (Szekanecz 2008), por lo que la inhibición de la producción o de las funciones de las citoquinas, representa un mecanismo clave para el control de procesos inflamatorios.

En nuestro trabajo, los extractos de *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius* inhibían significativamente la expresión génica de IL-1 β e IL-6, en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, pero sorprendentemente ninguno de los extractos estudiados tenían efecto en los niveles de expresión génica de TNF- α . Resultados similares fueron obtenidos por Feng, Ling y Duan (Feng, Ling et al. 2010) con licopeno,

éste inhibía la expresión de iNOS e IL-6, en macrófagos estimulados con LPS, sin afectar a la expresión de TNF- α . El estudio de los mecanismos de acción del licopeno llevó a la conclusión de que dicho compuesto actuaba inhibiendo la activación de 2 MAPKs: ERK1/2 (Quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2) y p38, sin afectar a JNK (Quinasas c-Jun N-terminal) (Feng, Ling et al. 2010). Esto a su vez, reafirma la hipótesis de que tras la estimulación por LPS, la expresión de las citoquinas IL-1 β e IL-6 está mayoritariamente regulada por ERK1/2, mientras que la del TNF- α se regula principalmente por JNK (Swantek, Cobb et al. 1997). Por lo tanto los resultados similares obtenidos en este trabajo, sugieren que los extractos metanólicos de *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius* podrían ejercer su actividad antiinflamatoria mediante la inhibición selectiva de distintos factores de transcripción en la cascada de activación de los macrófagos por LPS.

Estudios previos han demostrado que la actividad antiinflamatoria de extractos obtenidos de diferentes especies de hongos se debe a la inhibición de la expresión y producción de diversos marcadores inflamatorios. La mayor parte de estos estudios se han realizado con hongos medicinales: un extracto de *L. polychrous*, rico en compuestos fenólicos y esteroides, que reducía la inflamación en un modelo *in vivo*, en macrófagos RAW 264.7 activados por LPS, inhibía la expresión de iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α y COX-2 y además la producción de NO, O₂⁻ y TNF- α (Fangkrathok, Junlatat et al. 2013). Así mismo, *A. camphorata* otro hongo medicinal con demostrada actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*, (Tsai, Tung et al. 2015), ejerce su efecto antiinflamatorio a través de la supresión de la expresión de iNOS y COX-2 así como de la producción de mediadores inflamatorios NO, IL-6, TNF- α y PGE₂ en macrófagos activados por LPS (Hseu, Wu et al. 2005). *A. brasiliensis* también cuenta con demostradas propiedades antiinflamatorias: metabolitos secundarios de esta especie son capaces de disminuir los niveles de IL-1 β , TNF- α así como de inhibir la expresión de IL-1 β , TNF- α , VEGF- α e IL-17A mediante la inactivación del factor de transcripción NF- κ B en el hígado de ratones diabéticos sometidos a una dieta suplementada con *A. brasiliensis* (Yu, Han et al. 2013). La administración de pequeñas dosis de *A. brasiliensis*

también es capaz de atenuar la inflamación pulmonar inducida en ratas Wistar, posiblemente como consecuencia de su actividad inmunomoduladora sobre los macrófagos (Croccia, Lopes et al. 2013).

Además de los estudios realizados con hongos medicinales, también se han publicado algunos trabajos acerca de la actividad antiinflamatoria de especies comestibles, aunque son mucho menos abundantes y la mayoría se limitan a algunas especies del género *Pleurotus*, *Agaricus* y *Lentinus*. La mayor parte de las especies utilizadas en este trabajo no han sido objeto de este tipo de estudios.

Se demostró que un concentrado de *P. ostreatus* inhibe la expresión de iNOS y COX-2 y los niveles de producción de NO, PGE₂, IL-6, IL-12 y TNF- α liberados en macrófagos estimulados por LPS. Estos resultados están en clara contraposición con los obtenidos en nuestro trabajo donde *P. ostreatus* fue una de las especies que no mostró ningún efecto antiinflamatorio. Esta discrepancia puede ser debida a la composición del concentrado de *P. ostreatus* utilizado (β -glucanos, glucanos y aminoácidos) que era radicalmente distinta de la de nuestros extractos (Jedinak, Dudhgaonkar et al. 2011).

Sin embargo también se dispone de un trabajo con la especie *C. cibarius*, con resultados concordantes con los de nuestra investigación. Varios extractos de *C. cibarius* demostraron propiedades antiinflamatorias, aunque de naturaleza diferente a las estudiadas en este trabajo: actividad antiproteínasa, estabilización de la membrana de los eritrocitos e inhibición de la desnaturalización de albúmina. En dicho trabajo también se evaluó la actividad antioxidante de los extractos, *in vitro*, mediante el estudio de 6 factores diferentes (actividad secuestradora de radicales DPPH, poder reductor, actividad quelante de metales, inhibición de la peroxidación lipídica, y capacidad para secuestrar radicales hidroxilo y superóxidos), e *in vivo*, concluyendo que *C. cibarius* es un potente agente antioxidante. En cuanto a la composición de los extractos, el componente mayoritario resultó ser, al igual que en nuestro trabajo, el ac. homogentístico, cuya presencia fue superior a la de otros

compuestos como el ac. gálico, flavonoides, ácido ascórbico, licopeno y γ -tocoferol (Vamanu and Nita 2014).

A pesar de que algunos de los extractos ensayados como *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius* tuvieron un efecto a nivel transcripcional (fueron capaces de reducir la expresión génica de IL-1 β e IL-6 inducida por la LPS), este efecto no se tradujo en una reducción de las citoquinas liberadas al medio de cultivo, lo que sugiere que otros efectos post-transcripcionales pueden estar implicados. Por otro lado, son numerosos los trabajos que demuestran que un efecto a nivel transcripcional suele ir asociado a un efecto a nivel de traducción, por lo que es posible que los tiempos de incubación ensayados en nuestro trabajo no fueran suficientes para mantener activados los factores de transcripción implicados. Puesto que la reducción de estos mediadores inflamatorios es fundamental para conseguir un efecto antiinflamatorio neto, se necesitaría realizar más trabajos en este sentido para conseguir tanto las dosis como los tiempos de incubación necesarios para lograr el efecto deseado.

Aunque existen distintas moléculas que pueden participar en la capacidad antiinflamatoria de los hongos, los compuestos fenólicos han sido largamente reconocidos como compuestos con elevada actividad antiinflamatoria. Esto hace suponer que el elevado contenido en compuestos fenólicos en los extractos utilizados en nuestro trabajo es el responsable de los efectos observados. Algunos compuestos fenólicos de origen natural, como la quercetina o el resveratrol, entre otros, se ha demostrado que son capaces de inhibir tanto la expresión de genes inflamatorios como la producción de los correspondientes mediadores (Hämäläinen, Nieminen et al. 2007). En el caso concreto de los hongos también se han podido identificar algunos compuestos fenólicos responsables de esta actividad. Uno de los metabolitos secundarios del hongo medicinal *Phellinus linteus*, el polifenol hispidina, demostró que inhibe la expresión génica de iNOS mediante la inhibición de la degradación del inhibidor Ik-B- α y la disminución de la traslocación del factor de transcripción NF-kB en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (Shao, Jeong et al. 2015). El albaconol, un

metabolito obtenido del hongo no comestible *Albatrellus confluens*, disminuye los niveles de producción de las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α en macrófagos y en células dendríticas inducidos por LPS (Liu, Shu et al. 2008). En el caso de *L. edodes*, se han identificado dos compuestos, el ac. siríngico y el ac. vanílico, con elevada capacidad antioxidante y antiinflamatoria en un modelo de inflamación hepática en ratones (Itoh, Isoda et al. 2009).

IV.2.2. Efecto antiinflamatorio de los extractos en la línea celular Caco-2

Una vez estudiado el potencial antiinflamatorio de los extractos metanólicos obtenidos a partir de especies de hongos comestibles, y haber demostrado varios de sus efectos antiinflamatorios sobre la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 activada por LPS, se llevó a cabo el estudio de los extractos metanólicos testados anteriormente y los de dos especies más: *C. gambosa* e *H. marzuolus*, en un modelo *in vitro* de inflamación epitelial intestinal, para lo cual se utilizó la línea celular humana Caco-2.

Los enterocitos son células epiteliales localizadas en el intestino delgado, grueso y en el colon, que se encargan de realizar la absorción y el transporte de moléculas alimenticias al interior del organismo. Presentan polaridad puesto que cuentan con dos zonas diferenciadas: la parte apical, orientada hacia el lumen del intestino, donde se encuentran las microvellosidades; y la basal, donde se localizan los vasos sanguíneos. Por su situación, desempeñan un papel crucial en la regulación de la respuesta inmunitaria intestinal, ya que forman barreras biomecánicas y bioquímicas frente a antígenos y además son capaces de secretar y reaccionar ante mediadores inflamatorios.

La línea celular de adenocarcinoma humano, Caco-2, constituye un modelo idóneo para estudios sobre diferentes fenómenos fisiológicos intestinales, puesto que al crecer forma una monocapa polarizada que presenta muchas de las características tanto funcionales como morfológicas de los enterocitos maduros humanos (Van De Walle, Hendrickx et al. 2010).

Con el objetivo de evaluar la capacidad antiinflamatoria de los extractos en un modelo de inflamación intestinal *in vitro*, se empleó la línea Caco-2, que se estimuló mediante un cóctel de agentes proinflamatorios IL-1 β , TNF- α , INF- γ y LPS, que han demostrado estar implicados en el daño intestinal producido durante las EII. Las citoquinas IL-1 β , TNF- α , INF- γ han sido encontradas en tejidos de pacientes con EII (Reimund, Wittersheim et al. 1996), mientras que LPS representa un agente inflamatorio ubicuo, cuya presencia en el tracto intestinal es muy común.

Las concentraciones a las que se emplearon los agentes inflamatorios se ajustaron para provocar la respuesta inflamatoria de Caco-2 sin provocarles daño ni perturbar su actividad. Estas células, al verse expuestas a estímulos inflamatorios, se activan, secretando una serie de mediadores inflamatorios como NO, interleuquinas, etc. La inhibición tanto de los mediadores inflamatorios como de su expresión génica, podría representar una potencial alternativa para futuras terapias en enfermedades inflamatorias intestinales (Van De Walle, Hendrickx et al. 2010).

IV.2.2.1. Ensayos de citotoxicidad

En primer lugar se valoró la toxicidad de los extractos metanólicos sobre la línea celular Caco-2. Para ello se emplearon dos tipos de ensayos diferentes: el ensayo MTT y el ensayo LDH. En ambos casos se emplearon células en crecimiento que no habían alcanzado el estado de confluencia, esto es, sin diferenciarse, debido a que en ese estado las células presentan una mayor sensibilidad. Las células intestinales, en sus primeros estadios son más sensibles frente a la exposición a diferentes sustancias, mientras que a medida que van creciendo y diferenciándose, van perdiendo dicha sensibilidad, haciéndose más resistentes frente a posibles agresiones (Van De Walle, Hendrickx et al. 2010).

Ensayo MTT

Se evaluó la citotoxicidad de diferentes concentraciones de los extractos (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL y 2 mg/mL). Para ello se incubaron las células con los extractos durante 24 horas y después se realizó el ensayo MTT.

El valor de absorbancia obtenido para las células que se mantuvieron en condiciones basales, fueron consideradas como valor de 100% de viabilidad. A partir de éste se calculó la viabilidad de las células tratadas con las distintas concentraciones de los diferentes extractos. Como se observa en la figura 48, ninguna de las concentraciones ensayadas de los distintos extractos, afectaron a la viabilidad celular.

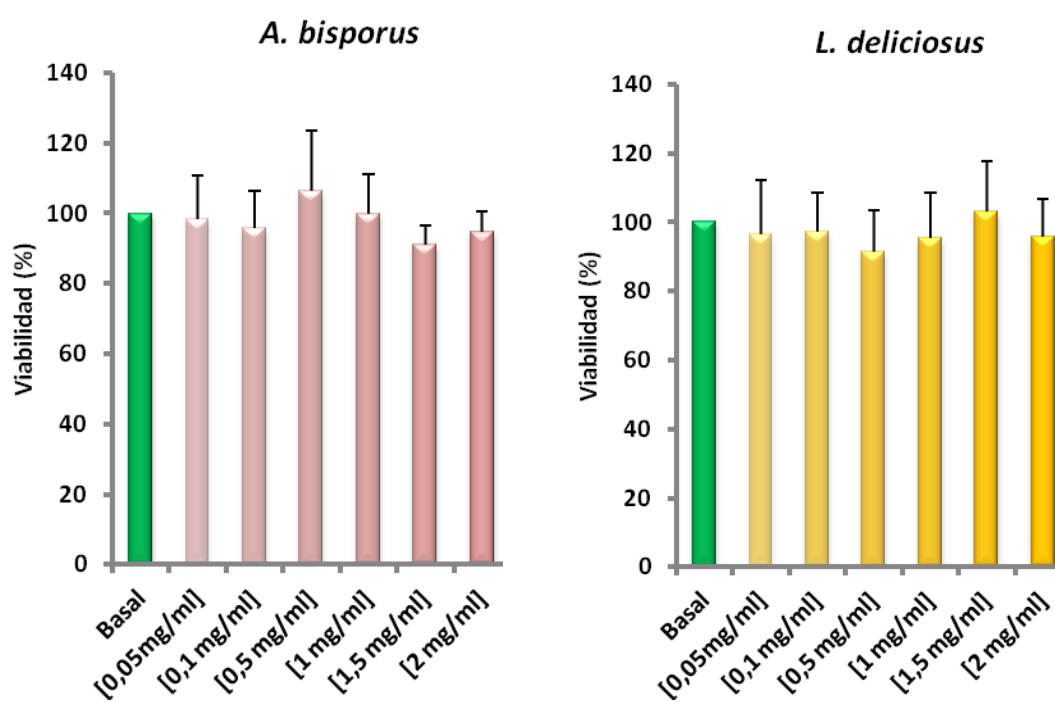


Figura 48. Efecto de la citotoxicidad de las distintas concentraciones de los extractos *A. bisporus* y *L. deliciosus*, evaluada mediante el método MTT. Los resultados se expresan como porcentajes de viabilidad respecto al valor de las células sin tratar (viabilidad 100%). Las barras representan las medias y las desviaciones estándar de, al menos, 3 experimentos diferentes realizados por triplicado

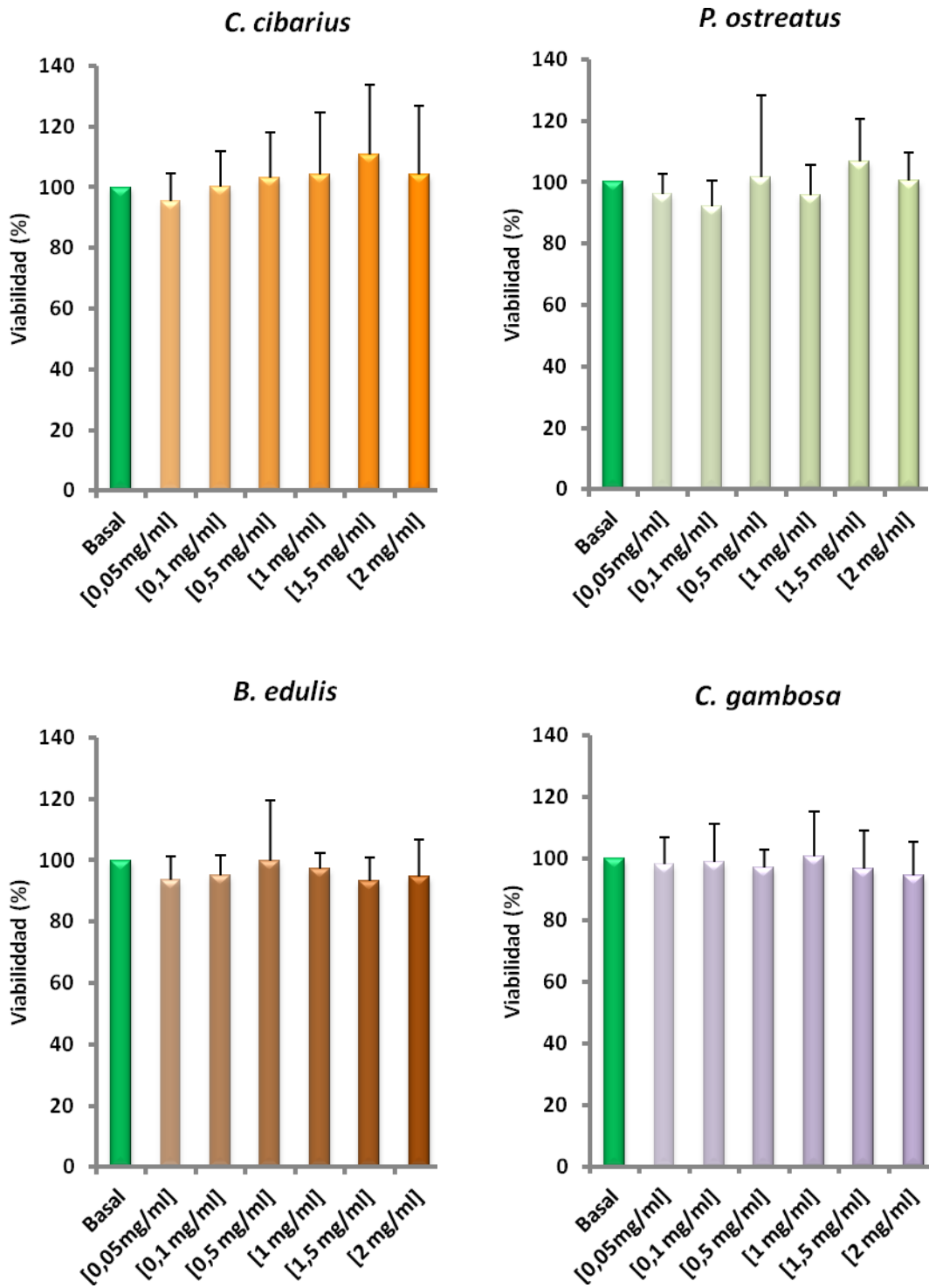


Figura 48 continuación. Extractos de *C. cibarius*, *P. ostreatus*, *B. edulis* y *C. gambosa*

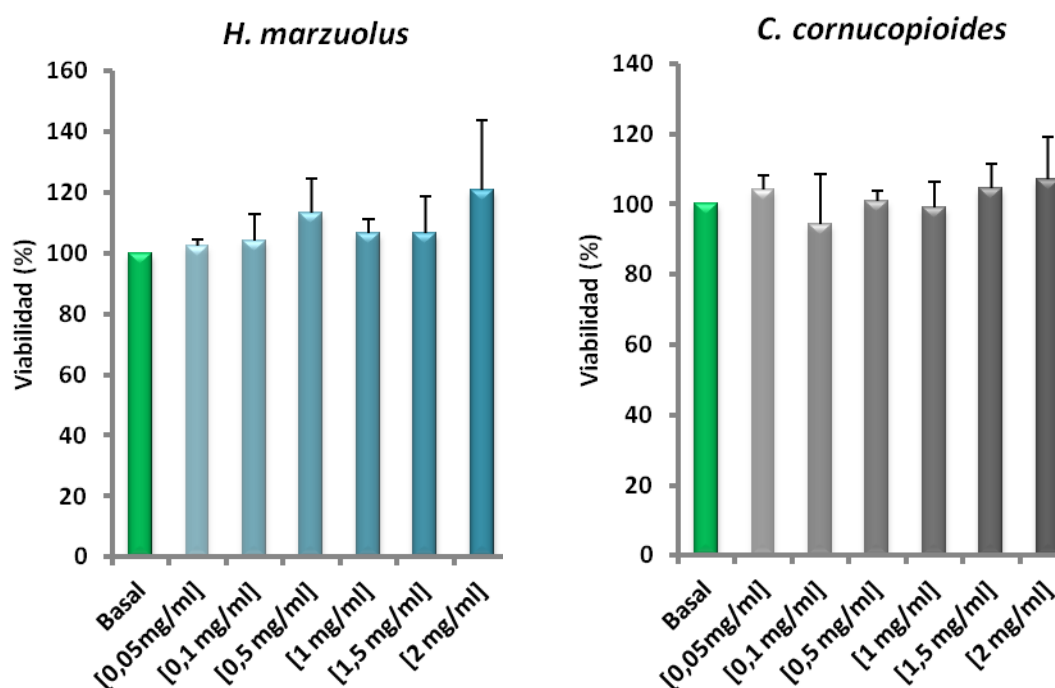


Figura 48 continuación. Extractos de *H. marzuolus* y *C. cornucopioides*

Ensayo LDH

El ensayo LDH muestra la actividad enzimática de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que se encuentra presente en el citoplasma de las células vivas. Así, cuando ésta se detecta en el medio de cultivo, es consecuencia de la permeabilización de las membranas celulares en células muertas o moribundas, que han sido expuestas a un agente tóxico.

El estudio de la citotoxicidad de los extractos mediante este método, se llevó a cabo también con las mismas concentraciones empleadas para el método MTT: 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL y 2 mg/mL.

Ninguna de las concentraciones estudiadas mediante el método LDH, presentó efecto citotóxico, cuando se compararon los resultados con los valores de referencia, 100% viabilidad, de las células en estado basal (Fig. 49).

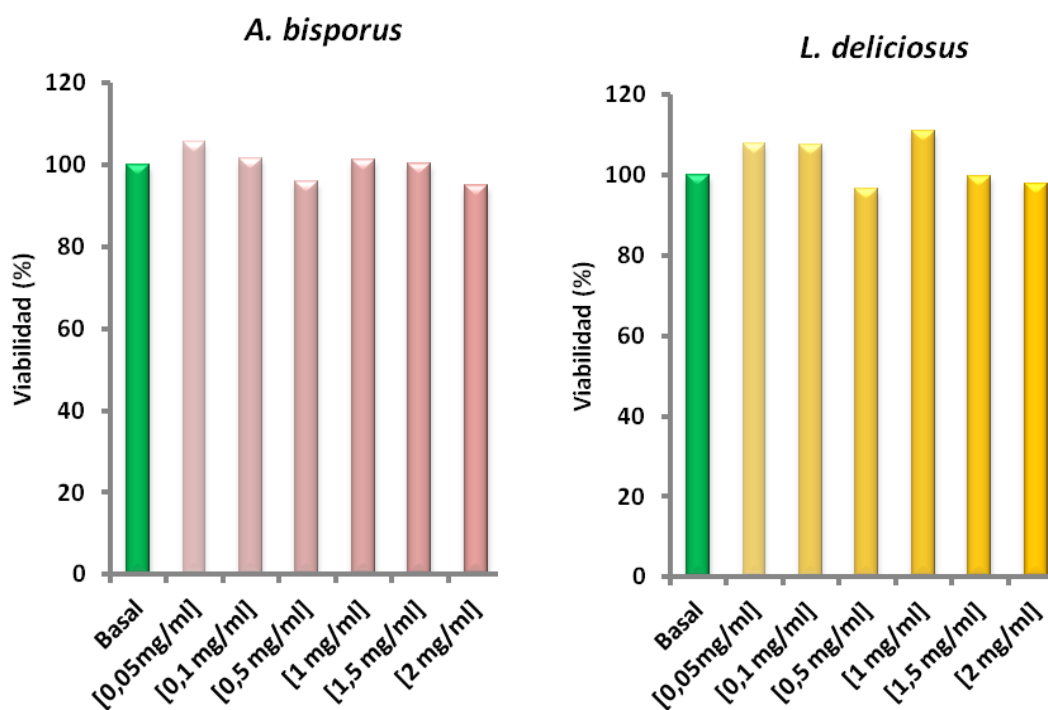


Figura 49. Citotoxicidad de las distintas concentraciones de los extractos de *A. bisporus* y *L. deliciosus*, sobre la línea celular Caco-2, estudiada por el método LDH. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad respecto a las células sin extractos (viabilidad 100%). Las barras reproducen las medias y las desviaciones estándar de más de 3 experimentos diferentes realizados por triplicado

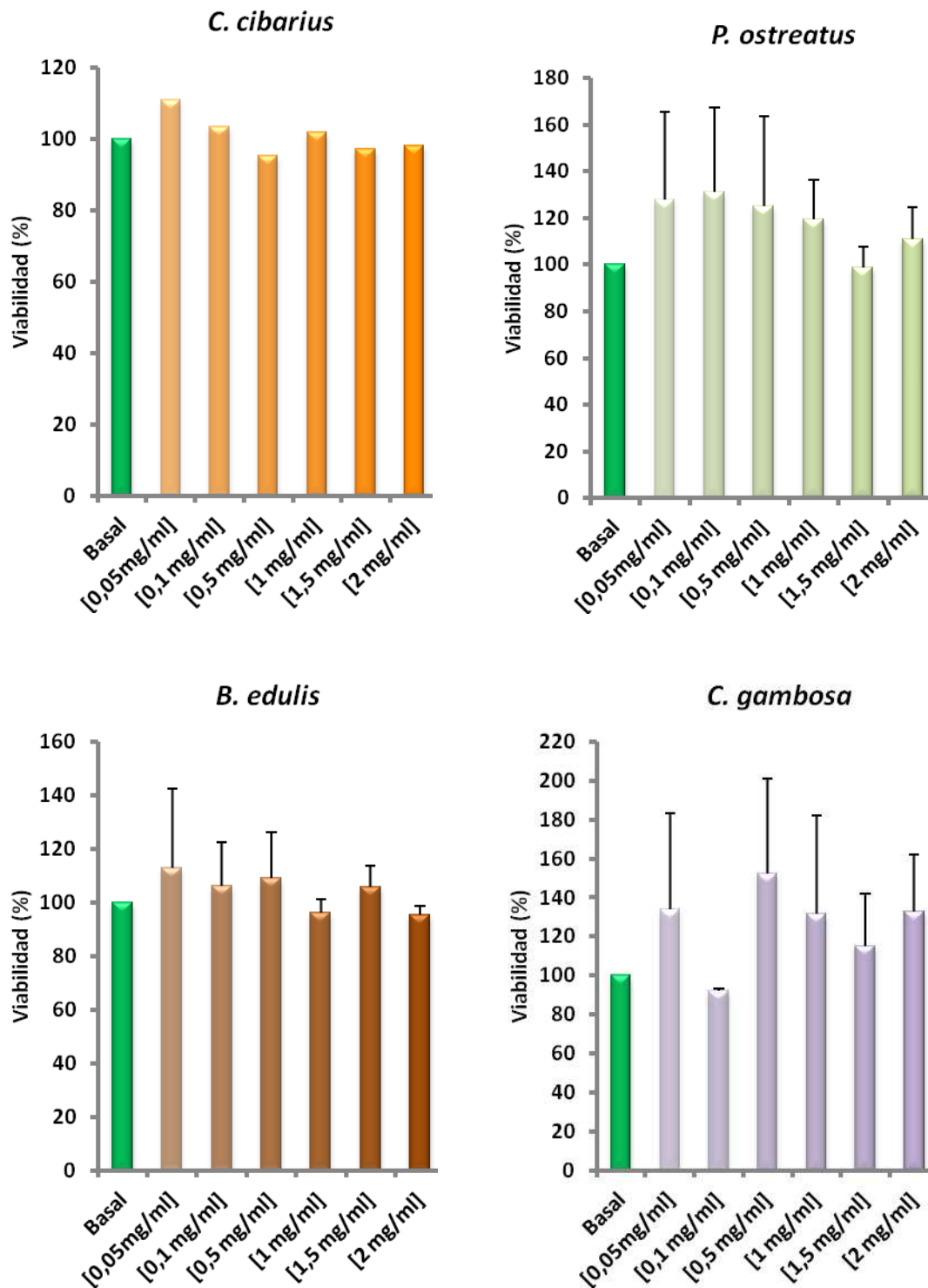


Figura 49 Continuación. Extractos de *C. cibarius*, *P. ostreatus*, *B. edulis* y *C. gambosa*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad MTT y LDH, la concentración elegida para el estudio del potencial antiinflamatorio de los extractos sobre la línea celular Caco-2, fue la más alta: 2 mg/mL.

IV.2.2.2. Efecto de los extractos sobre la producción de NO

La valoración de los efectos que los diferentes extractos ejercían sobre la producción de NO en la línea celular Caco-2 estimulada mediante exposición a cóctel inflamatorio, se llevó a cabo mediante la técnica de Griess, previa conversión de los nitratos presentes en los sobrenadantes de los cultivos a nitritos.

Como se observa en la figura 50 las células que no fueron estimuladas (condición basal), presentaron un pequeño porcentaje de NO liberado al medio de cultivo (26%), en comparación con el de aquellas células que fueron estimuladas por el cóctel inflamatorio y no recibieron ningún otro tratamiento (valor considerado como 100% de producción).

El tratamiento de las células Caco-2 con los distintos extractos durante 1 hora, a la concentración de 2 mg/mL previo a la estimulación, en la mayoría de las especies estudiadas no produjo modificación alguna. Tan sólo el extracto de *C. cibarius* produjo una reducción significativa de la liberación de NO, con un valor del 71% de producción de este mediador.

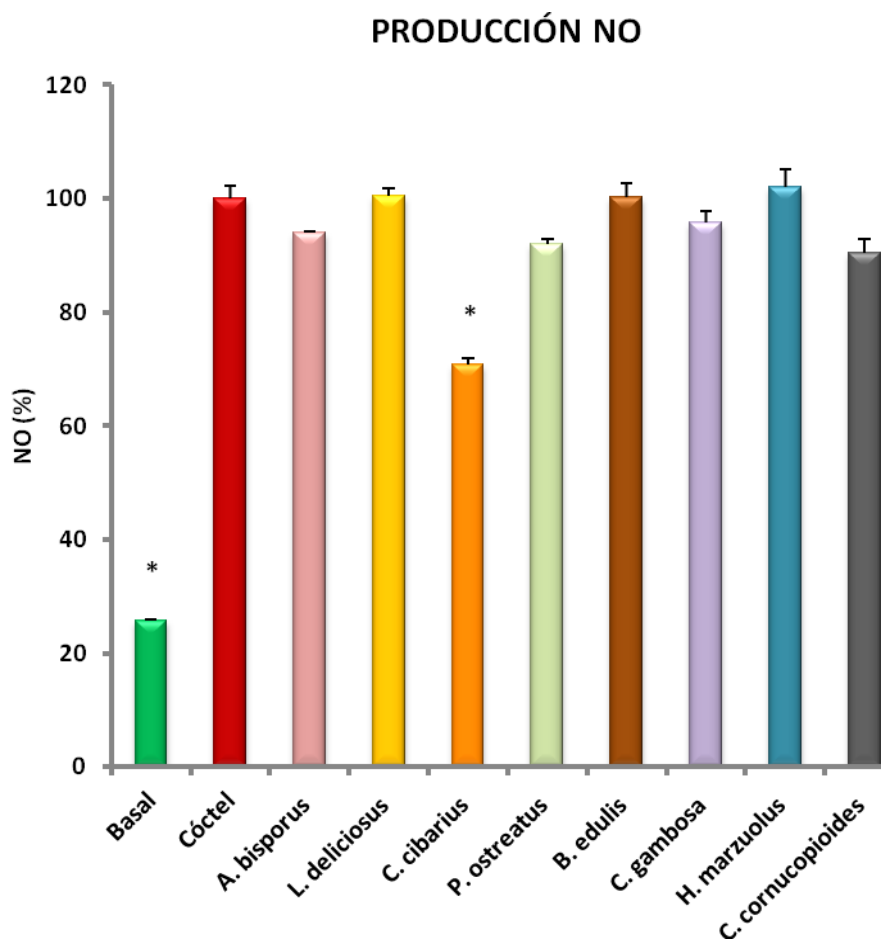


Figura 50. Producción de NO en células Caco-2 estimuladas con cóctel inflamatorio y pretratadas con diferentes extractos de hongos (2 mg/mL). Los resultados se expresan como % de producción de NO respecto a las células estimuladas por cóctel inflamatorio (Producción 100%) y se presentan por sus medias y errores estándar de un mínimo de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * Indica significación estadística ($p < 0,05$) respecto al cóctel inflamatorio

IV.2.2.3. Efecto de los extractos sobre la expresión de genes proinflamatorios

Una vez valorado el efecto de los extractos metanólicos sobre la producción de NO en las células Caco-2 activadas, se llevó a cabo el estudio de la expresión génica de la enzima iNOS con el objeto de dilucidar si el efecto inhibitorio del extracto de *C. cibarius* sobre la producción de NO era consecuencia de su acción sobre la transcripción del gen iNOS y si el resto de extractos tenía algún efecto sobre la misma. Del mismo modo, también se valoró el efecto que los extractos producían en la expresión del gen de la citoquina proinflamatoria IL-8.

Para ello se incubó la línea Caco-2 con los extractos durante 1 hora y posteriormente se estimuló mediante la exposición al cóctel inflamatorio. Transcurridas 6 horas se extrajo el ARN y se valoró la expresión de los genes iNOS e IL-8 mediante RT-qPCR.

Efecto de los extractos sobre la expresión de iNOS

La estimulación de las células Caco-2 con el cóctel inflamatorio provocó la inducción de una alta expresión del gen iNOS, que fue considerada como el valor de referencia. Por el contrario las células no estimuladas, en situación basal, apenas reflejaron la expresión del gen (4%).

El pretratamiento de las células Caco-2 con los distintos extractos de setas no produjo ningún efecto sobre la expresión génica de iNOS inducida con el cóctel inflamatorio, en la mayoría de los casos. Sólo los extractos de *C. cibarius* y *C. cornucopiodes* produjeron una reducción de la expresión del gen.

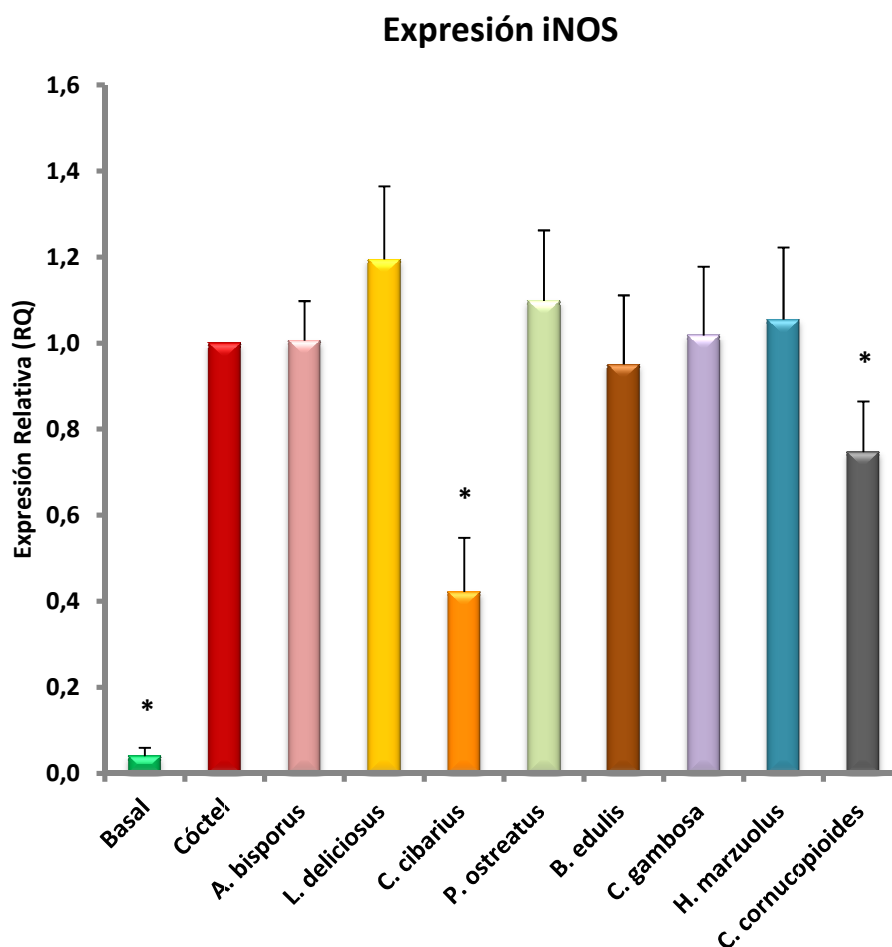


Figura 51. Expresión g6nica de iNOS en c6lulas Caco-2 pretratadas con extractos de hongos y activadas mediante c6ctel inflamatorio. Los resultados se expresan como expresi3n relativa con respecto a la muestra de referencia (c6ctel) y se representan con las medias y errores est6ndar de 3 experimentos independientes. *Muestra la significaci3n estadística ($p < 0,05$) respecto a c6ctel inflamatorio

Como puede apreciarse en la figura 51, los extractos que resultaron ser efectivos fueron el de *C. cornucopioides*, que expres3 el gen iNOS un 75% del valor de referencia (aquel estimulado con el c6ctel inflamatorio) y el de *C. cibarius*, que fue capaz de reducir m6s de la mitad la expresi3n de iNOS, con un valor del 41% de expresi3n. El resto de extractos no mostraron ning6n efecto.

Se ha demostrado que las células Caco-2 en presencia de estímulos proinflamatorios, producen elevados niveles de NO (Van De Walle, Hendrickx et al. 2010). En este trabajo, la línea celular Caco-2 sintetizó, en condiciones basales, NO de manera constitutiva. Sin embargo, tras la exposición al cóctel inflamatorio, la producción de NO se incrementó significativamente. Al igual que en los macrófagos, en las células Caco-2 la elevada producción de NO que se produce bajo estimulación inflamatoria, se puede deber a un aumento en la transcripción de la enzima inducible iNOS. En nuestro trabajo, el extracto de *C. cibarius* fue el único que redujo de modo significativo la síntesis de NO. Asimismo, dicho extracto también disminuyó significativamente la expresión génica de iNOS, lo cual sugiere que la inhibición de la producción de NO fue debida a la inhibición de la expresión génica de la enzima iNOS. El paenol, el compuesto fenólico más abundante en la corteza de la raíz de la planta medicinal *Paeonia suffruticosa*, además de reducir la colitis inducida en modelos de ratones, también inhibe la producción de la enzima iNOS y su expresión génica tanto, *in vitro*, en células derivadas de cáncer de colon CW-2, como *in vivo* (Ishiguro, Ando et al. 2006).

En el caso del extracto de *C. cornucopioides*, también produjo una reducción de la expresión de iNOS, aunque este efecto no fue suficiente para que se reflejara en la liberación de NO al sobrenadante.

El hecho de que el extracto de *C. cibarius* redujera tanto la producción de NO como la expresión de iNOS, mientras que el de *C. cornucopioides* sólo inhibiera la expresión génica de iNOS, puede deberse a las diferencias entre la composición de ambos extractos así como a los distintos mecanismos de acción que dichos extractos desencadenan. Diversos compuestos fenólicos disminuyen la producción de NO, reduciendo tanto la expresión génica como la actividad de la enzima iNOS (Kim, Moon et al. 2012), de modo que el extracto obtenido a partir de *C. cibarius* aparte de actuar sobre la transcripción de iNOS, podría también hacerlo sobre la actividad de la enzima,

disminuyendo significativamente, de este modo, los niveles de NO secretados por células Caco-2 activadas.

Efecto de los extractos sobre la expresión de IL-8

La línea Caco-2 estimulada mediante la exposición al cóctel inflamatorio, presentó una elevada expresión del gen IL-8, que se consideró como valor de referencia con el que comparar el resto de casos, mientras que las células en condición basal, expresaron niveles muy bajos de dicho gen (5%). El tratamiento de incubación con extractos metanólicos de hongos comestibles (2 mg/mL) previo a la exposición al cóctel inflamatorio, causó distintos efectos en la expresión de IL-8 para las distintas especies estudiadas.

Los extractos de *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *P. ostreatus*, *B. edulis* y *C. gambosa* no presentaron efecto alguno sobre la expresión de IL-8 en células Caco-2 estimuladas. Por el contrario hubo 3 extractos que modularon de diferentes maneras la expresión de dicho gen.

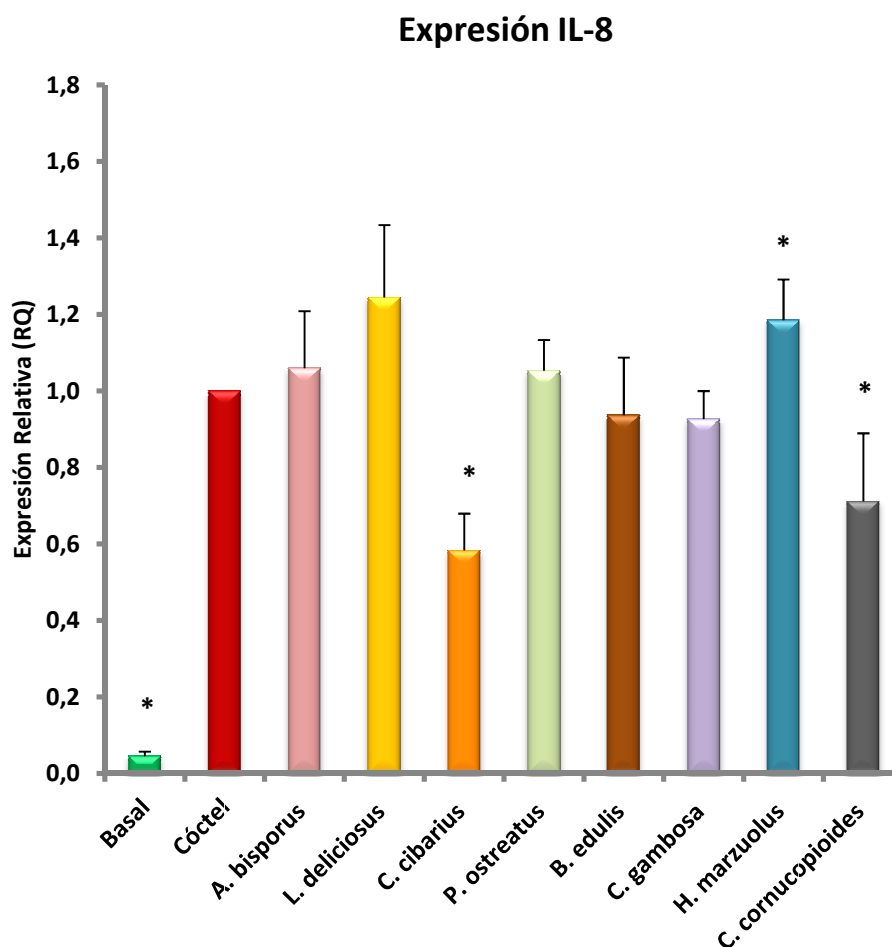


Figura 52. Expresión génica de IL-8 en la línea celular Caco-2 pretratada con los extractos metanólicos de setas (2 mg/mL) y activada con cóctel inflamatorio. Los resultados se muestran como expresión relativa respecto a la expresión de la muestra de referencia (cóctel) Se representan medias y errores estándar de 3 experimentos. *Indica la significación estadística ($p < 0,05$) respecto a cóctel inflamatorio

Como se muestra en la figura 52 los extractos de *C. cornucopioides* y de *C. cibarius* inhibieron la expresión génica de IL-8 estimulada por el cóctel inflamatorio, presentando valores de expresión génica del 71% y 58% del estimulado, respectivamente.

Sin embargo el extracto de *H. marzuolus* presentó el efecto opuesto, induciendo la estimulación de la expresión del gen de IL-8, que registró un ligero aumento con un valor de expresión del 119%.

Estos resultados señalan que varios de los extractos poseen diferentes efectos moduladores de la respuesta inflamatoria desencadenada por la línea celular Caco-2 estimulada con un cóctel inflamatorio. Concretamente muestran que 2 de ellos presentan actividad antiinflamatoria: los obtenidos a partir de las especies de *C. cibarius* y *C. cornucopioides*. Mientras que por el contrario, el extracto de *H. marzuolus* cuenta con cierto efecto proinflamatorio. Los extractos del resto de especies resultaron ser inactivos.

Ninguno de los extractos estudiados a la concentración utilizada (2 mg/mL), mostró ningún tipo de efecto citotóxico sobre las células Caco-2, lo que descartó la posibilidad de que los efectos observados fueran consecuencia de la muerte celular.

Uno de los puntos clave más importantes de las enfermedades inflamatorias intestinales es el desequilibrio entre la secreción de mediadores inflamatorios como NO y citoquinas (Romier, Schneider et al. 2009). La IL-8 es una citoquina que amplifica la respuesta inflamatoria local, puesto que dirige la migración de monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares hacia los sitios dónde la inflamación tiene lugar para combatirla (Mukaida, Harada et al. 1998). Es secretada constitutivamente por las células epiteliales del intestino, y en las células Caco-2, esta secreción basal se incrementa considerablemente tras la exposición a IL-1 β , TNF- α , IFN- γ o LPS (Romier, Van De Walle et al. 2008) (Van De Walle, Romier et al. 2008). Por ello, representa una diana muy prometedora para el desarrollo de futuras terapias.

Los estudios acerca del efecto de compuestos fenólicos sobre la IL-8 son escasos y la mayoría de ellos proceden de extractos vegetales (Romier-Crouzet, Van De Walle et al. 2009) (Bodet, Chandad et al. 2007), entre los que destacan

mayoritariamente los de extractos obtenidos a partir del té verde (Netsch, Gutmann et al. 2006) (Trompezinski, Denis et al. 2003) (Kim, Kim et al. 2006) (Pajonk, Riedisser et al. 2006). Así, estudios sobre los efectos inhibitorios de extractos provenientes de hongos comestibles sobre la expresión de la IL-8 en la línea Caco-2, no se habían realizado anteriormente.

En este trabajo se demostró que cuando las células Caco-2 se sometían a la exposición del cóctel inflamatorio, la expresión del ARNm de IL-8 se incrementaba notablemente. El pretratamiento de las células con la mayoría de los extractos estudiados no produjo ningún efecto, pero 2 de ellos *C. cibarius* y *C. cornucopioides* inhibieron significativamente la expresión de IL-8.

Como ya se ha comentado anteriormente, el poder antiinflamatorio de los hongos se atribuye a su vasto contenido en compuestos bioactivos de alto valor medicinal, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos (Elsayed, El Enshasy et al. 2014). En este trabajo se han utilizado extractos con alto contenido en compuestos fenólicos, aunque con importantes diferencias en composición entre ellos, lo que podría explicar, al menos en parte, las diferencias en cuanto a actividad encontradas.

Extractos ricos en compuestos fenólicos de origen vegetal procedentes de distintas fuentes también cuentan con diferentes efectos antiinflamatorios (Romier-Crouzet, Van De Walle et al. 2009). La actividad antiinflamatoria del té verde se atribuye principalmente al compuesto galato de epigallocatequina. El extracto del té verde, GTE, rico en galato de epigallocatequina, moduló la expresión de IL-8 en Caco-2, mientras que analizando la actividad de galato de epigallocatequina por sí sola, el efecto fue mucho más moderado. Esto indica que además de galato de epigallocatequina, existen otros compuestos en el extracto GTE que, mediante sinergismos, hacen que su efecto sea mayor (Netsch, Gutmann et al. 2006). El análisis de los efectos de diversos compuestos fenólicos sobre la secreción de IL-8 en la línea celular Caco-2, reveló que los efectos podían ser diferentes en función del compuesto:

crisina, ácido eláxico y genisteína inhibieron la secreción de la IL-8 por diferentes vías, mientras que resveratrol incrementó la producción de IL-8 (Romier, Van De Walle et al. 2008).

Por otro lado, las vías de señalización celular NF-kB y MAPKs se han postulado como las principales rutas implicadas en la regulación de la respuesta inflamatoria (Sergent, Parys et al. 2006) (Sun, Zhou et al. 2013). Se ha demostrado que NF-kB influye sobre la regulación de la expresión de iNOS y la producción de NO (Ishiguro, Ando et al. 2006) e IL-8 (Romier, Van De Walle et al. 2008) en modelos de inflamación intestinal *in vitro*, así como que las vías de señalización de las MAPKs inhiben la expresión génica y la producción de IL-8 (Lee, Seo et al. 2007) (Akhtar, Watson et al. 2003) (Hayashi, Yamashita et al. 2000) y de NO en células epiteliales intestinales (Romier-Crouzet, Van De Walle et al. 2009), lo cual sugiere que los compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de los hongos podrían ejercer sus efectos a través de la modulación de estas vías de señalización. Los compuestos fenólicos, 2', 4', 6'-tris (metoximetoxi) chalcona y buteína, inhiben la expresión de IL-8 y la producción de IL-8 en la línea celular de epitelio intestinal HT-29, actuando ambos compuestos vía MAPK, así como influyendo también sobre NF-kB (Lee, Seo et al. 2007) (Lee, Sohn et al. 2007). Al comparar la actividad antiinflamatoria de varios extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos sobre la línea Caco-2, se ha comprobado que entre los extractos efectivos, el de mayor actividad antiinflamatoria actuaba mediante las vías NF-kB y MAPK, mientras que los demás tan sólo lo hacían a través de NF-kB (Romier-Crouzet, Van De Walle et al. 2009).

Por tanto, parece ser que el grado de actividad de extractos ricos en compuestos fenólicos depende tanto de su composición como de las vías de señalización que sean capaces de activar dichos compuestos. Así, las diferencias observadas en la actividad de los extractos estudiados en este trabajo se deberían a diferencias en la composición así como a los distintos mecanismos implicados.

En este trabajo se han encontrado diferencias entre los resultados obtenidos en la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 y en la línea celular de adenocarcinoma humano Caco-2. Esto indica que los efectos de los extractos ricos en compuestos fenólicos parecen ser dependientes de los tipos celulares estudiados. Resultados similares se han obtenido con compuestos fenólicos purificados. Por ejemplo, el polifenol crisina inducía la actividad de NF- κ B en macrófagos estimulados por LPS (Woo, Jeong et al. 2005), mientras que en Caco-2 estimuladas por IL-1 β , LPS ó TNF- α , inhibía dicha actividad (Romier, Van De Walle et al. 2008) (Chen, Chow et al. 2004). El resveratrol y la genisteína, promovían la inducción de NF- κ B iniciada por IL-1 β , TNF- α o LPS en células Caco-2 (Romier, Van De Walle et al. 2008) y en la línea intestinal humana HT-29 (Jeong, Kim et al. 2004), mientras que bloqueaban la inducción de NF- κ B en varios modelos celulares diferentes a los intestinales como monocitos humanos (THP-1), macrófagos (U-937), células linfoides (Jurkat), células epiteliales (HeLa y H4) o células pancreáticas (Csiszar, Smith et al. 2006) (Holmes-McNary and Baldwin 2000) (Manna, Mukhopadhyay et al. 2000) (Li, Ahmed et al. 2005) (Kang, Lee et al. 2001).

Estos resultados indican que las células intestinales humanas responden a los compuestos fenólicos de manera diferente a otros tipos celulares, posiblemente como consecuencia de la continua exposición a elevados niveles de polifenoles (la ingesta media de estos compuestos está estimada en 1g/día (Scalbert and Williamson 2000)). Esta exposición podría haber modificado su impronta genética en comparación, con otros tipos celulares presentes en distintos órganos o en la sangre, cuyos niveles de exposición a estos compuestos son mucho menores. Lo cual habría hecho que las células intestinales respondan ante ellos, a través de conjuntos programados de señales que son diferentes a los de otras células (Romier, Van De Walle et al. 2008).

También se han observado diferencias en los efectos que determinados compuestos fenólicos han producido sobre una misma línea celular en ensayos *in vitro*, desarrollados por un mismo equipo en un mismo laboratorio. Cosan et al., estudiaron

los efectos de resveratrol y ac. tánico sobre la actividad de iNOS en dos líneas celulares cancerígenas; la intestinal Caco-2 y la pulmonar MCF-7. Demostraron, que no sólo existían diferencias entre los efectos de los compuestos fenólicos entre los dos tipos de células, si no que tanto resveratrol como ac. tánico, dentro de una misma línea celular, en función del tiempo de exposición y de la dosis empleada provocaban efectos opuestos (Cosan, Bayram et al. 2010).

Los estímulos empleados para inducir a las células a desarrollar la respuesta inflamatoria también influyen sobre la actividad de los compuestos fenólicos dentro de una misma línea celular. El ac. caféico, inhibía la expresión de IL-8 en Caco-2 cuando las células eran estimuladas por H₂O₂, mientras que cuando se empleaba TNF- α como agente activador, no tenía ningún efecto sobre la expresión génica de IL-8 (Zhao, Shin et al. 2008).

IV.3. RELACIÓN ENTRE COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

IV.3.1. Relación entre composición fenólica de los extractos y actividad antiinflamatoria en la línea celular RAW 264.7

Aunque en los hongos se han identificado gran variedad de sustancias con actividad antiinflamatoria, los compuestos fenólicos cuentan con un amplio reconocimiento como moléculas naturales con este tipo de efectos. De hecho, algunos trabajos han encontrado correlaciones positivas entre contenido fenólico total de extractos de hongos y sus efectos antiinflamatorios (Cheung, Cheung et al. 2003; Kim, Seguin et al. 2008).

En general, se asume que en muchos casos el contenido en compuestos fenólicos de extractos tanto vegetales como de hongos determina su actividad. En este trabajo, sólo los extractos de algunas especies de hongos estudiados tuvieron un efecto antiinflamatorio en términos de inhibición de la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS y de expresión génica de iNOS, IL-1 β e IL-6. Para ver si estos efectos estaban relacionados con el contenido fenólico total de los mismos se analizó la correlación entre estos parámetros.

Tabla 21. Correlación entre la producción de NO, la expresión génica de iNOS, IL-1 β e IL-6 en células RAW 264.7 activadas con LPS y pretratadas con extractos metanólicos de hongos comestibles y el contenido fenólico total de dichos extractos. P indica el valor de significación y r el coeficiente de correlación de Pearson

		PRODUCCIÓN NO	EXPRESIÓN iNOS	EXPRESIÓN IL-1 β	EXPRESIÓN TNF- α
CONTENIDO FENÓLICO TOTAL	P	0,292	0,33	0,937	0,923
	r	0,519	0,485	0,042	-0,051

Como se observa en la tabla no se encontró correlación entre el contenido fenólico total de los extractos y su actividad sobre los macrófagos activados. Los compuestos fenólicos incluyen un amplio grupo de moléculas con una gran variedad de estructuras que determinan en gran medida su actividad (Cai, Mei et al. 2006). El perfil de compuestos fenólicos encontrados en los extractos estudiados indicó la presencia de distintos tipos de compuestos en las distintas especies estudiadas. La capacidad específica de cada uno de estos compuestos para reducir la respuesta inflamatoria podría contribuir de diferente manera en cada caso en función de su concentración, por ello se analizó la correlación entre la concentración de los distintos grupos de compuestos encontrados y la actividad de los extractos.

Tabla 22.-Correlación entre la producción de NO, la expresión génica de iNOS, IL-1 β e IL-6 en células RAW 264.7 activadas con LPS y pretratadas con extractos metanólicos de hongos comestibles y el contenido en distintos tipos de compuestos fenólicos de los mismos. P Indica el valor de significación y r el coeficiente de correlación de Pearson

		PRODUCCIÓN NO	EXPRESIÓN iNOS	EXPRESIÓN IL-1 β	EXPRESIÓN IL-6
DERIVADOS AC CINÁMICO	P	0,369	0,375	0,152	0,059
	r	0,452	0,446	-0,662	-0,794
DERIVADOS AC HIDROXIBENZOICO	P	0,262	0,291	0,697	0,475
	r	0,546	0,519	-0,205	-0,367
FLAVONOIDES	P	0,06	0,034	0,316	0,235
	r	-0,793	-0,845	0,497	0,573
PIROGALLOL	P	0,595	0,546	0,7	0,598
	r	0,405	0,454	-0,3	-0,402

Los compuestos fenólicos comprenden un grupo muy amplio de sustancias que cuentan con una gran diversidad estructural, la cual influye de manera directa sobre su actividad biológica (Cai, Mei et al. 2006). El contenido de compuestos fenólicos de los extractos de los hongos estudiados se determinó por nuestro grupo de investigación (Tabla 17).

Aunque los ácidos fenólicos fueron el grupo de compuestos más abundante encontrado en los hongos estudiados, su contenido no presenta correlación con la actividad antiinflamatoria de los extractos, lo cual sugiere que la contribución de esos compuestos a la actividad antiinflamatoria de nuestros extractos, no es relevante. Estudios llevados a cabo con derivados del ac. cinámico como ac. caféico, ac. clorogénico, ac. ferúlico y ac. p-hidroxibenzoico, provenientes de extractos etanólicos vegetales, probaron que dichos compuestos no afectan a la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (Yu, Hsu et al. 2009). En nuestro trabajo, el contenido de los derivados del ac. cinámico presentes en los extractos de hongos no correlacionó con su actividad antiinflamatoria, aunque en el caso de la expresión de la IL-6 en RAW 264.7 estimulada, sí que se observó una correlación negativa ($r = -0,794$) que por un margen muy corto, resultó no ser estadísticamente significativa ($p = 0,059$). Los derivados del ac. hidroxibenzoico también cuentan con demostrados efectos antiinflamatorios. Así, el ac. gálico, compuesto que está presente en todos nuestros extractos, disminuye la producción de TNF- α en la línea RAW 264.7 estimulada por LPS e IFN- γ (Wang and Mazza 2002), así como la expresión de IL-6 y de TNF- α en otras líneas de basófilos (KU812) y mastocitos peritoneales de ratas (RPMC) (Liu, Hu et al. 2013) (Kim, Jun et al. 2006).

Los flavonoides mostraron una correlación negativa sobre la expresión de iNOS en RAW 264.7 ($r=-0,845$; $p=0,034$). Este tipo de compuestos fenólicos también reflejaron una correlación negativa sobre la producción de NO ($r=-0,793$) que no alcanzó la significación estadística por muy poco ($p=0,06$). Lo cual sugiere que su presencia en los extractos influye en la capacidad de estos para inhibir la producción

de NO, disminuyendo la expresión de iNOS. Se han encontrado diferentes efectos en función de los flavonoides estudiados, así se ha demostrado que la catequina, presente en dos de los extractos activos: *A. bisporus* y *C. Cibarius*, inhibe la producción de TNF- α en la línea RAW 264.7 estimulada, mientras que miricitenina, presente en todos los extractos excepto en el de *H. marzuolus*, la estimula (Wang and Mazza 2002).

Por otro lado, el pirogalol sólo fue detectado en los extractos de *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius* y *C. cornucopioides*, que resultaron ser los más activos, por lo que dicho compuesto podría ser, al menos en parte, responsable de los efectos antiinflamatorios observados. Estudios previos han señalado al pirogalol como uno de los compuestos activos responsables del efecto antiinflamatorio de los extractos vegetales de *Embllica officinalis*, sobre la línea celular de epitelio bronquial (Nicolis, Lampronti et al. 2008).

Teniendo en cuenta la composición de los diferentes tipos de compuestos fenólicos de los extractos de hongos comestibles estudiados, y sus efectos sobre las líneas RAW 264.7 y Caco-2 activadas, se puede deducir que diferentes interacciones entre sus componentes como sinergismos entre pirogalol y otros tipos de compuestos presentes en nuestros extractos como flavonoides, derivados del ac. cinámico o ac. gálico, entre otros, podrían explicar las diferencias de actividad encontradas en los extractos estudiados.

IV.3.2. Relación entre composición fenólica de los extractos y actividad antiinflamatoria en la línea celular Caco-2

Se estudió la posible correlación entre la capacidad antiinflamatoria de los extractos sobre Caco-2 y los compuestos fenólicos de los mismos. Los resultados como puede observarse en las tablas 23 y 24, indican que ni el contenido fenólico total de los extractos ni los diferentes grupos de compuestos fenólicos guardan correlación alguna con el efecto de los extractos sobre la producción de NO en las células Caco-2 activadas.

Algunos trabajos han demostrado la existencia de una fuerte correlación entre composición fenólica y actividad antiinflamatoria (Cohan 2012) sobre la línea Caco-2, aunque en otros, al igual que en este trabajo, no se encontró correlación entre contenido fenólico de los extractos y actividad antiinflamatoria de los mismos (Romier-Crouzet, Van De Walle et al. 2009).

Tabla 23. Correlación entre el contenido fenólico total y los diferentes tipos de compuestos presentes en los extractos metanólicos de hongos comestibles, y la producción de NO en células Caco-2 estimuladas y tratadas con los mismos. P indica el valor de significación y r el coeficiente de correlación de Pearson

		CONTENIDO FENÓLICO TOTAL	DERIVADOS AC CINÁMICO	DERIVADOS AC HIDROXIBENZOICO	FLAVONOIDES	PIROGALOL
PRODUCCIÓN NO	P	0,876	0,331	0,551	0,159	0,798
	r	0,066	0,396	0,249	-0,595	0,159

Tabla 24. Correlación entre el contenido fenólico total y los diferentes tipos de componentes de los extractos metanólicos de hongos comestibles, y la expresión de iNOS e IL-8 de las células Caco-2. P señala el valor de significación y r el coeficiente de correlación de Pearson

		CONTENIDO FENÓLICO TOTAL	DERIVADOS AC CINÁMICO	DERIVADOS AC HIDROXIBENZOICO	FLAVONOIDES	PIROGALLOL
EXPRESIÓN iNOS	P	0,736	0,218	0,777	0,127	0,991
	r	-0,143	0,489	0,12	-0,633	-0,007
EXPRESIÓN IL-8	P	0,651	0,286	0,953	0,117	0,92
	r	-0,191	0,432	-0,025	-0,646	-0,063

Tampoco se encontraron correlaciones entre la expresión génica de iNOS e IL-8 en la células Caco-2 activadas y pretratadas con los extractos y la composición fenólica de los mismos. Se ha demostrado previamente que derivados del ac. cinámico como el ac. caféico reducen la producción de citoquinas proinflamatorias en células Caco-2 (Zhao, Shin et al. 2008), sin embargo, otros trabajos demuestran efectos opuestos de los derivados del ac. cinámico, como el ac. clorogénico que no influía sobre la producción de IL-6 e IL-8 en Caco-2 estimuladas por cóctel inflamatorio (Melillo de Magalhaes, Dupont et al. 2012). En nuestro trabajo no se ha podido establecer una correlación entre la presencia de este tipo de compuestos y la actividad de los extractos, lo que sugiere que la actividad demostrada por los mismos debe ser el resultado de la combinación de sus componentes y las interacciones entre ellos.

Los compuestos fenólicos de origen natural comprenden una amplia gama de compuestos biológicamente activos. En los últimos años están despertando un gran interés sus efectos antiinflamatorios. De hecho, 12 de los 40 medicamentos antiinflamatorios aprobados entre 1983 y 1994 fueron derivados o estuvieron basados en estos productos naturales (Cragg, Newman et al. 1997). Las vías mediante las cuales ejercen su actividad antiinflamatoria son muy variadas (Yoon and Baek 2005), por lo que los compuestos fenólicos, poseen un gran potencial para convertirse en la próxima generación de factores dietéticos para combatir la inflamación, más allá de las drogas sintéticas.

Recientemente se ha comprobado que, aparte de las fuentes de origen vegetal, los hongos también cuentan en su composición con compuestos fenólicos (Palacios, Lozano et al. 2011) (Elsayed, El Enshasy et al. 2014). Sin embargo, los estudios sobre la presencia de este tipo de compuestos en los hongos son muy escasos y en general están limitados a especies medicinales. Este trabajo presenta la composición de extractos metanólicos ricos en compuestos fenólicos obtenidos a partir de 8 especies de hongos comestibles, de consumo habitual en nuestro país. Estas especies han sido muy poco estudiadas hasta el momento y en algunos casos como *H. marzuolus* y *C. cornucopioides*, ésta es la primera vez que se realiza un estudio sobre su composición fenólica.

Los resultados obtenidos han demostrado la presencia de distintos grupos de compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides (miricetina y catequina) y fenoles (pirogalol). La presencia en los hongos de este tipo de compuestos junto con otros muchos compuestos bioactivos, hace que actualmente se empiece a considerar a los hongos como alimentos funcionales. Varios de sus efectos bioactivos como la actividad inmunomoduladora han sido ampliamente estudiados, sin embargo su actividad antiinflamatoria, ha sido por el momento poco abordada. En este trabajo investigamos la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos obtenidos de las especies de hongos comestibles: *A. bisporus*, *L. deliciosus*, *C. cibarius*, *P. ostreatus*, *B. edulis* y

C. cornucopioides sobre la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7 activada por LPS. Los resultados indicaron que las especies de hongos que presentaron una mayor actividad antiinflamatoria fueron *A. bisporus*, *L. deliciosus* y *C. cibarius*, puesto que fueron capaces de reducir la producción de NO en macrófagos activados, así como de inhibir la expresión de los ARNm de iNOS, IL-1 β e IL-6. El extracto de *C. cornucopioides* sólo disminuyó la producción de NO y la expresión de iNOS, mientras que el resto de las especies no presentaron efectos antiinflamatorios.

Las enfermedades inflamatorias intestinales constituyen una de las enfermedades crónicas cuyo tratamiento aún no está completamente resuelto, por lo que la búsqueda de compuestos naturales que reduzcan la inflamación sin producir efectos secundarios resulta de gran interés. La alta ingesta diaria de compuestos fenólicos integrantes de la dieta (1 g/día), junto a su pobre absorción intestinal, hace que se encuentren en el tracto gastrointestinal en elevadas concentraciones (200 μ mol/l) (Scalbert and Williamson 2000) (Manach, Scalbert et al. 2004) y por lo tanto, pueden ser fundamentales para combatir este tipo de enfermedades.

Puesto que los extractos que se obtuvieron en este trabajo presentaron cierta actividad antiinflamatoria en macrófagos, se estudió su posible efecto en la inflamación intestinal *in vitro*. Para ello, se escogió la línea celular de adenocarcinoma humano Caco-2, que comparte muchas características fisiológicas y funcionales con los enterocitos, por lo que está ampliamente reconocida como una línea celular idónea para estudios *in vitro*, de inflamación intestinal.

El modelo de inflamación intestinal elegido, es un modelo estático como consecuencia del empleo de un solo tipo celular, esto hace que no se refleje completamente la situación que tiene lugar *in vivo*, donde otros tipos celulares (células Globet productoras de moco, células M, células Paneth y células inmunes) junto a la microflora intestinal, participan en la respuesta inflamatoria del intestino (Romier, Schneider et al. 2009). Sin embargo, este trabajo se centra en la mediación de la

respuesta inflamatoria que las células epiteliales intestinales realizan, debido al papel crucial que estas desempeñan en la patogénesis de las EII.

Los resultados obtenidos con este modelo indican que solamente el extracto fenólico de *C. cibarius* produjo una inhibición de la producción de NO y de la expresión de iNOS e IL-8, en células Caco-2 estimuladas por un cóctel inflamatorio. Además, *C. cornucopioides* e *H. marzuolus*, modularon de modo opuesto la expresión de IL-8; inhibiéndola el primero, y estimulándola el segundo. Sin embargo, los extractos procedentes de otras especies que también habían demostrado un efecto antiinflamatorio en macrófagos RAW 264.7 como *A. bisporus* y *L. deliciosus* no tuvieron ningún efecto en células intestinales, lo que demuestra que dichos efectos dependen del tipo celular sobre el que actúan.

En general, el contenido en compuestos fenólicos de un extracto determina su actividad, por ello se estudió la posible relación entre el contenido fenólico de los distintos extractos y sus efectos antiinflamatorios, con el fin de encontrar los compuestos responsables de tales efectos. No se encontró ninguna correlación entre la actividad y el contenido fenólico total ni tampoco con los distintos compuestos encontrados. Aunque no se pudo demostrar que ningún compuesto en concreto fuese responsable de la actividad, los resultados apuntan a que tanto los flavonoides como los derivados cinámicos de los extractos podrían participar en la actividad antiinflamatoria de los mismos. Además, la presencia de pirogalol en todos los extractos activos sobre RAW 264.7, así como en el único activo en Caco-2, sugiere que este compuesto también podría influir activamente sobre su actividad antiinflamatoria. Posiblemente el resultado neto de la actividad de los extractos sea producto de la contribución parcial de cada uno de sus componentes activos y de sinergismos y otras interacciones existentes entre ellos.

Por tanto, los efectos antiinflamatorios encontrados en los extractos ricos en compuestos fenólicos obtenidos a partir de hongos comestibles, parecen ser dependientes de factores como las células sobre las que actúan, las vías de

señalización que desencadenan o los estímulos inflamatorios implicados, así como de la propia composición del extracto; de manera que no pueden ser explicados por un único y definitivo mecanismo (Sergent, Piront et al. 2010) (Zhao, Shin et al. 2008) (Tunon, García-Mediavilla et al. 2009).

Todo ello sugiere que los hongos comestibles presentan un gran potencial para ser considerados como alimentos funcionales así como una fuente de obtención de agentes antiinflamatorios naturales. Algunos de los extractos aquí estudiados podrían ser particularmente prometedores para la prevención de la inflamación y particularmente, de la inflamación intestinal.

V. CONCLUSIONES

1.- Los extractos metanólicos obtenidos a partir de las especies de hongos comestibles: *Agaricus bisporus*, *Lactarius deliciosus*, *Cantharellus cibarius*, *Pleurotus ostreatus*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Hygrophorus marzuolus* y *Craterellus cornucopioides*, presentan en su composición compuestos fenólicos. El contenido fenólico total de los mismos varía en función de la especie considerada, siendo *Hygrophorus marzuolus* la especie que presenta un mayor contenido y *Boletus edulis* la de menor.

2.- Los compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos de hongos comestibles pertenecen a cuatro grupos de compuestos: derivados del ac. cinámico, derivados del ac. hidroxibenzoico, flavonoides y fenoles, siendo los ácidos fenólicos los compuestos mayoritarios.

3.- Todos los extractos estudiados poseen actividad antioxidante, medida como capacidad de absorción de radicales de oxígeno. Dicha actividad varía en función de la especie estudiada; siendo *Calocybe gambosa*, *Boletus edulis* y *Craterellus cornucopioides* las especies más activas.

4.- Ni el contenido fenólico total de los extractos metanólicos, ni los contenidos de los cuatro grupos de compuestos fenólicos identificados, correlacionan con la capacidad de absorción de radicales de oxígeno de los mismos. Esto indica que dicha actividad antioxidante es el resultado de interacciones entre los distintos compuestos fenólicos presentes en los hongos estudiados.

5.- Los extractos metanólicos de las especies *Agaricus bisporus*, *Lactarius deliciosus*, *Cantharellus cibarius* y *Craterellus cornucopioides* presentan actividad antiinflamatoria, *in vitro*, sobre la línea celular RAW 264.7. El pretratamiento de las células con dichos extractos produce una reducción en la producción de NO y en la expresión de los genes proinflamatorios iNOS, IL-1 β , e IL-6 inducidas por LPS.

6.- Los extractos metanólicos de las especies *Cantharellus cibarius* y *Craterellus cornucopioides*, además, presentan actividad antiinflamatoria *in vitro*, sobre la línea celular Caco-2. El pretratamiento de las células con dichos extractos produce una reducción en la producción de NO y en la expresión de los genes proinflamatorios iNOS e IL-8 inducidas por un cóctel inflamatorio.

7.- Ni el contenido fenólico total, ni los contenidos de los grupos de compuestos fenólicos de los extractos estudiados, correlacionan con la inhibición de la respuesta inflamatoria producida sobre células estimuladas RAW 264.7 y Caco2; lo que indica que la variedad de compuestos fenólicos presentes en los extractos y las interacciones entre ellos determinan la actividad final de los mismos.

8.- Aunque no se ha podido identificar un compuesto o grupo de compuestos fenólicos responsables de la actividad antiinflamatoria de los extractos estudiados, el pirogalol está presente exclusivamente en las especies activas, lo que indica que este compuesto debe ser responsable, al menos en parte, de dicha actividad. Sinergismos entre el pirogalol y otros compuestos activos como los flavonoides determinan las diferencias de actividad de los distintos extractos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aarons, A. and L. Borish (1993). "Cytokines and inflammation." Immunomethods **3**: 3-12.
- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman (2004). Inmunología celular y molecular.
- Adachi, Y., M. Okazaki, et al. (1994). "Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1->3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*." Biol Pharm Bull. **17**(12): 1554-60.
- Agrahar-Murugkar, D. and G. Subbulakshmi (2005). "Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya." Food Chemistry **89**(4): 599-603.
- Aguilera, P., M. Ruiz-Tachiquín, et al., Eds. (2014). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, Instituto Nacional de Ecología.
- Ahmad, N., L. C. Chen, et al. (2002). "Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia." J Leukoc Biol **71**(6): 1005-11.
- Akhtar, M., J. L. Watson, et al. (2003). "Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway." Faseb J **17**(10): 1319-21.
- Akiyama, H., M. Endo, et al. (2011). "Agaricine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937." Biochim Biophys Acta **1810**(5): 519-25.
- Al-Dbass, A. M., S. K. Al-Daihan, et al. (2012). "*Agaricus blazei* Murrill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats." Saudi J Biol Sci **19**(3): 303-9.
- Al-Sadi, R. M. and T. Y. Ma (2007). "IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability." J Immunol **178**(7): 4641-9.
- Alappat, L. and A. B. Awad (2010). "Curcumin and obesity: evidence and mechanisms." Nutr Rev **68**(12): 729-38.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, et al. (1996). Introductory Mycology. New York, U.S.A., John Wiley and Sons (4th Ed.).
- Alves, C. Q., J. M. David, et al. (2010). "Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos." Química Nova **33**(10): 2202-2210.
- Alves, M. J., I. C. Ferreira, et al. (2013). "Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies." J Appl Microbiol **115**(2): 346-57.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-22.
- Araújo, E. A., A. F. de Carvalho, et al. (2010). "Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin." J. Funct. Foods. **2**(1): 85-89.
- Arribas, M. B. (2009). "Probióticos, una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune" Univ. De Granada.

- Asatiani, M. D., S. P. Wasser, et al. (2011). "The Shaggy Inc Cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (O.F.Mull.: Fr.) Pers. (Agaricomycetidae) substances interfere with H₂O₂ induction of the NF-kappaB pathway through inhibition of Ikappaalpha phosphorylation in MCF7 breast cancer cells." Int J Med Mushrooms **13**(1): 19-25.
- Athanasakis, G., N. Aligiannis, et al. (2013). "Antioxidant properties of the wild edible mushroom *Lactarius salmonicolor*." J Med Food **16**(8): 760-4.
- Autore, G., L. Rastrelli, et al. (2001). "Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescencia alata* and its derived flavonols." Life Science **70**(5): 523-34.
- Badimon, L., G. Vilahur, et al. (2010). "Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials." Cardiovasc Ther **28**(4): 202-15.
- Balsano, C. and A. Alisi (2009). "Antioxidant effects of natural bioactive compounds." Curr Pharm Des **15**(26): 3063-73.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol. **18**: 767-811.
- Bang, T. H., H. Suhara, et al. (2014). "Wild Mushrooms in Nepal: Some Potential Candidates as Antioxidant and ACE-Inhibition Sources." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2014**: 11 Pages.
- Bao, X., J. Fang, et al. (2001). "Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*." Biosci. Biotechnol. Biochem. **65**(11): 2384-91.
- Bao, X., X. S. Wang, et al. (2002). "Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*." Phytochemistry **59**(2): 175-181.
- Barros, L., P. Baptista, et al. (2007a). "Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal." Food Chemistry **105**: 140-145.
- Barros, L., P. Baptista, et al. (2007b). "Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of portuguese wild edible mushrooms." J. Agric. Food Chem. **55**: 4781-4788.
- Barros, L., P. Baptista, et al. (2007c). "Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms." J Agric Food Chem **55**: 8766-71.
- Barros, L., D. M. Correia, et al. (2008). "Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method." Food Chemistry **110**(4): 1046-1050.
- Barros, L., T. Cruz, et al. (2008). "Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals." Food and Chemical Toxicology **46**(8): 2742-2747.
- Barros, L., M. Dueñas, et al. (2009). "Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species." Food and Chemical Toxicology **47**(6): 1076-1079.

- Barros, L., S. Falcao, et al. (2008). "Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays." Food Chemistry **111**(1): 61-66.
- Barros, L., M. J. Ferreira, et al. (2007). "Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities." Food Chemistry **103**: 413-419.
- Barros, L., B. A. Venturini, et al. (2008). "Chemical composition and biological properties of portuguese wild mushrooms: a comprehensive study." J Agric Food Chem **56**(10): 3856-62.
- Barton, G. M. (2008). "A calculated response:control of inflammation by the innate immune system." J Clin Invest **118**(2): 413-20.
- Batra, P., A. K. Sharma, et al. (2013). "Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits." Int J Med Mushrooms **15**(2): 127-43.
- Baxter (1999). Seminario LIOFILIZACIÓN. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia.
- Becker, E. M., L. R. Nissen, et al. (2004). "Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. ." European Food Research and Technology **219**(6): 561-571.
- Beiersmann, C., A. Sanou, et al. (2007). "Malaria in rural Burkina Faso: local illness concepts, patterns of traditional treatment and influence on health-seeking behaviour." Malar J **6**: 106.
- Berger, A., D. Rein, et al. (2004). "Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs." Lipids Health Dis. **18**: 3:2.
- Bickel, M. (1993). "The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation." J Periodontol **64**(5 Suppl): 456-60.
- Bobek, P. and S. Galbavý (1999). "Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbits." Nahrung. **43**(5): 339-42.
- Bocker, U., O. Yezersky, et al. (2003). "Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression." Int J Colorectal Dis **18**(1): 25-32.
- Bodet, C., F. Chandad, et al. (2007). "Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts." Eur J Oral Sci **115**(1): 64-70.
- Borchers, A. T., C. L. Keen, et al. (2004). "Mushrooms, tumors, and immunity: an update." Exp Biol Med (Maywood) **229**(5): 393-406.
- Borchers, A. T., A. Krishnamurthy, et al. (2008). "The immunobiology of mushrooms." Exp. Biol. Med. **233**: 259-276.
- Brandt, C. R. and F. Piraino (2000). "Mushroom antivirals." Recent, Res. Dev. Antimicrob. Agents Chemother. **4**: 11-26.
- Brown, A. C., C. I. Waslien, et al. (2003). STRESS AND NUTRITION. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). Oxford, Academic Press: 5628-5636.

- Bruewer, M., A. Luegering, et al. (2003). "Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms." J Immunol **171**(11): 6164-72.
- Burns, J., T. Yokota, et al. (2002). "Plant foods and herbal sources of resveratrol." J Agric Food Chem **50**(11): 3337-40.
- Cai, Y.-Z., S. Mei, et al. (2006). "Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants." Life Sciences **78**(25): 2872-2888.
- Calder, P. C., R. Albers, et al. (2009). "Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition." British Journal of Nutrition **101**: S1-+.
- Cao, G. and R. L. Prior (2001). Measurement of total antioxidant capacity in nutritional and clinical studies. Handbook of Antioxidants. M. Dekker. New York, Cadenas, E., Packer, L.: 47-55.
- Cao, L. Z. and Z. B. Lin (2003). "Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro." Acta Pharmacol. Sin. **24**(4): 321-6.
- Carneiro, A. A., I. C. Ferreira, et al. (2013). "Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*." Food Chem **138**(4): 2168-73.
- Carvajal, A. E. S. S., E. A. Koehnlein, et al. (2012). "Bioactives of fruiting bodies and submerged cultura mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A.blazei) and their antioxidant properties." LWT - Food Science and Technology **46**(2): 493-499.
- Chanet, A., D. Milenkovic, et al. (2012). "Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection?" J Agric Food Chem **60**(36): 8809-22.
- Chang, R. (1996). "Functional properties of edible mushrooms." Nut Rev **54**(11): S91-S93.
- Chang, S. T. and S. P. Wasser (2012). "The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health." Int J Med Mushrooms **14**(2): 95-134.
- Chen, C. C., M. P. Chow, et al. (2004). "Flavonoids inhibit tumor necrosis factor- α -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor- κ B: structure-activity relationships." Mol Pharmacol **66**(3): 683-693.
- Chen, G., Y. C. Luo, et al. (2008). "Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet." J. Food Sci. **73**(6): H103-8.
- Chen, J. and R. Seviour (2007). "Medicinal importance of fungal beta-(1-3),(1-6)-glucans." Mycological Research **III**: 635-652.
- Chen, J., D. Mao, et al. (2012). "Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*." Food Chem. **130**: 687-694.
- Chen, N. H. and J. J. Zhong (2011). "p53 is important for the anti-invasion of ganoderic acid T in human carcinoma cells." Phytomedicine **18**(8-9): 719-25.

- Chen, W., Z. Zhao, et al. (2011). "Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention." Carbohydrate Polymers **85**(2): 369-375.
- Cheng, H. H., W. C. Hou, et al. (2002). "Interactions of lipid metabolism and intestinal physiology with *Tremella fuciformis* Berk edible mushroom in rats fed a high-cholesterol diet with or without Nebacitin." J Agric Food Chem **50**(25): 7438-43.
- Cheung, L. M., P. C. K. Cheung, et al. (2003). "Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts." Food Chemistry **81**(2): 249-255.
- Chihara, G., J. Hamuro, et al. (1970). "Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom)." Cancer Res **30**(11): 2776-81.
- Chou, T. C., C. Y. Shih, et al. (2011). "Inhibitory Effect of α -Lipoic Acid on Platelet Aggregation Is Mediated by PPARs." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(7): 3050-3059.
- Chung, M. Y., S. K. Jung, et al. (2015). "Ethanol extract of *Sarcodon asparatus* mitigates inflammatory responses in lipopolysaccharide-challenged mice and murine macrophages." J Med Food.
- Cimino, S., G. Sortino, et al. (2012). "Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer." Oxid Med Cell Longev: 632959.
- Clifford, M. and J. E. Brown (2006). Dietary flavonoids and health - broadening the perspective. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. M. A. a. K. R. Markham, *CRC Press 2005*: 319-370.
- Cohan, M., D. P. Naughton, et al. (2012). "An investigation of the relationship between the anti-inflammatory activity, polyphenolic content, and antioxidant activities of cooked and in vitro digested culinary herbs." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012(Article ID 627843): 9 pages.
- Cosan, D. T., B. Bayram, et al. (2010). "Role of phenolic compounds in nitric oxide synthase activity in colon and breast adenocarcinoma." Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals **25**(5): 577-580.
- Costa, J. (2004). "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real." Enferm Infecc Microbiol Clin **22**(5): 299-305.
- Cragg, G. M., D. J. Newman, et al. (1997). "Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents." Semin Oncol **24**(2): 156-63.
- Croccia, C., A. J. Lopes, et al. (2013). "Royal sun medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* (higher Basidiomycetes) and the attenuation of pulmonary inflammation induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)." Int J Med Mushrooms **15**(4): 345-55.
- Crosby, G. A. (2005). "Lignans in food and nutrition." Food Technology **59**(5): 32-35.
- Crowther, J. R., Ed. (1995). ELISA: Theory and Practice, Springer Science & Business Media.

- Crozier, A. J., I.B.; Clifford, M.N. , Ed. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.
- Csiszar, A., K. Smith, et al. (2006). "Resveratrol attenuates TNF- α -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- κ B inhibition." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **291**(4): H1694-H1699.
- Dajas, F. (2012). "Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin." J Ethnopharmacol **143**(2): 383-96.
- Danese, S., E. Angelucci, et al. (2008). "Biological agents for ulcerative colitis: hopes and hopes." Med Res Rev **28**(2): 201-18.
- Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, et al. (2004). "Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay." J Agric Food Chem. **52**(1): 48-54.
- De Diego Calonge, F., Ed. (2011). Hongos medicinales. Madrid. México.
- de Lorgeril, M., P. Salen, et al. (1999). "Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction - Final report of the Lyon Diet Heart Study." Circulation **99**(6): 779-785.
- Del Rio, D., A. Rodriguez-Mateos, et al. (2013). "Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases." Antioxid Redox Signal. **18**(14): 1818-92.
- Del Signore, A., F. Romeo, et al. (1997). "Content of phenolic substances in basidiomycetes." Mycological Research **101**(5): 552-556.
- Denisov, V., W. Strong, et al. (2008). "Development and validation of RQI: an RNA quality indicator for the Experion automated electrophoresis system." Bio-Rad Bulletin #5761.
- Diplock, A. T., J. L. Charleux, et al. (1998). "Functional food science and defence against reactive oxidative species." Br J Nutr **80 Suppl 1**: S77-112.
- Donadio, S., L. Carrano, et al. (2002). "Targets and assays for discovering novel antibacterial agents." J Biotechnol **99**(3): 175-85.
- Dornberger, K., W. Ihn, et al. (1986). "Antibiotics from basidiomycetes. Evidence for the occurrence of the 4-hydroxybenzenediazonium ion in the extracts of *Agaricus xanthodermus* genevier (agaricales)." Tetrahedron Letters **27**(5): 559-560.
- Dugler, B., A. Gonuz, et al. (2004). "Antimicrobial activity of the macrofungus *Cantharellus cibarius*." Pakistan Journal of Biological Sciences **7**: 1535-1539.
- Duncan, C. J. G., N. Pugh, et al. (2002). "Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*." J. Agric. Food Chem **50**: 5683-85.
- Duque, J., M. D. Diaz-Munoz, et al. (2006). "Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 β in colon carcinoma cells." Cell Signal **18**(8): 1262-9.
- el-Mekkawy, S., M. R. Meselhy, et al. (1998). "Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*." Phytochemistry **49**(6): 1651-7.
- Elisashvili, V. (2012). "Submerged cultivation of medicinal mushrooms: Bioprocesses and products (review)." International Journal of Medicinal Mushrooms **14**(3): 211-239.

- Elmastas, M., O. Isildak, et al. (2007). "Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms." Journal of Food Composition and Analysis **20**(3-4): 337-345.
- Elsayed, E. A., H. El Enshasy, et al. (2014). "Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications." Mediators Inflamm **2014**: 805841.
- Ellertsen, L. K., G. Hetland, et al. (2006). "Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays." Int Immunopharmacol **6**(2): 133-43.
- Esposito, K., R. Marfella, et al. (2004). "Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome - A randomized trial." Jama-Journal of the American Medical Association **292**(12): 1440-1446.
- Fangkrathok, N., J. Junlatat, et al. (2013). "In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract." J Ethnopharmacol **147**(3): 631-7.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ /World Health Organization.1991). "Protein quality evaluation. Report of joint FAO/WHO expert consultation." FAO Food and Nutrition Paper 51: 19-21.
- Feng, D., W. H. Ling, et al. (2010). "Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-kB in macrophages." Inflamm. Res. **59**: 115-121.
- Ferrari, M., M. C. Fornasiero, et al. (1990). "MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*." Journal of Immunological Methods **131**(2): 165-172.
- Ferreira, I. C., L. Barros, et al. (2009). "Antioxidants in wild mushrooms." Curr Med Chem. **16**(12): 1543-60.
- Ferreira, I. C. F. R., P. Baptista, et al. (2007). "Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity." Food Chemistry **100**(4): 1511-1516.
- Fisher, M. and L. X. Yang (2002). "Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy." Anticancer Res. **22**(3): 1737-54.
- Fleming, A. (1929). "On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*." Br J Exp Pathol **10**(3): 226–236.
- Fogh, J., W. C. Wright, et al. (1977). "Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors." J Natl Cancer Inst **58**(2): 209-14.
- Forrest, K., D. Symmons, et al. (2004). "Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease?" Aliment Pharmacol Ther **20**(10): 1035-43.
- Forsythe, R. M., D. Z. Xu, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion." Shock **17**(3): 180-4.
- Fraga, C. G., M. Galleano, et al. (2010). "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols." Mol Aspects Med **31**(6): 435-45.

- Frankel, E. N. and A. B. S. Meyer (2000). "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(13): 1925-1941.
- Fukushima, M., T. Ohashi, et al. (2001). "Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats." Exp. Biol. Med. **226**(8).
- Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." Science **294**: 1871-1875.
- Furusawa, E., S. C. Chou, et al. (1992). "Antitumor activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in synergetic mice." Phytotherapy Research **6**(6): 300–304.
- Ganeshpurkar, A. and G. Rai (2013). "Experimental evaluation of analgesic and anti-inflammatory potential of Oyster mushroom *Pleurotus florida*." Indian J Pharmacol **45**(1): 66-70.
- García-Lafuente, A., E. Guillamón, et al. (2009). "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease." Inflamm Res. **58**(9): 537-52.
- García-Lafuente, A., C. Moro, et al. (2010). "Mushrooms as a Source of Anti-Inflammatory Agents." Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry **9**(2): 125-141
- Gassul, M. A., F. Gomollón, et al., Eds. (2007). Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
- Glamoclija, J., D. Stojkovic, et al. (2015). "A comparative study on edible *Agaricus* mushrooms as functional foods." Food Funct **6**(6): 1900-10.
- Glazer, A. N. (1990). "Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species." Methods Enzymol. **186**: 161-168.
- Green, L. C., D. A. Wagner, et al. (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Anal Biochem **126**(1): 131-8.
- Greenhough, A., H. J. M. Smartt, et al. (2009). "The COX-2/PGE(2) pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment." Carcinogenesis **30**(3): 377-386.
- Griess, P. (1879). "Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen" Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **12**(1): 426-428.
- Guillamón, E., A. García-Lafuente, et al. (2010). "Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases." Fitoterapia **81**(7): 715-23.
- Haddad, P. S., G. A. Azar, et al. (2005). "Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic disease." Evid Based Complement Alternat Med **2**(4): 513-20.
- Hämäläinen, M., R. Nieminen, et al. (2007). "Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages." Mediators Inflamm **2007**: 45673.

- Han, J. H., H. J. Lee, et al. (2014). "Total antioxidant capacity of the Korean diet." Nutr Res Pract **8**(2): 183-91.
- Harada, N., N. Kodama, et al. (2003). "Relationship between dendritic cells and the D-fraction-induced Th-1 dominant response in BALB/c tumor-bearing mice." Cancer Lett. **192**(2): 181-7.
- Harborne, J. B. and C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry **55**(6): 481-504.
- Hawksworth, D. L. (1991). "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation." Mycological Research **95**(6): 641-655.
- Hawksworth, D. L. (2001). "Mushrooms: the extent of the unexplored potential." International Journal of Medicinal Mushrooms **3**(4).
- Hayashi, R., N. Yamashita, et al. (2000). "Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms." Eur Respir J **16**(3): 452-8.
- Heid, C. A., J. Stevens, et al. (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-94.
- Hermisdorff, H. H., M. A. Zulet, et al. (2010). "Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study." Nutr Metab (Lond) **7**: 42.
- Hidalgo, I. J., T. J. Raub, et al. (1989). "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability." Gastroenterology **96**(3): 736-49.
- Hirasawa, M., N. Shouji, et al. (1999). "Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom)." Int J Antimicrob Agents **11**(2): 151-7.
- Hiroshi, S. and M. Takeda, Eds. (1993). Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Qué. Mushroom biology and mushroom products, The Chinese University Press, Hong Kong.
- Hishida, I., H. Nanba, et al. (1988). "Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (maitake)." Chem Pharm Bull (Tokyo). **36**(5): 1819-27.
- Hobbs, C. (2003). Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing, & Culture.
- Holmes-McNary, M. and A. S. J. Baldwin (2000). "Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase." Cancer Res **60**(13): 3477-83.
- Holy, E. W., M. Forestier, et al. (2011). "Dietary alpha-linolenic acid inhibits arterial thrombus formation, tissue factor expression, and platelet activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(8): 1772-80.
- Hseu, Y.-C., F.-Y. Wu, et al. (2005). "Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via NF- κ B pathway." Int. Immunopharmacol. **5**: 1914-1925.

- Hsieh, K. Y., C. I. Hsu, et al. (2003). "Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice." Clin Exp Allergy. **33**(11): 1595-602.
- Hsu, H. C., C. I. Hsu, et al. (1997). "Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*." Biochem. J. **323**(Pt 2): 557-65.
- Hu, F. B. (2002). "Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology." Curr Opin Lipidol **13**(1): 3-9.
- Hu, H., Z. Zhang, et al. (2009). "Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus*." J. Biosci. Bioeng. **107**(1): 42-48.
- Hu, S. H., Z. C. Liang, et al. (2006). "Antihyperlipidemic and antioxidant effects of extracts from *Pleurotus citrinopileatus*." J. Agric. Food Chem. **54**(6): 2103-10.
- Huang, H. Y., S. Y. Chieh, et al. (2011). "Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice." J Ethnopharmacol **133**(2): 460-6.
- Huang, N. L. (2002). "Inonotus obliquus " Edible Fungi of China **21**(7).
- Ikekawa, T. (1995). "Enokitake, *Flammulina velutipes*: Host-mediated antitumor polysaccharides." Food Reviews International **11**(1): 203-206.
- Inoue, A., N. Kodama, et al. (2002). "Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion." Biol. Pharm. Bull. **25**(4): 536-40.
- Ishiguro, K., T. Ando, et al. (2006). "Paeonol attenuates TNBS-induced colitis by inhibiting NF-kappaB and STAT1 transactivation." Toxicol Appl Pharmacol **217**(1): 35-42.
- Ishikawa, N. K., Y. Fukushi, et al. (2001). "Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*." J. Nat. Prod. **64**(7): 932-4.
- Isolauri, E. (2001). "Probiotics in human disease." Am J Clin Nutr **73**(6): 1142S-1146S.
- Itoh, A., K. Isoda, et al. (2009). "Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury." Biol Pharm Bull **32**(7): 1215-9.
- Iwashina, T. (2000). "The structure and distribution of the flavonoids in plants." Journal of Plant Research **113**(3): 287-299.
- James, M. J., R. A. Gibson, et al. (2000). "Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production." Am J Clin Nutr **71**(1 Suppl): 343S-8S.
- Jaworska, G. y., E. Bernas, et al. (2008). "Establishing the optimal period of storage for frozen *Agaricus bisporus*, depending on the preliminary processing applied." International Journal of Refrigeration **31**(6): 1042-1050.
- Jayakumar, T., P. A. Thomas, et al. (2009). "In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*." Innovative Food Science & Emerging Technologies **10**(2): 228-234.
- Jedinak, A., S. Dudhgaonkar, et al. (2011). "Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-kappaB and AP-1 signaling." Nutr J **10**: 52.

- Jeong, W. S., I. W. Kim, et al. (2004). "Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway." Pharm Res **21**(4): 661-70.
- Jeurink, P. V., C. L. Noguera, et al. (2008). "Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells." Int. Immunopharmacol. **8**: 1124-1133.
- Jin, M., H. J. Jung, et al. (2003). "Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*." Exp Biol Med **228**: 749-758.
- Jones, K. (1997). Cordyceps: Tonic food of ancient China.
- Jong, S. C. and J. M. Birmingham (1993). "Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom." Adv Appl Microbiol **39**: 153-84.
- Jong, S. C. and X. T. Yang, Eds. (1999). PSP- a powerful biological response modifier from the mushroom *Coriolus versicolor*. Yang, Q.Y. International Symposium on Traditional Chinese Medicine and Cancer: Development and Clinical Validation—*Advances research in PSP*.
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). "Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics." Journal of Agricultural and Food Chemistry **33**(2): 213-217.
- Jung, H. A., M. J. Jung, et al. (2003). "Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation." Arch Pharm Res. **26**(10): 809-15.
- Kalac, P. (2009). "Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review." Food Chemistry **113**(1): 9-16.
- Kalac, P. (2013). "A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms." J Sci Food Agric **93**(2): 209-18.
- Kalogeropoulos, N., A. E. Yanni, et al. (2013). "Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece." Food Chem Toxicol **55**: 378-85.
- Kaneda, T. and S. Tokuda (1966). "Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats." J Nutr. **90**(4): 371-6.
- Kaneko, Y. and G. Chihara (1992). "Potentiation of host resistance against microbial infections by lentinan and its related polysaccharides." Adv Exp Med Biol **319**: 201-15.
- Kang, J. L., H. W. Lee, et al. (2001). "Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide." Am J respir Crit Care Med **164**(12): 2206-12.
- Kanwar, J., M. Taskeen, et al. (2012). "Recent advances on tea polyphenols." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 111-31.
- Karaman, M., E. Jovin, et al. (2010). "Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents." Phytother Res **24**(10): 1473-81.
- Kawagashi, H., M. Ando, et al. (1990). "Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceus*." Tetrahedron Letters **31**(3): 373-376.

- Kawagashi, H., M. Ando, et al. (1991). "Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericum erinaceus*." Tetrahedron Letters **32**(35): 4561–4564.
- Keleş, A., I. Koca, et al. (2011). "Antioxidant properties of wild edible mushrooms." Journal of Food Processing & Technology **2**(6): 130–136.
- Keys, A., A. Menotti, et al. (1986). "The diet and 15-year death rate in the seven countries study." Am J Epidemiol **124**(6): 903-15.
- Kidd, P. M. (2000). "The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment." Altern. Med. Rev. **5**(1): 4-27.
- Kim, G. Y., Y. H. Oh, et al. (2003). "Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitricoxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C." Biochem. Biophys. Res. Comm. **309**: 399-407.
- Kim, G. Y., S. K. Park, et al. (2003). "Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase." Int. Immunopharmacol. **3**(9): 1281-92.
- Kim, G. Y., B. C. Shin, et al. (2004). "Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c+CD8+ DC and type I helper T cell-dominant immune system." FEBS Lett. **576**(3): 391-400.
- Kim, H. and M. J. Song (2014). "Analysis of traditional knowledge for wild edible mushrooms consumed by residents living in Jirisan National Park (Korea)." J Ethnopharmacol **153**(1): 90-7.
- Kim, H. P., H. S. Kun, et al. (2004). "Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms." J Pharmacol Sci **96**: 229-45.
- Kim, I. B., D. Y. Kim, et al. (2006). "Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and A549 epithelial cells." Biol Pharm Bull **29**(6): 1120-5.
- Kim, K. H., E. Moon, et al. (2012). "Phenolic constituents from the rhizomes of *Acorus gramineus* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities." Bioorg Med Chem Lett **22**(19): 6155-9.
- Kim, K. M., Y. G. Kwon, et al. (2003). "Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF-kappaB activation." Toxicology and Applied Pharmacology **190**: 1-8.
- Kim, M. Y., P. Seguin, et al. (2008). "Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea." J. Agric. Food Chem. **56**(16): 7265-70.
- Kim, S. H., C. D. Jun, et al. (2006). "Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells." TOXICOLOGICAL SCIENCES **91**(1): 123-131.
- Kim, S. P., M. Y. Kang, et al. (2011). "Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericum erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice." J Agric Food Chem **59**(18): 9861-9.

- Kino, K., A. Yamashita, et al. (1989). "Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*." J. Biol. Chem. **264**(1): 472-8.
- Kinsella, J. E., E. Frankel, et al. (1993). "Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods." Food technology **47**(4): 85-89.
- Ko, J. L., C. Hsu, et al. (1995). "A new fungal immunomodulatory protein, FIP-five isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence." Eur J Biochem. **228**(2): 244-9.
- Kobayashi, H., K. Matsunaga, et al. (1993). "PSK as a chemopreventive agent." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **2**(3): 271-6.
- Kobayashi, H., K. Matsunaga, et al. (1995). "Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(3): 275-81.
- Kodama, N., N. Harada, et al. (2002). "A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice." Jpn. J. Pharmacol. **90**(4): 357-60.
- Komatsu, N., N. Nagumo, et al. (1973). "Protective effect of the mushroom polysaccharide Schizophyllan against experimental bacterial infections." Jpn J Antibiot **26**(3): 277-83.
- Kosanic, M., B. Rankovic, et al. (2012). "Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents." Iran J Pharm Res **11**(4): 1095-102.
- Kozarski, M., A. Klaus, et al. (2015). "Nutraceutical properties of the methanolic extract of edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries): primary mechanisms." Food Funct. **6**(6): 1875-86.
- Kozarski, M., A. Klaus, et al. (2012). "Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*." Journal of Food Composition and Analysis **26**(1-2): 144-153.
- Kubista, M., J. M. Andrade, et al. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Mol Aspects Med **27**(2-3): 95-125.
- Kumar, K. J., F. H. Chu, et al. (2011a). "Antroquinonol from ethanolic extract of mycelium of *Antrodia cinnamomea* protects hepatic cells from ethanol-induced oxidative stress through Nrf-2 activation." J Ethnopharmacol **136**(1): 168-77.
- Kumar, V. B., T. C. Yuan, et al. (2011b). "Antroquinonol inhibits NSCLC proliferation by altering PI3K/mTOR proteins and miRNA expression profiles." Mutat Res **707**(1-2): 42-52.
- Lakhanpal, T. N. and M. Rana (2005). "Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms." Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization **3**(2): 288-303.
- Laskin, D. L. and K. J. Pendino (1995). "Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 655-77.

- Laskin, D. L., V. R. Sunil, et al. (2011). "Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **51**: 267-88.
- Lavi, I., D. Friesem, et al. (2006). "An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells." *Cancer Lett.* **244**: 61-70.
- Lee, H. H., J. S. Lee, et al. (2009). "Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*." *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**(6): 566-72.
- Lee, I. K., Y. S. Kim, et al. (2007). "New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*." *Bioorg Med Chem Lett* **17**(24): 6678-81.
- Lee, S. H., G. S. Seo, et al. (2007). "Butein blocks tumor necrosis factor alpha-induced interleukin 8 and matrix metalloproteinase 7 production by inhibiting p38 kinase and osteopontin mediated signaling events in HT-29 cells." *Life Sci* **81**(21-22): 1535-43.
- Lee, S. H., D. H. Sohn, et al. (2007). "2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis and blocks tumor necrosis factor-alpha-induced intestinal epithelial inflammation via heme oxygenase 1-dependent and independent pathways." *Biochem Pharmacol* **74**(6): 870-80.
- Lee, Y.-L., G.-W. Huang, et al. (2007). "Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*." *LWT - Food Science and Technology* **40**(5): 823-833.
- Lee, Y. S., Y. H. Kim, et al. (2010). "Anti-angiogenic activity of methanol extract of *Phellinus linteus* and its fractions." *J Ethnopharmacol* **131**(1): 56-62.
- León-Guzmán, M. F., I. Silva, et al. (1997). "Proximate Chemical Composition, Free Amino Acid Contents, and Free Fatty Acid Contents of Some Wild Edible Mushrooms from Querétaro, México." *J. Agric. Food Chem.* **45**(11): 4329-4332.
- Li, G., D. H. Kim, et al. (2004). "Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells." *Cancer Lett.* **216**(2): 175-81.
- Li, H., H. S. Lee, et al. (2014). "Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts of *Tremella fuciformis* and its major phenolic acids." *J Food Sci* **79**(4): C460-8.
- Li, Y., F. Ahmed, et al. (2005). "Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells." *Cancer Res* **65**(15): 6934-42.
- Li, Y., D. Kong, et al. (2011). "Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways." *Nutrients* **3**(10): 877-96.
- Li, Y. G., D. F. Ji, et al. (2011). "Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma." *Int J Biol Macromol* **48**(3): 511-7.
- Li, Y. R., Q. H. Liu, et al. (2008). "A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*." *Biochim. Biophys. Acta* **1780**(1): 51-7.

- Lin, W. H., C. H. Hung, et al. (1997). "Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis." J. Biol. Chem. **272**(32): 20044-8.
- Lin, Y. L., S. S. Lee, et al. (2006). "Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice." Mol. Pharmacol. **70**(2): 637-44.
- Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, et al. (2005). "The pharmacological potential of mushrooms." Evid Based Complement Alternat Med. **2**(3): 285–299.
- Liu, B. and Y.-S. Bau (1980). Fungi pharmacopoeia (sinica). Oakland, California.
- Liu, F., V. E. Ooi, et al. (1999). "Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides." Life Sci. **64**(12): 1005-1011.
- Liu, K. Y., S. Hu, et al. (2013). "Anti-inflammatory and anti-allergic activities of Pentaherb formula, Moutan Cortex (Danpi) and gallic acid." Molecules **18**(3): 2483-500.
- Liu, M., J. Li, et al. (1998). "Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide–peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*." Immunopharmacol. **40**: 187-198.
- Liu, Q., X. Shu, et al. (2008). "Plant-derived small molecule albaconol suppresses LPS-triggered proinflammatory cytokine production and antigen presentation of dendritic cells by impairing NF-κB activation." Int. Immunopharmacol. **8**: 1103-1111.
- Liu, R. H. (2003). "Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. ." Am. J. Clin. Nutr. **78**: 517S–520S.
- Liu, R. H. (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action." J Nutr **134**(12 Suppl): 3479S-3485S.
- Liu, Y. T., J. Sun, et al. (2012). "Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity." Food Chem Toxicol **50**(5): 1238-44.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method." Methods **25**: 402-408.
- Longvah, T. and Y. G. Deosthale (1998). "Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India." Food Chem **63**(3): 331-334.
- Lucas, E. H. (1957). "Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other Homobasidiomycetes." Antibiot. Chemotherapy **7**: 1-4.
- Lull, C., H. J. Wichers, et al. (2005). "Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites." Mediators of Inflammation **2**: 63-80.
- Majtan, J. (2012). "Pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*): an effective nutritional supplement against upper respiratory tract infections?" Med Sport Sci **59**: 57-61.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr **79**(5): 727-47.
- Manach, C., G. Williamson, et al. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 230S-242S.

- Manna, S. K., A. Mukhopadhyay, et al. (2000). "IFN-alpha suppresses activation of nuclear transcription factors NF-kappa B and activator protein 1 and potentiates TNF-induced apoptosis." *J Immunol* **165**(9): 4927-34.
- Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature*. **454**(7203): 436-44.
- Manzi, P., L. Gambelli, et al. (1999). "Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study." *Food Chemistry* **65**(4): 477-482.
- Manzi, P., S. Marconi, et al. (2004). "Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking." *Food Chemistry* **84**(2): 201-206.
- Maret, S. (1991). "Fungi in Khanty folk medicine." *Journal of Ethnopharmacology* **31**: 175-179.
- Margalith, P. (1989). Vitamin D: The Biotechnology of Ergosterol. *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. E. J. Vandamme, Elsevier Applied Biotechnology Series: 81-93.
- Markus, M. A. and B. J. Morris (2008). "Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging." *Clin Interv Aging*. **3**(2): 331-339.
- Martin, G. R. and J. L. Wallace (2006). "Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(2): 130-7.
- Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, et al. (2002). "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes." *Nutrición Hospitalaria* **17**(6): 271-278.
- Martínez-González, M. A., J. Salas-Salvadó, et al. (2015). "Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study." *Progress in Cardiovascular Diseases* **58**(1): 50-60.
- Martínez Peña, F., J. A. Oria de Rueda, et al., Eds. (2011). *Manual para la gestión del recurso forestal micológico en Castilla y León*.
- Massaro, M., E. Scoditti, et al. (2010). "Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: focus on omega-3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols." *Cardiovasc Ther* **28**(4): e13-9.
- Masuda, Y., Y. Murata, et al. (2008). "Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells." *Biol Pharm Bull*. **31**(6): 1104-8.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan, et al. (1992). "Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against Streptococcus sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)."
Aquaculture **101**(3-4): 197-203.
- Mattila, P., K. Konko, et al. (2001). "Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms." *J Agric Food Chem* **49**(5): 2343-8.
- Mattila, P., K. Suonpaa, et al. (2000). "Functional properties of edible mushrooms." *Nutrition* **16**(7-8): 694-6.
- Mau, J.-L., H.-C. Lin, et al. (2002). "Antioxidant properties of several specialty mushrooms." *Food Research International* **35**(6): 519-526.

- Mauvernay, R. Y., H. J. Pourrat, et al. (1978). "Glycoprotein extracted from the mushroom psalliota xanthoderma and its application in anti-viral therapy." Centre Europeen de Recherches Mauvernay "CERM", Riom, France.
- Mayakrishnan, V., N. Abdullah, et al. (2013). "Investigation of the antioxidative potential of various solvent fractions from fruiting bodies of Schizophyllum commune (Fr.) mushrooms and characterization of phytoconstituents." Journal of Agricultural Science **5(6)**: 58-68.
- Melillo de Magalhaes, P., I. Dupont, et al. (2012). "Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by Artemisia annua tea infusions in human intestinal Caco-2 cells." Food Chemistry **134(2)**: 864-871.
- Meydani, M. and S. T. Hasan (2010). "Dietary polyphenols and obesity." Nutrients **2(7)**: 737-51.
- Middleton, E., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer." Pharmacological reviews **52**: 673-751.
- Milenkovic, D., B. Jude, et al. (2013). "miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects." Free Radic Biol Med **64**: 40-51.
- Miranda, K. M., M. G. Espey, et al. (2001). "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite." Nitric Oxide **5(1)**: 62-71.
- Mishra, K. K., R. S. Pal, et al. (2013). "Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials." Food Chem **138(2-3)**: 1557-63.
- Mizuno, T. (1995). "Yamabushitake, Hericium erinaceum: bioactive substances and medicinal utilization. ." Food Rev. International **11**: 173-178.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer, et al. (1992). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology." Pharmacological reviews **43(2)**: 109-142.
- Moradali, M. F., H. Mostafavi, et al. (2007). "Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)." Int. Immunopharmacol. **7**: 701-724.
- Moraes, F. P. and L. M. Colla (2006). "Nutraceuticals and functional foods: definitions, legislation and health benefits." Rev Eletr Farm **3(2)**: 99-112.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of Immunological Methods **65(1-2)**: 55-63.
- Moss, G. P. (2000). "Nomenclature de lignans and neolignans. (IUPAC Recommendations 2000)." Pure and Applied Chemistry **72(8)**: 1493-1523.
- Mukaida, N., A. Harada, et al. (1998). "Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions." Cytokine Growth Factor Rev **9(1)**: 9-23.
- Muszynska, B., K. Sulkowska-Ziaja, et al. (2013). "Phenolic acids in selected edible basidiomycota species: armillaria mellea, boletus badius, boletus edulis, cantharellus cibarius, lactarius deliciosus and pleurotus ostreatus." Acta Sci. Pol. **12(4)**: 107-116.

- Nada, S. A., E. A. Omara, et al. (2010). "Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat." Food Chem Toxicol **48**(11): 3184-8.
- Netea, M. G., A. Simon, et al. (2010). "IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes." PLoS Pathog **6**(2): e1000661.
- Netsch, M. I., H. Gutmann, et al. (2006). "Green tea extract induces interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression but specifically inhibits IL-8 secretion in caco-2 cells." Planta Med **72**(8): 697-702.
- Nicolis, E., I. Lampronti, et al. (2008). "Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant *Embllica officinalis*, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells." Int Immunopharmacol. **8**(12): 1672-80.
- Niki, E., H. Shimaski, et al. (1994). "Antioxidantism-free radical and biological defence." Gakkai Syuppan Center, Tokyo.
- Nishimoto, N., T. Kishimoto, et al. (2000). "Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i21-7.
- Nozaki, H., S. Itonori, et al. (2008). "Mushroom acidic glycosphingolipid induction of cytokine secretion from murine T cells and proliferation of NK1.1 a/b TCR-double positive cells *in vitro*." Biochem. and Biophys. Res. Comm. **373**: 435-439.
- Oba, K., M. Kobayashi, et al. (2009). "Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer." Anticancer Res **29**(7): 2739-45.
- Oba, K., S. Teramukai, et al. (2007). "Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curative resections of gastric cancer." Cancer Immunol Immunother **56**(6): 905-11.
- Obuchi, T., H. Kondoh, et al. (1990). "Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*." Planta Med **56**(2): 198-201.
- Ooi, V. E. C. (2000). Medicinally important fungi. Science and cultivation of edible fungi. Balkema, Rotterdam, Van Griensven (ed): 41-51.
- Orallo, F. (2006). "Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol." Curr Med Chem **13**(1): 87-98.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, et al. (2001). "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe." J Agric Food Chem **49**(10): 4619-26.
- Ouzouni, P. K., D. Petridis, et al. (2009). "Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece." Food Chemistry **115**(4): 1575–1580.
- Oyetayo, O. V. (2011). "Medicinal uses of mushrooms in Nigeria: towards full and sustainable exploitation." Afr J Tradit Complement Altern Med **8**(3): 267-74.
- Oyetayo, O. V. and O. O. Ariyo (2013). "Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) Cultivated on Different Tropical Woody Substrates." Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology **1** (2): 28–32.
- Pajonk, F., A. Riedisser, et al. (2006). "The effects of tea extracts on proinflammatory signaling." BMC Med **4**: 28.

- Palacios, I., M. Lozano, et al. (2011). "Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms." Food Chemistry **128**(3): 674-678.
- Park, Y. C., G. Rimbach, et al. (2000). "Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappa B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages." Febs Letters **465**(2-3): 93-97.
- Park, Y. M., J. H. Won, et al. (2005). "*In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*." J. Ethnopharmacol. **101**: 120-128.
- Patel, S. and A. Goyal (2012). "Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review." 3 Biotech **2**(1): 1-15.
- Patthamakanokporn, O., P. Puwastien, et al. (2008). "Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits." Journal of Food Composition and Analysis **21**(3): 241-248.
- Pereira, E., L. Barros, et al. (2012). "Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats." Food Chemistry **130**(2): 394-403.
- Perry, D. A., M. P. Amaranthus, et al. (1989). "Bootstrapping in Ecosystems." Bioscience **39**(4): 230-237.
- Peterson, G. L. (1979). "Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farrand and Randall." Analytical biochemistry **100**(2): 201-220.
- Petrovska, B. B. (2001). "Protein fraction in edible macedonian mushrooms." European Food Research and Technology **212** (4): 469-472.
- Phan, C.-W., P. David, et al. (2014). "Intrastrain Comparison of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of an Edible Mushroom, *Pleurotus giganteus*, and Its Potent Neuritogenic Properties." The Scientific World Journal **2014**: 10 pages.
- Piraino, F. and C. R. Brandt (1999). "Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*." Antiviral Res **43**(2): 67-78.
- Plat, J. and R. P. Mensink (2005). "Food components and immune function." Curr Opin Lipidol. **16**(1): 31-7.
- Pogoń, K., G. Jaworska, et al. (2013). "Influence of the Culinary Treatment on the Quality of *Lactarius deliciosus*." Foods **2**: 238-253.
- Posadas, I., M. C. Terencio, et al. (2000). "Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation." Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology **361**(1): 98-106.
- Puttaraju, N. G., V. Upparahalli, et al. (2006). "Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms." J Agric Food Chem **54**: 9764-9772.
- Qi, W., P. J. Wang, et al. (2011). "The mechanism of *Cordyceps sinensis* and strontium in prevention of osteoporosis in rats." Biol Trace Elem Res **143**(1): 302-9.
- Rana, T., A. K. Bera, et al. (2012). "*Pleurotus florida* lectin normalizes duration dependent hepatic oxidative stress responses caused by arsenic in rat." Exp Toxicol Pathol **64**(7-8): 665-71.

- Raschke, W. C., S. Baird, et al. (1978). "Functional macrophage cell lines transformed by Abelson Leukemia Virus." Cell **15**(1): 261–267.
- Rashid, S., A. Unyayar, et al. (2011). "A study of anti-cancer effects of *Funalia trogii* in vitro and in vivo." Food Chem Toxicol **49**(7): 1477-83.
- Raso, G. M., R. Meli, et al. (2001). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1." Life Science **68**(8): 921-31.
- Refaie, F. M., A. Y. Esmat, et al. (2010). "Hepatoprotective activity of polysaccharopeptides from *Pleurotus ostreatus* mycelium on thioacetamide-intoxicated mice." Micol. Aplic. Intern. **22**: 1–13.
- Reimund, J. M., C. Wittersheim, et al. (1996). "Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease." J Clin Immunol **16**(3): 144-50.
- Reis, F. S., L. Barros, et al. (2012). "Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study." Food Chem. Toxicol. **50**(2): 191-7.
- Reis, F. S., A. Martins, et al. (2012). "Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples." Food Chem Toxicol **50**(5): 1201-7.
- Ren, Z., Z. Guo, et al. (2008). "White button mushroom enhances maturation of bone marrow-derived dendritic cells and their antigen presenting function in mice." J. Nutr. **138**: 544-550.
- Reshetnikov, S. V., S. P. Wasser, et al. (2001). "Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides." International Journal of Medicinal Mushrooms **3**(4): 34.
- Ribeiro, B., P. Valentao, et al. (2007). "Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*)." Food Chem Toxicol **45**(10): 1805-13.
- Robaszkiewicz, A., G. Bartosz, et al. (2010). "The role of polyphenols, B-carotene, and Lycopene in the Antioxidative action of the extracts of dried, edible mushrooms." Journal of Nutrition and Metabolism **2010**: 9.
- Romier-Crouzet, B., J. Van De Walle, et al. (2009). "Inhibition of inflammatory mediators by polyphenolic plant extracts in human intestinal Caco-2 cells." Food Chem Toxicol **47**(6): 1221-30.
- Romier, B., Y.-J. Schneider, et al. (2009). "Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response." Nut Rev **67**(7): 363-378.
- Romier, B., J. Van De Walle, et al. (2008). "Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells." Br J Nutr **100**(3): 542-51.
- Salas-Salvado, J., M. Bullo, et al. (2014). "Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial." Ann Intern Med **160**(1): 1-10.

- Saleem, M., H. J. Kim, et al. (2005). "An update on bioactive plant lignans." Nat Prod Rep **22**(6): 696-716.
- Sands, B. E. (2000). "Therapy of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **118**(2 Suppl 1): S68-82.
- Sanzen, I., N. Imanishi, et al. (2001). "Nitric oxide-mediated antitumor activity induced by the extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in a macrophage cell line, RAW 264.7." J. Exp. Clin. Cancer Res. **20**(4): 591-597.
- Sarangi, I., D. Ghosh, et al. (2006). "Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans." Int. Immunopharmacol. **6**: 1287-1297.
- Scalbert, A., I. T. Johnson, et al. (2005). "Polyphenols: antioxidants and beyond." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 215S-217S.
- Scalbert, A., C. Manach, et al. (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Crit Rev Food Sci Nutr **45**(4): 287-306.
- Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." J Nutr **130**(8S Suppl): 2073S-85S.
- Schuerer-Maly, C. C., L. Eckmann, et al. (1994). "Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide." Immunology **81**(1): 85-91.
- Sergent, T., N. Piront, et al. (2010). "Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium." Chem Biol Interact **188**(3): 659-67.
- Sergent, T. r. s., M. Parys, et al. (2006). "Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations." Toxicology Letters **164**(2): 167-176.
- Shao, H. J., J. B. Jeong, et al. (2015). "Anti-inflammatory activity of mushroom-derived hispidin through blocking of NF-kappaB activation." J Sci Food Agric **95**(12): 2482-6.
- Shieh, Y. H., C. F. Liu, et al. (2001). "Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice." Am. J. Chin. Med. **29**(3-4): 501-507.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, et al. (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent." Meth Enzymol **299**: 152-178.
- Sletmoen, M. and B. T. Stokke (2008). "Higher order structure of (1,3)-beta-D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities." Biopolymers. **89**(4): 310-21.
- Smith, J. E. (2003). "The Role of Polysaccharides Derived from Medicinal Mushrooms in Cancer Treatment Programs: Current Perspectives (Review)." International Journal of Medicinal Mushrooms **5**(3): 18.
- Soares, A. A., A. B. de Sa-Nakanishi, et al. (2013). "Hepatoprotective effects of mushrooms." Molecules **18**(7): 7609-30.

- Sohal, R. S. (2002). "Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process." Free Radic Biol Med **33**(1): 37-44.
- Son, C. G., J. W. Shin, et al. (2006a). "Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components of *Hericium erinaceum*." Int Immunopharmacol. : **6**(8): 1363-9.
- Son, C. G., J. W. Shin, et al. (2006b). "Induction of murine interleukin-1 beta expression by water-soluble components from *Hericium erinaceum*." Acta Pharmacol. Sin. **27**(8): 1058-64.
- Soobrattee, M. A., V. S. Neergheen, et al. (2005). "Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **579**(1-2): 200-213.
- Sorimachi, K., K. Akimoto, et al. (2001). "Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro." Cell Struct Funct. **26**(2): 103-8.
- Spencer, J. P., M. M. Abd-el-Mohsen, et al. (2004). "Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity." Arch Biochem Biophys **423**(1): 148-61.
- Sprecher, H. (1992). Long chain fatty acid metabolism Polyunsaturated fatty acids in human nutrition. U. Bracco and R. J. Deckelbaum. New York, Raven Press: 13–23.
- Sroka, Z. and W. Cisowski (2003). "Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids." Food Chem Toxicol **41**(6): 753-8.
- Stokes, K. Y., D. Cooper, et al. (2002). "Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: Role of nitric oxide and superoxide." Free Radical Biology and Medicine **33**(8): 1026-1036.
- Strimpakos, A. S. and R. A. Sharma (2008). "Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials." Antioxid Redox Signal **10**(3): 511-45.
- Sun, P., K. Zhou, et al. (2013). "Involvement of MAPK/NF-κB Signaling in the Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway in Experimental Colitis by Chronic Vagus Nerve Stimulation." PLOS ONE | www.plosone.org **8**(8): e69424.
- Sun, Y., T. Yin, et al. (2011). "*In vitro* antitumor activity and structure characterization of ethanol extracts from wild and cultivated Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilat (Aphyllphoromycetidae)." Int J Med Mushrooms **13**(2): 121-30.
- Suzuki, Y., Y. Adachi, et al. (2001). "Th1/Th2-Balancing immunomodulating activity of gel-forming (1->3)-beta-glucans from fungi." Biol Pharm Bull. **24**(7): 811-9.
- Swantek, J. L., M. H. Cobb, et al. (1997). "Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK." Mol Cell Biol. **17**(11): 6274-82.
- Synytsya, A. and M. Novák (2012). "Structural diversity of fungal glucans." Carbohydrate Polymers **92**(1): 792-809.

- Szekanecz, Z. (2008). "Pro-inflammatory cytokines in atherosclerosis." Isr Med Assoc J **10**(7): 529-530.
- Takei, T., M. Yoshida, et al. (2005). "Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito." Biosci Biotechnol Biochem. **69**(1): 212-5.
- Takeuchi, T., H. Iinuma, et al. (1969). "Coriolin, a new Basidiomycetes antibiotic." J Antibiot (Tokyo) **22**(5): 215-7.
- Tan, Y. S., A. Baskaran, et al. (2015). "Influence of customized cooking methods on the phenolic contents and antioxidant activities of selected species of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*)" Journal of Food Science and Technology **52**(5): 3058-3064
- Tang, W., J. W. Liu, et al. (2006). "Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells." Life Sci. **80**(3): 205-11.
- Tang, Y., H. M. Li, et al. (2012). "Comparison of sterol composition between Tuber fermentation mycelia and natural fruiting bodies." Food Chemistry **132**(3): 1207-1213.
- Tarko, T., A. Duda-Chodak, et al. (2013). "Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review." Rocz Panstw Zakl Hig **64**(2): 79-84.
- Taylor, S., M. Wakem, et al. (2010). "A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines." Methods **50**(4): S1-S5.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, et al. (2006). "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts." Journal of Food Composition and Analysis **19**: 669-675.
- Tibuhwa, D. D. (2012). "Folk taxonomy and use of mushrooms in communities around Ngorongoro and Serengeti National Park, Tanzania." J Ethnobiol Ethnomed **8**: 36.
- Tochikura, T. S., H. Nakashima, et al. (1988). "Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia." Med Microbiol Immunol **177**(5): 235-44.
- Triantafyllidis, J. K., E. Merikas, et al. (2011). "Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease." Drug Des Devel Ther **5**: 185-210.
- Trompezinski, S., A. Denis, et al. (2003). "Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNFalpha." Arch Dermatol Res **295**(3): 112-6.
- Tsai, S.-Y., H. L. Tsai, et al. (2007). "Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*." LWT - Food Science and Technology **40**(8): 1392-1402.
- Tsai, S. Y., J. L. Mau, et al. (2014). "Enhancement of antioxidant properties and increase of content of vitamin D2 and non-volatile components in fresh button mushroom, *Agaricus bisporus* (higher Basidiomycetes) by gamma-irradiation." Int J Med Mushrooms **16**(2): 137-47.
- Tsai, T. C., Y. T. Tung, et al. (2015). "Anti-inflammatory effects of *Antrodia camphorata*, a herbal medicine, in a mouse skin ischemia model." J Ethnopharmacol **159**: 113-21.
- Tsukagoshi, S., Y. Hashimoto, et al. (1984). "Krestin (PSK)." Cancer Treat Rev **11**(2): 131-55.

- Tucker, G. and K. Robards (2008). "Bioactivity and structure of biophenols as mediators of chronic diseases." Crit Rev Food Sci Nutr **48**(10): 929-66.
- Tunon, M. J., M. V. García-Mediavilla, et al. (2009). "Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways." Curr Drug Metab **10**(3): 256-71.
- Turkoglu, A., M. E. Duru, et al. (2007). "Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill." Food Chemistry **101**(1): 267-273.
- Ulzizjargal, E. and J. L. Mau (2011). "Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia." Int J Med Mushrooms **13**(4): 343-9.
- Um, M. Y., J. H. Park, et al. (2014). "*Agaricus bisporus* attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis." J Med Food **17**(12): 1383-5.
- Uzun, Y., H. Gençelep, et al. (2009). "Determination of protein and nitrogen fractions of wild edible mushroom." Asian Journal of Chemistry **21**(4): 2769-2776
- Valencia, F. E. and M. O. Román (2004). "The dietary fiber as functional food." Vitae **11**(2): 12-17.
- Valentao, P., P. B. Andrade, et al. (2005). "Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom." J Agric Food Chem **53**(12): 4925-31.
- Valentao, P., G. Lopes, et al. (2005). "Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms." J Agric Food Chem **53**(9): 3626-30.
- Vamanu, E. and S. Nita (2013). "Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom." Biomed Res Int **2013**: 313905.
- Vamanu, E. and S. Nita (2014). "Bioactive compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cantharellus cibarius*." REV. CHIM. (Bucharest) **65**(3): 372-379.
- Van De Walle, J., A. Hendrickx, et al. (2010). "Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation." Toxicol In Vitro **24**(5): 1441-9.
- Van De Walle, J., B. Romier, et al. (2008). "Influence of deoxynivalenol on NF-kappaB activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells." Toxicol Lett **177**(3): 205-14.
- Vannucci, L., J. Krizan, et al. (2013). "Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review)." Int J Oncol **43**(2): 357-64.
- Vaz, J. A., L. Barros, et al. (2011). "Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions." Food Chemistry **126**(2): 610-616.
- Vitkus, S. J., S. A. Hanifin, et al. (1998). "Factors affecting Caco-2 intestinal epithelial cell interleukin-6 secretion." In Vitro Cell Dev Biol Anim **34**(8): 660-4.

- Wang, G., J. Zhao, et al. (2007). "Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo." Int Immunopharmacol. **7**(6): 864-70.
- Wang, H. X., T. B. Ng, et al. (1996). "A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities." Biochem. Cell Biol. **74**: 95-100.
- Wang, J. and G. Mazza (2002). "Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(15): 4183-4189.
- Wang, P. H., C. I. Hsu, et al. (2004). "Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathway." J. Agric. Food Chem. **52**: 2721-2722.
- Wang, X. M., J. Zhang, et al. (2014). "A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China." Food Chem **151**: 279-85.
- Wärnberg, J., S. Gómez-Martínez, et al. (2009). "Nutrition, Inflammation, and Cognitive Function." Ann. N. Y. Acad. Sci **1153**: 164-175.
- Wasser, S. P. (2002). "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides." Appl. Microbiol. Biotechnol. **60**: 258-274.
- Wasser, S. P. (2010). "Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems." International Journal of Medicinal Mushrooms **12**(1): 1-16.
- Wasser, S. P. (2011). "Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms." Appl Microbiol Biotechnol **89**(5): 1323-32.
- Wasser, S. P. and A. L. Weis (1999). "Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review)." International Journal of Medicinal Mushrooms **1**: 31-62.
- Waters (2014). Care and use manual. OASIS MIXED-MODE ION-EXCHANGE CARTRIDGES AND 96-WELL PLATES. W. Corporation.
- Weissman, B. A. and S. S. Gross (2001). "Measurement of NO and NO synthase." Curr Protoc Neurosci **Chapter 7**: Unit7 13.
- Wen, C. L., C. C. Chang, et al. (2011). "Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both in vitro and in vivo." J Ethnopharmacol **137**(1): 575-84.
- Whittaker, R. H. (1969). "New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms." Science **163**(3863): 150-60.
- Wilkens, M., C. Alarcon, et al. (2002). "Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid." Planta Med **68**(5): 452-4.
- Williams, R. J. and J. P. Spencer (2012). "Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease." Free Radic Biol Med. **52**(1): 35-45.

- Witkowska, A. M., M. E. Zujko, et al. (2011). "Comparative study of wild edible mushrooms as sources of antioxidants." *Int J Med Mushrooms* **13**(4): 335-41.
- Wong, W. L., M. A. Abdulla, et al. (2012). "Hepatoprotective effects of *Panus giganteus* (Berk.) Corner against thioacetamide (TAA) induced liver injury in rats." *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*
- Woo, C. W., R. Y. Man, et al. (2005). "*Ganoderma lucidum* inhibits inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. ." *Mol. Cell Biochem.* **275**(1-2): 165-71.
- Woo, K. J., Y. J. Jeong, et al. (2005). "Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity." *FEBS Lett* **579**(3): 705-11.
- Wu, D., M. Pae, et al. (2007). "Dietary supplementation with white button mushroom enhances natural killer cell activity in C57BL/6 mice." *J. Nutr.* **137**: 1472-1477.
- Wu, J. and L. L. Lanier (2003). "Natural killer cells and cancer." *Adv Cancer Res.* **90**: 127-56.
- Wu, Y., H. Wang, et al. (2011). "Purification and characterization of a lectin with antiproliferative activity toward cancer cells from the dried fruit bodies of *Lactarius flavidulus*." *Carbohydr Res* **346**(16): 2576-81.
- Xagorari, A., C. Roussos, et al. (2002). "Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin." *Br J Pharmacol* **136**: 1058-64.
- Yang, H. L., Y. H. Kuo, et al. (2011). "Anti-metastatic activities of *Anrodia camphorata* against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway." *Food Chem Toxicol* **49**(1): 290-8.
- Yang, J.-H., H.-C. Lin, et al. (2002). "Antioxidant properties of several commercial mushrooms." *Food Chemistry* **77**(2): 229-235.
- Yang, T. K., Y. H. Lee, et al. (2013). "Davallialactone from mushroom reduced premature senescence and inflammation on glucose oxidative stress in human diploid fibroblast cells." *J Agric Food Chem* **61**(29): 7089-95.
- Yang, X. D., Y. Y. Yang, et al. (2015). "A review of biotransformation and pharmacology of ginsenoside compound K." *Fitoterapia* **100C**: 208-220.
- Yim, H. S., F. Y. Chye, et al. (2009). "Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature." *As. J. Food Ag-Ind.* , **2**(3): 392-401.
- Yin, J. Z. and L. X. Zhou (2008). "Analysis of nutritional components of 4 kinds of wild edible fungi in Yunnan." *Food Res. Develop* **29**: 133–136.
- Ying, J. Z. (1987). *Icones of Medicinal Fungi from China*.
- Yoon, J. H. and S. J. Baek (2005). "Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties." *Yonsei Med J.* **46**(5): 585-96.
- Yu, H., C. Han, et al. (2013). "The agaricoglyceride of royal sun medicinal mushroom, *Agaricus brasiliensis* (higher basidiomycetes) is anti-inflammatory and reverses diabetic glycemia in the liver of mice." *Int J Med Mushrooms* **15**(4): 357-64.
- Yu, Y. S., C. L. Hsu, et al. (2009). "Anti-inflammatory effects of the roots of *Alpinia pricei* Hayata and its phenolic compounds." *J Agric Food Chem.* **57**(17): 7673-80.

- Yuminamochi, E., T. Koike, et al. (2007). "Interleukin-12- and interferon-gamma-mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill." Immunology. **121**(2): 197-206.
- Zhang, B. B. and L. Ran (2005). "A study of fatty acid composition in edible fungi." Journal of Southwest University **27**(2): 277-279.
- Zhang, G., J. Sun, et al. (2010). "First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom." Phytomedicine **17**(10): 775-81.
- Zhang, J., Q. Tang, et al. (2002). "Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*." Life Sci. **71**(6): 623-38.
- Zhang, M., S. W. Cui, et al. (2007). "Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity." Trends in Food Science & Technology **18**(1): 4-19.
- Zhang, W. M., B. Li, et al. (2009). "Antioxidant activities of extracts from *Areca* (*Areca catechu* L.) flower, husk and seed." African Journal of Biotechnology **8**(16): 3887-3892.
- Zhang, Z., G. Lv, et al. (2012). "Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey." Int J Biol Macromol **51**(5): 1140-6.
- Zhao, Z., H. S. Shin, et al. (2008). "5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-alpha-induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells." J Agric Food Chem. **56**(10): 3863-8.
- Zheng, R., S. Jie, et al. (2005). "Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*." Int. Immunopharmacol. **5**: 811-820.
- Zhou, C. Y., W. Jia, et al. (2002). "Experimental studies on prevention of several kinds of fungi polysaccharides against alcohol-induced hepatic injury." Edible fungi **24**: 36-37.
- Zhou, H., C. S. Beevers, et al. (2011). "The targets of curcumin." Curr Drug Targets **12**(3): 332-47.
- Zhou, L., P. Shi, et al. (2011). "Ganoderic acid Me induces apoptosis through mitochondria dysfunctions in human colon carcinoma cells." Process Biochemistry **46**(1): 219-225.
- Zhou, S. and Y. Gao (2002). "The Immunomodulating Effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllophoromycetideae)." International Journal of Medicinal Mushrooms **4**(1): 11.

VII. ANEXO: Trabajos previos

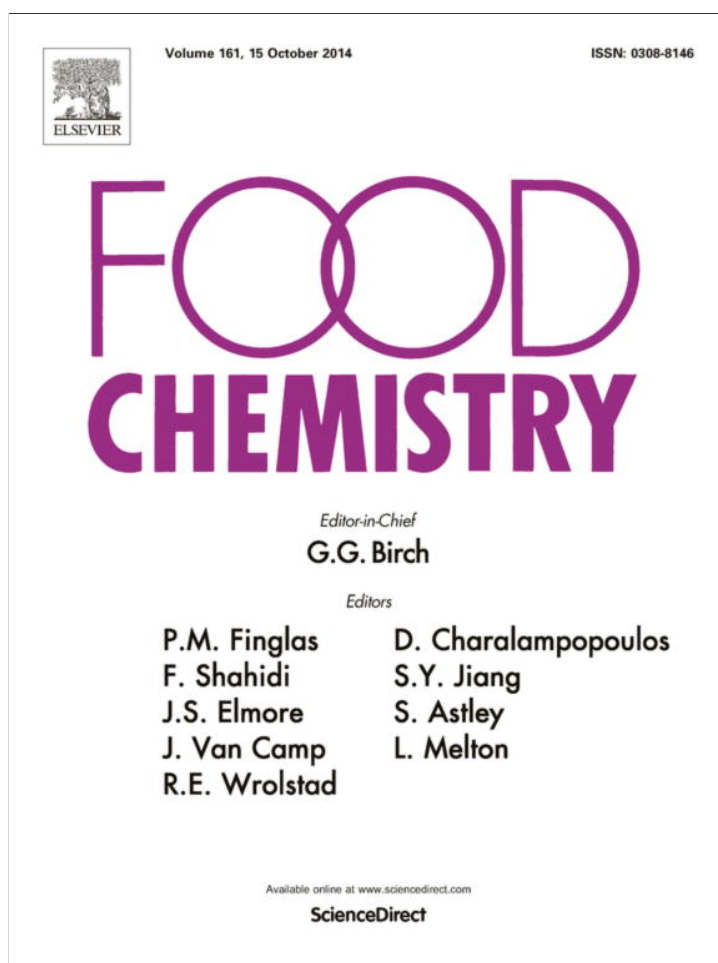
COMUNICACIONES EN CONGRESOS:

- Comunicación Oral

10th International Nutritional & Diagnose Conference (INDC) “Anti-inflammatory Activity of Phenolic Rich Extracts from Pulses”. **Moro, C.**, Manchón, N., Lozano, M., Rostagno, M. A., Villares, A., Guillamón, E., D’Arrigo, M., Martínez, J. A., García-Lafuente, A. Praga (República Checa), 4-7 de Septiembre de 2010.

- Póster:

10th International Nutritional & Diagnose Conference (INDC) “Polyphenols and Antioxidant Activity of Legume Extracts” Manchón, N., **Moro, C.**, Palacios, I., García-Lafuente, A., D’Arrigo, M., Villares, A., Guillamón, E., Martínez, J. A., Rostagno, M. A. Praga (República Checa), 4-7 de Septiembre de 2010.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans



Ana García-Lafuente^{a,*}, Carlos Moro^a, Noelia Manchón^a, Alicia Gonzalo-Ruiz^b, Ana Villares^a, Eva Guillamón^a, Mauricio Rostagno^a, Laura Mateo-Vivaracho^a

^a Centro para la Calidad de los Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), C/José Tudela s/n, 42004 Soria, Spain

^b Laboratorio de Neuroanatomía, Instituto Neurociencias de Castilla & Leon, Universidad de Valladolid, Campus de Soria, 42004 Soria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 December 2013

Received in revised form 6 March 2014

Accepted 1 April 2014

Available online 12 April 2014

Keywords:

Beans

Phenolic compounds

Antioxidant

Inflammation

Anti-inflammatory

Inflammatory mediators

Transcription factors

ABSTRACT

According to epidemiological evidence, diets rich in fruits and vegetables can reduce the incidence of several chronic diseases that share an inflammatory component. These protective effects are attributed, in part, to the occurrence of different antioxidant components, mainly phenolic compounds. Our aim was to characterise phenolic composition, and to determine antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic rich extracts obtained from two kinds of common beans, white kidney beans (WKB) and round purple beans (RPB). Phenolic acids were the predominant component in WKB extracts, whereas RPB extracts presented higher concentrations of phenolic compounds, mainly catechin derivatives, proanthocyanidins and catechin glucoside. In addition, RPB extracts showed higher antioxidant capacity and higher anti-inflammatory activity by the reduction of NO production and cytokine mRNA expression of LPS stimulated macrophages. These results suggest that common bean extracts may be used as a source of anti-inflammatory agents as well as a dietary complement for health promotion.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Legumes can be considered as an important component of healthy diets not only due to their nutritional value (high content in proteins and low content in fat), but also because of their functional properties. Consumption of pulses has previously been associated with a reduced risk of cardiovascular diseases, diabetes and even certain types of cancer (Curran, 2012; Hutchins, Winham, & Thompson, 2012). Apart from soy beans, white and red beans are some of the most consumed legumes, being part of the typical diet in several western countries. The functional components of these legumes include complex carbohydrates, soluble fibres, essential vitamins, phytate, lectins, and polyphenols. Among all of them, phenolic compounds including flavonoids and isoflavones have emerged as potent antioxidant molecules (Rahman, Biswas, & Kirkham, 2006). Epidemiological studies have demonstrated positive correlations between the consumption of foods with a high content in phenolic substances and high antioxidant values, as well as a decrease in the incidence of several diseases, such as cancer, ageing and cardiovascular diseases (Liu, 2013). Moreover, phenolic compounds have attracted great attention during the last few years

due to the large variety of biological activities that they exhibit, such as anti-inflammatory, anti-tumour or anti-atherogenic activities. Many of these effects cannot be explained solely on the basis of their antioxidant properties. Investigations into the mechanisms of action of these molecules have demonstrated that polyphenols, besides acting as free radical scavengers, can also modulate cellular signalling processes during inflammation (García-Lafuente, Guillamón, Villares, Rostagno, & Martínez, 2009).

Inflammation is a physiological process that initiates in response to bacterial infection or tissue damage. Macrophages are the first line of defense of the immune system against noxious agents. Inflammatory stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) activate macrophages to produce a variety of pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins (IL-1 β , or IL-6), as well as other inflammatory mediators including prostaglandin E₂ (PGE₂) and nitric oxide (NO), which are synthesised by cyclooxygenase (COX) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), respectively. Production of these mediators has been demonstrated in several inflamed tissues, along with enhanced expression of their mRNAs, and they are involved in the pathogenesis of several diseases, such as atherosclerosis, obesity, metabolic syndrome, diabetes, neurodegenerative diseases, and several types of cancers (Cardona, Garcia, & Cardona, 2013; Lee, Han, Nam, Oh, & Hong, 2010; Pradhan, 2007). Molecules that reduce the expression

* Corresponding author. Tel.: +34 975233204; fax: +34 975233205.

E-mail address: garcia.ana-maria@inia.es (A. García-Lafuente).

of these proinflammatory genes could be useful in the treatment of many chronic diseases with an underlying inflammatory origin.

In the present work, a mouse macrophage cell line RAW 264.7 stimulated with LPS was used, as an *in vitro* model, to investigate the anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts obtained from two kinds of legumes commonly found in the human diet: red beans and white beans.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Samples of beans were purchased from IGP Judía de El Barco de Ávila (Spain). They were a red bean called round purple bean (RPB), and a white bean called white kidney bean (WKB), both of them being *Phaseolus vulgaris*. They were stored at -20°C until used to obtain methanolic extracts.

2.2. Chemicals and reagents

HPLC (high-performance liquid chromatography) grade methanol, acetonitrile and sodium carbonate were obtained from VWR-International (Darmstadt, Germany) while acetic acid (96%) and Folin–Ciocalteu reagent were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan USA). Ultra pure water was supplied by a Milli-Q water Advantage A10 purifier system from Millipore (Bedford, MA, USA). The standards, sinapic, trans-*p*-coumaric and trans-ferulic acids, flavanones naringenin and hesperitin, flavonol quercetin, flavanol (+)-catechin and anthocyanidin malvidin 3-*O*-glucoside chloride, were obtained from Extrasynthèse (France), and gallic acid from Merck (Darmstadt, Germany). Fluorescein, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), foetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, Griess reagent, dimethyl sulfoxide (DMSO), MTT reagent (thiazolyl blue tetrazolium bromide), lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli*, serotype O111:B4), and other chemicals were obtained from Sigma–Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA). Reagents for DNA extraction and purification and PCR were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) and antibody anti-NF- κ B-p65 from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

2.3. Extraction of polyphenolic compounds from beans

The protocol used to obtain polyphenolic rich extracts from bean samples was based on the method previously optimised by Rostagno, Palma, and Barroso (2003). Briefly, the ultrasound-assisted extraction method consisted of 3 consecutive extractions of 30 g of sample; firstly the sample was extracted with 250 ml of 50% methanol, then with 250 ml of 80% methanol, and finally with 50 ml of 100% methanol. The 3 extractions were carried out for 30 min at 60°C . After each extraction step, the sample was centrifuged at 10°C for 10 min at 4000 rpm on a Universal 320R centrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany), the supernatant collected and the solid submitted to the following extraction step. Extractions were carried out on a multi-frequency (25 and 45 kHz) ultrasonic bath (Transsonic TH-I-55, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany) operating at 25 and 45 kHz (alternatively) at 100% intensity output. After the last extraction, supernatants were combined. The liquid extract was evaporated to half volume under vacuum, using a rotary evaporator (Laborota 4000 efficient, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) at 45°C . After evaporation, the same

volume of water as the evaporated liquid was added and then freeze-dried. The whole extraction was repeated until the necessary amount of polyphenolic rich extract for the assays was obtained. Freeze-dried extracts were reconstituted in 50% aqueous methanol for the HPLC analysis and the Folin–Ciocalteu, DPPH and ORAC assays, and reconstituted in culture medium (DMEM) and filtered through a $0.2\ \mu\text{m}$ nylon syringe filter (VWR-International, Darmstadt, Germany), before the cellular treatments.

2.4. High performance liquid chromatography

2.4.1. Liquid chromatography diode array detection (HPLC–PAD)

High-performance liquid chromatography (HPLC) was conducted by using a Waters HPLC system (Waters, Milford, Mass, USA) equipped with a 717 plus autosampler, a quaternary pump 600-MS controller and a 996 photodiode-array detector (PAD). Separation of phenolic compounds was based on a previous method from Dueñas, Hernández, Estrella, and Rabanal (2003). A reverse phase C18 column (Nova-Pak, $300 \times 3.9\ \text{mm}$, particle size $4\ \mu\text{m}$) was used. The mobile phase was comprised of two solvents, A: water/acetic acid (98:2, v/v) and B: water/acetonitrile/acetic acid (78:20:2, v/v/v). The gradient profile was 0 min, 100% A; 55 min, 20% A; 57 min, 10% A; 70 min, 10% A; 80 min, 5% A; 90 min, 0% A; 120 min, 0% A. Flow rate was 0.70 ml/min. The column was cleaned after gradient and between injections with 4 min of 100% acetonitrile with a flow rate of 0.7 ml/min, and re-equilibrated for 15 min with the initial conditions. Injection volume was $50\ \mu\text{l}$. Detection was performed by scanning from 210 to 400 nm with an acquisition speed of 1 s. The samples were analysed in duplicate. The software for the equipment control and data acquisition was Empower 2 version 6.10.01.00.

2.4.2. Liquid chromatography/electrospray mass spectrometry (HPLC–ESI-MS)

Mass spectra were obtained using a Hewlett Packard 1100MS (Palo Alto, CA) chromatograph equipped with an API source, using an ESI interface. The solvent gradient and column used were the same as for HPLC–PAD. ESI conditions were as follows: negative mode, nitrogen was used as the 40 psi nebulizing pressure drying gas, 10 l/min at 340°C ; voltage at capillary entrance, 4000 V; and variable fragmentation voltage, 100 V ($m/z < 200$), 200 V ($m/z 200–1000$), 250 V ($m/z 1000–2500$). Mass spectra were recorded from $m/z 100$ to $m/z 2500$.

2.5. Identification and quantification of phenolic compounds

Chromatographic peaks were identified by comparison of their retention times, UV spectra and data of UV spectral parameters with those of the standards and confirmed by HPLC–MS. Other compounds, for which standards were not available, and which presented an UV spectrum similar to hydroxycinnamic acids, procyanidins, anthocyanins and flavonols, were identified as derivatives of them and were confirmed by HPLC–MS (ESI) or by the data of UV spectral parameters obtained in studies previously developed (Dueñas et al., 2003).

Quantification was carried out using the external standard method with commercial standards. The calibration curves were made by injection of different volumes of the stock solutions along the range of concentration observed for each compound, using a linear regression for the relationship of sum area versus concentration obtained under the same conditions used before for the samples analysed. The unknown non-flavonoid and flavonoid derivatives were quantified by using the calibration curves of the most similar compounds, and each concentration is expressed as amount of this similar compound. Regression equations and

correlation coefficient (R^2) were calculated using Microsoft Excel 2007 software.

2.6. Polyphenol content determined by Folin–Ciocalteu assay

Total phenolic content (TPC) of extracts were determined by Folin–Ciocalteu assay using gallic acid as the standard (Singleton & Rossi, 1965). Sample (750 μ l), distilled water (4.75 ml), Folin–Ciocalteu reagent solution (500 μ l), 20% sodium carbonate (2 ml) and distilled water (2 ml) were vortexed and incubated for 30 min at room temperature.

The absorbance of the samples was measured at 750 nm using a microplate UV–Visible spectrophotometer (Fluostar Omega BMG, Labtech Int'l Ltd, East Sussex, UK) against distilled water as a blank. The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (mg of GAE/g sample). The linear range of the calibration curve was 0–100 μ g/ml ($R^2 = 0.99$).

2.7. Antioxidant activity determined by DPPH assay

The antioxidant activity, expressed as half maximal effective concentration (EC_{50}) of the extracts, was determined by reaction with the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). The reaction was carried out with 2 ml of a methanol solution of DPPH (0.025 g/l) and solutions of different concentrations adequate for each sample. The absorbance was measured at 1 min intervals at 515 nm, until the reaction reached a plateau (time at the steady state). The percentage of remaining DPPH (% DPPHrem) was calculated as follows: % DPPHrem = [(Abs: 515 nm)sample/(Abs: 515 nm)control] \times 100. This percentage was plotted against the sample concentration to obtain the EC_{50} , defined as the amount of antioxidant (mg of sample) necessary to decrease absorbance by 50%. The lower the EC_{50} value, the higher the antioxidant activity obtained. We used $1/EC_{50}$; a higher $1/EC_{50}$ indicates higher antioxidant activity.

2.8. Antioxidant activity established by ORAC assay

Antioxidant activity was measured by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay (Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé, 2004). Samples (20 μ l) were dispensed in a 96-well microplate (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) along with standard Trolox solutions and blanks, and loaded into a microplate reader, which was programmed to inject each well with 120 μ l fluorescein and 60 μ l AAPH, and to record the fluorescence of the mixture every minute for 104 min ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm). Antioxidant activity of the extracts was expressed as μ mol Trolox equivalents/g of sample, and was calculated from the regression equation of Trolox concentrations and net area under the fluorescence decay curve, which was generated by FLUOstar Optima software (V2.10 R4, BMG Labtech Inc., Durham, NC).

2.9. Cell line

The macrophages cell line RAW 264.7 was obtained from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) and cultivated in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere (CO₂ incubator, Heal Force). Cells were treated with the beans extracts at different concentrations during 1 h and stimulated with LPS (1 μ g/ml) for the indicated period.

2.10. MTT – assay for measuring cell viability

Cells were seeded at a density of 10^4 cells/well in 96-well plates overnight, and pre-treated with different concentrations of the extracts (0.625, 1.25, and 2.5 mg of extract/ml) for one hour, before stimulation with LPS. RAW 264.7 viability was measured after 24 h of exposure to the tested extracts with a colorimetric assay based on the ability of mitochondria in viable cells to reduce MTT. The MTT solution was added at a concentration of 0.5 mg/ml into each well and, after 3 h of incubation at 37 °C, the medium was discarded and the formazan blue formed in the cells was dissolved in DMSO. Optical density at 570 nm was determined with a microplate reader. The optical density of formazan formed in LPS treated cells was taken as 100% of viability.

2.11. Nitrite determination

Cells were seeded onto 96-well plates with 2×10^5 cells/well and allowed to adhere overnight. Then, medium was removed and replaced with 0.2 ml of fresh medium either without foetal bovine serum, alone or containing different concentrations of extracts (0.625, 1.25, and 2.5 mg of extract/ml). After 1 h of incubation, LPS stimulation was performed. LPS was added at different concentrations (10 ng/ml, 100 ng/ml or 1 μ g/ml) for 24 h. The cell-free culture medium was collected and 50 μ l were used for NO determination. The nitrite accumulated in culture medium was measured as an indicator of NO production based on the Griess reaction. Briefly, 50 μ l of cell culture medium was mixed with an equal volume of Griess reagent (equal volumes of 1% (w/v) sulphamylamide in 5% (v/v) phosphoric acid and 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl), incubated at room temperature for 10 min, and then the absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (FLUOstar Optima, BMG Labtech Inc., Durham, NC). The amount of nitrite present in the samples was calculated by means of a standard curve generated using serial dilutions of NaNO₂ in fresh culture medium.

2.12. Real time PCR of mRNA inflammatory mediators

2.12.1. RNA extraction and purification

Cells were plated onto 6 well plates at a density of 10^6 cells/well and incubated with extracts for 1 h prior to LPS stimulation. After 6 h, cells were lysed and total RNA extraction was performed by using the Ribopure kit from Applied Biosystems. The purified RNA was treated with DNase (TURBO DNA-free kit from Applied Biosystems) and quantified by spectrophotometry at 260 nm. The purity of extracted RNA was measured by 260/280 index and it was in all the samples between 1.8 and 2.1. The RNA quality was assessed in each sample by capillary electrophoresis by using the Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad). The samples were shown to reach a RQI higher than 7.0, to ensure standards met the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments).

2.12.2. Reverse transcription

cDNA was synthesised from 0.5 μ g of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in an Advanced Primus 96 thermocycler (PEQLAB).

Quantitative PCR was performed on the Step One System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan Gene Expression Master Mix and pre-developed TaqMan Assays specific to mouse: iNOS (cat. No. Mm01309902_m1), TNF- α (cat. No. Mm99999068_m1), IL-1 β (cat. No. Mm00434228_m1), IL-6 (cat. No. Mm99999064_m1), COX-2 (cat. No. Mm 00478374_m1), and for the housekeeping gene ACTB (cat. No. Mm01205647_g1). PCR was performed with TaqMan MGB probes labelled with FAM

Table 1

Total phenolic content and antioxidant activity of analysed extracts. All data have been obtained in triplicate.

Sample	Total phenolic compounds Folin–Cicalteau assay		Antioxidant activity DPPH assay		Antioxidant activity ORAC assay	
	mg Gallic acid equivalents/g sample	% RSD	1/EC ₅₀	% RSD	μmol Equivalent Trolox/g sample	% RSD
WKB	4.63	2.71	109.14	0.03	217.97	15.12
RPB	13.41	0.47	171.06	0.20	304.24	9.39

reporter dye in a final reaction volume of 20 μl. The amplification conditions were the universal conditions described by the manufacturer. The probes were validated to ensure the amplification efficiency and linearity in preliminary experiments using different dilutions of the template. Expression values were obtained from Ct numbers detected by the Applied Biosystems analysis software. The target gene levels were expressed as the N-fold difference in the target gene expression relative to ACTB expression (ΔCt), where ΔCt was determined in each sample by subtracting the average Ct value of the target gene from the average Ct value of the ACTB; in addition, the relative gene expression was calculated as $2^{-\Delta Ct}$.

2.13. Western blot detection of NF-κB p65

RAW 264.7 cells were seeded in six-well plates at a density of 3×10^6 cells per well and cultured overnight. Cells were then pre-treated with bean extracts (0.625 mg/ml) for one hour and stimulated with LPS (100 ng/ml) for 30 min. At the end of the treatment the cells were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) twice and harvested by scraping. Cytoplasmic and nuclear proteins were extracted by using the NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction kit (Thermo Scientific). Both cytoplasmic and nuclear proteins were maintained at -80°C for Western blot analysis. The protein concentration was determined using a Bradford protein assay reagent

(Bio-Rad) and BSA as standard. Proteins were denatured in boiling water for 5 min and 10 μg of denatured proteins were loaded and separated by SDS–PAGE on a 10% polyacrylamide gel, electrically transferred to a PVDF membrane (Amersham Hybond-P) and probed with specific primary antibody anti-NF-κB-p65 (1:1000) from Santa Cruz Biotechnology (sc-372). The reactive bands were visualised with HRP-conjugated secondary antibody (1:5000) via ECL Prime Detection reagents (Amersham Biosciences).

3. Results

3.1. Phenolic composition and antioxidant activity of bean extracts

Table 1 shows total phenolic compounds, 1/EC₅₀ values from DPPH assay and antioxidant activity from ORAC assay for white kidney beans (WKB) and round purple beans (RPB) extracts. RPB showed higher total phenolic compounds content than WKB and antioxidant activity values were greater for coloured beans than for white beans, independently of the assay used. The content in total phenolic compounds is consistent with the individual concentrations of phenolic compounds (Table 2) detected in both kind of beans; total concentration obtained by Folin–Ciocalteu assay and by HPLC–PAD–MS analysis are greater for RPB than for WKB.

The composition profile found for both bean extracts were quite different. In the case of WKB, the predominant phenolic

Table 2

Individual concentration of phenolic compounds in bean extracts analysed by HPLC–PAD–MS analysis. The samples were analysed in duplicate. Unknown non-flavonoid and flavonoid derivatives were expressed as amount of a similar compound.

λ (nm)	MS fragments	Compound	Compound that is expressed	μg/g Freeze-dried extract	% RSD	μg/g Sample
WKB						
238, 294sh, 326	193, 385, 190.9	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	270.95	15.04	34.68
312	190.9, 355	Coumaroyl aldaric	Trans coumaric acid	82.57	21.10	10.57
314	355, 190.9, 209	Coumaroyl aldaric	Trans coumaric acid	81.54	2.86	10.44
288, 326	385, 190.9	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	440.41	7.99	56.37
327	385, 190.9, 192.9	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	980.22	6.63	125.47
314	355, 190.9, 162.8	Coumaroyl aldaric	Trans coumaric acid	132.56	13.89	16.97
326	415, 385, 209.1, 190.9	Sinapic aldaric	Sinapic acid	352.88	11.07	45.17
330	415	Sinapic derivative	Sinapic acid	45.71	0.52	5.85
330	415	Sinapic derivative	Sinapic acid	1222.23	9.52	156.44
328	385, 190	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	150.90	2.05	19.31
324	385, 209, 190	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	169.93	12.74	21.75
330	415, 209	Sinapic acid	Sinapic acid	44.91	3.00	5.75
324	193	Ferulic acid	Trans ferulic acid	137.41	6.44	17.59
284	271, 609	Naringenin derivative	Naringenin	88.31	12.32	11.30
280, 330sh	301, 659	Hesperitin derivative	Hesperitin	1.12	11.77	0.14
RPB						
236, 278, 316	289, 451	Catechin glucoside	Catechin	2637.14	14.35	485.37
278, 319	355, 190.9	Coumaroyl aldaric	Trans coumaric acid	83.21	5.00	15.32
234, 280	289, 577.2	Proanthocyanidin dimer	Catechin	3441.81	10.99	633.46
238, 290sh, 326	192.9, 385	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	401.30	2.72	73.86
238, 326	385	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	828.33	13.20	152.45
236, 280, 314	289, 865	Proanthocyanidin trimer	Catechin	705.58	10.72	129.86
236, 322	208.8, 190.1, 415	Sinapic aldaric	Sinapic acid	940.32	2.26	173.07
236, 290, 320	191.9, 384.9	Feruloyl aldaric	Trans ferulic acid	69.53	7.86	12.80
234, 284, 324	289	Catechin	Catechin	719.23	5.26	132.38
232, 280, 520	447, 285	Cyanidin glucoside	Malvidin 6-glucoside	629.00	5.54	115.77
232, 278, 330, 426, 530	431, 269	Pelargonidin glucoside	Malvidin 6-glucoside	280.34	8.70	51.60
256, 354	301, 463	Quercetin glucoside	Quercetin	66.08	3.00	12.16
256, 294, 352	301, 549	Quercetin malonil glucoside	Quercetin	69.27	7.15	12.75

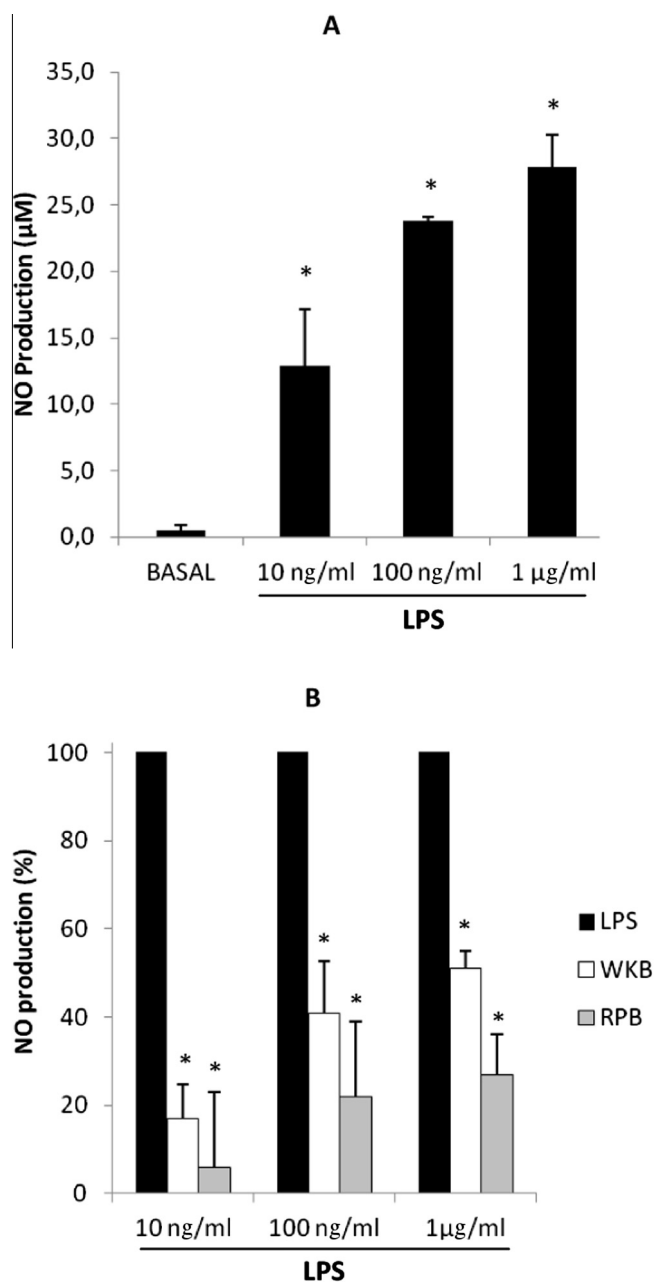


Fig. 1. Effects of methanolic bean extracts in NO production. Panel A: cells were stimulated with different concentrations of LPS (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml) to induce NO production. Panel B: cells were treated with 0.625 mg/ml of extracts: white kidney beans (WKB) or round purple beans (RPB) for 1 h prior to LPS stimulation. NO production is expressed as percentage of that of the group treated with LPS alone. Data are shown as mean \pm SD of three different experiments * $p < 0.05$.

compounds found were phenolic acids, especially hydroxycinnamic acids such as feruloyl aldaric and a derivative of the sinapic acid; most of them are aldaric derivatives. Apart from phenolic acids, flavanone has been detected in the extract. Also, flavonols, such as quercetin and derivatives, are present only in coloured beans. Anthocyanins, which are responsible for the purple colour of the bean, are detected in the RPB extract, too.

3.2. Effects of bean extracts on cell viability

The effect of different concentrations of methanolic legume extracts on cell viability was assessed by the MTT method. RPB

extracts did not produce a significant effect on cell viability whereas the highest concentration (2.5 mg of extract/ml) of WKB extract induced a slight decrease on cell viability (data not shown). The lowest dose tested (0.625 mg of extract/ml) was selected for further experiments in order to evaluate their potential anti-inflammatory effect.

3.3. Inhibitory effect of methanolic bean extracts on NO production and iNOS mRNA expression in LPS-stimulated macrophages

To evaluate the effect of legume extracts on the macrophage inflammatory response induced by LPS, NO production was measured. LPS treatment induced high dose-dependent NO production (Fig. 1, panel A). Pretreatment with legume extracts reduced the NO production induced by all LPS concentrations, and this reduction was more evident when cells were stimulated with the lowest level of LPS (10 ng/ml). Moreover, RPB always exhibited a higher effect than WKB (Fig. 1, panel B).

The high levels of NO induced by stimulation with LPS are produced by the inducible isoform of the enzyme nitric oxide synthase (iNOS), which is synthesised by translation of the mRNA in the cytoplasm. To determine whether the inhibitory effect of extracts on NO production was due to inhibition of iNOS mRNA expression, RNA extraction and real time PCR were performed. As shown in Fig. 2, pretreatment with legume extracts reduced iNOS mRNA expression induced by different concentrations of LPS in a similar manner to the reduced NO production. Extracts from RPB were more effective than extracts from WKB.

3.4. Effect of methanolic bean extracts on cytokine gene expression induced by LPS

To investigate the effect of methanolic legume extracts on cytokine gene expression in LPS stimulated macrophages, mRNA expression was evaluated by real time PCR. LPS induces an elevated dose-dependent mRNA expression of the different genes studied (IL-1 β , IL-6 and TNF- α). Pretreatment with legume extracts inhibited mRNA expression of all the genes tested when cells were

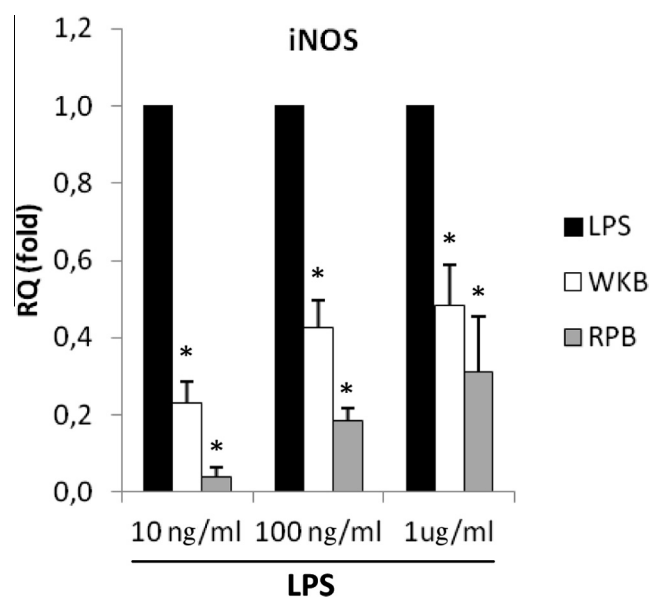


Fig. 2. Effect of methanolic bean extracts on mRNA iNOS expression. Macrophages were treated with 0.625 mg/ml of extract: white kidney beans (WKB) or round purple beans (RPB) during one hour before LPS stimulation with different concentrations. Results are expressed as fold of change (RQ) from reference treatment (LPS). Values show the mean \pm SD of three different experiments * $p < 0.05$.

stimulated with the lowest LPS dose (10 ng/ml). However when higher doses of LPS were used only IL-1 β and IL-6 but not TNF- α mRNAs were reduced by legume extract pretreatment. In all cases RPB extracts showed a higher effect than the WKB ones (Fig. 3).

3.5. Effect of methanolic bean extracts on nuclear NF- κ B p65 expression induced by LPS

In order to understand the mechanism underlying the inhibitory effect of the extracts on LPS induced inflammatory mediators, we studied the protein level of NF- κ B p65 in the nuclear fraction of treated cells by Western blotting. The amount of NF- κ B p65 in the nucleus of RAW 246.7 was dramatically increased upon stimulation with LPS. Treatment with WKB extracts induced a weak reduction of the expression levels of nuclear NF- κ B p65, whereas treatment with RPB extracts produced a more evident inhibition (Fig. 4).

4. Discussion

Polyphenols have been proven to act as antioxidants, protecting tissues from oxidative stress and pathologies associated with this

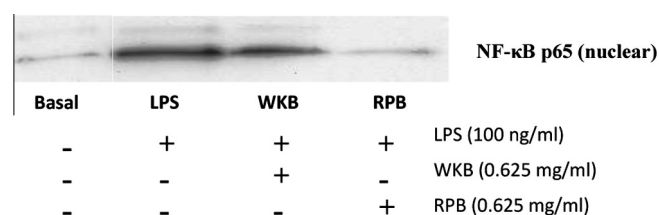


Fig. 4. Effect of methanolic bean extracts on expression of nuclear NF- κ B p65. Cells were pretreated with 0.625 mg/ml of bean extracts: white kidney beans (WKB) or round purple beans (RPB) during 1 h and stimulated with LPS (100 ng/ml) for 30 min. Expression of nuclear NF- κ B p65 was assessed by Western blot. The results are representative of three separate experiments.

condition. Besides their antioxidant properties, phenolic compounds have been shown to have anti-inflammatory activity by different mechanisms including modulation of the inflammatory cascade (García-Lafuente et al., 2009). The present work was aimed to investigate the antioxidant and anti-inflammatory properties of phenolic rich extracts, obtained from white and purple beans. The results demonstrated that both of them exhibited antioxidant and anti-inflammatory activities.

It has been reported that common beans have high contents of phenols compared to different fruits and vegetables, with pinto

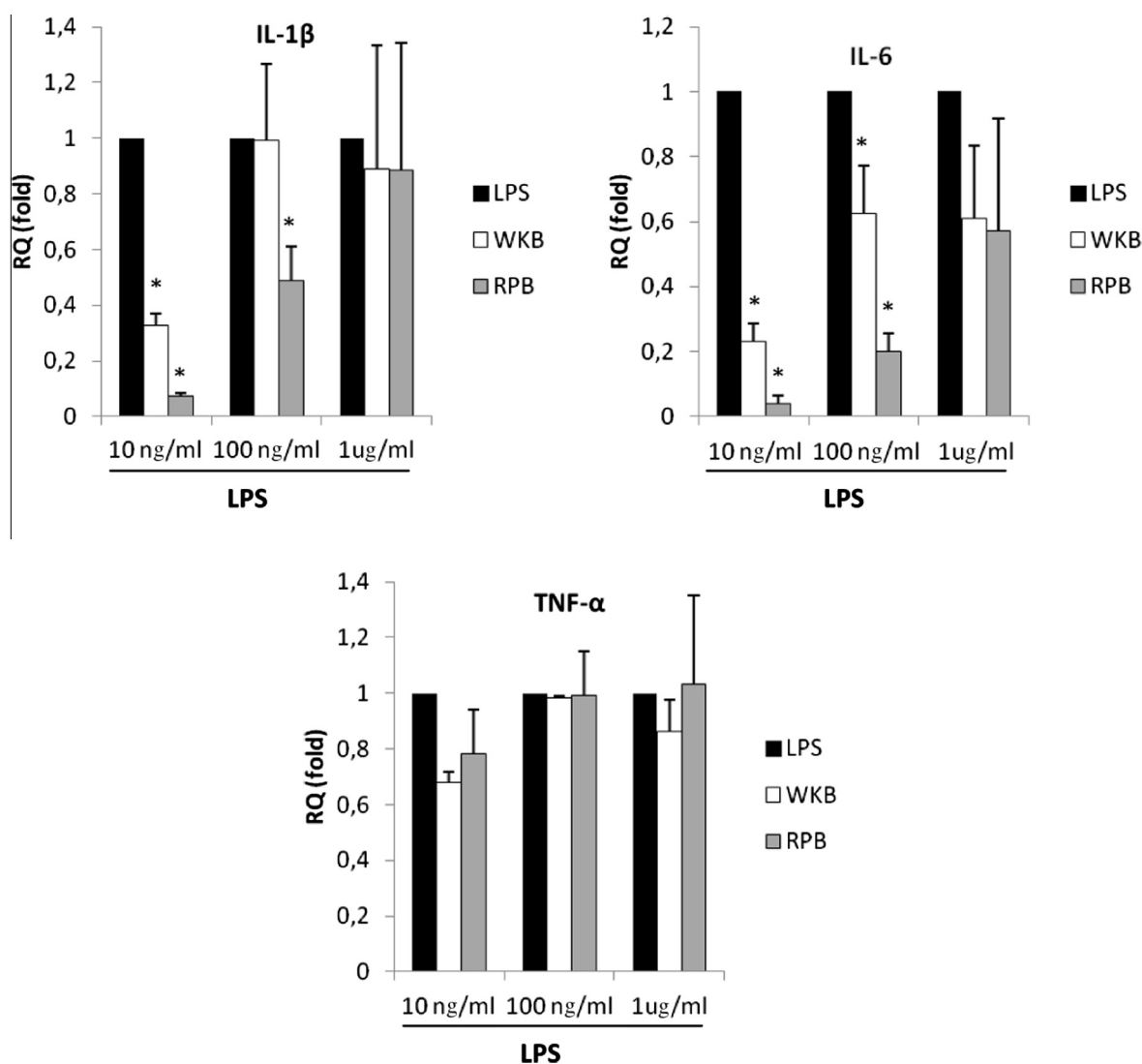


Fig. 3. Effect of methanolic bean extracts on mRNA expression of different proinflammatory genes. Cells were pretreated with 0.625 mg/ml of the extract: white kidney beans (WKB) or round purple beans (RPB) and then stimulated with different concentrations of LPS. Results are shown as fold of change (RQ) from reference treatment (LPS). Data represent the mean \pm SD of three different experiments * p < 0.05.

and kidney beans being a major source in particular (Espinosa-Alonso, Lygin, Widholm, Valverde, & Paredes-Lopez, 2006). In the present study the total phenolic content of extracts from white kidney beans and round purple beans was evaluated and the individual phenolic species were identified and quantified. The results obtained in both cases showed higher phenolic content in coloured beans than in white beans, and agree with those found in the literature for coloured and white beans (Anton, Ross, Beta, Gary Fulcher, & Arntfield, 2008; Heimler, Vignolini, Dini, & Romani, 2005; Ranilla, Genovese, & Lajolo, 2007; Xu, Yuan, & Chang, 2007).

The antioxidant and free radical scavenging power of phenolic compounds have been extensively studied over the last 10 years. Different studies have shown a correlation between phenolic content and antioxidant activity (Xu & Chang, 2008). In the present work the same results were obtained, the higher phenolic compounds content in bean extracts, the more antioxidant activity they exhibited. Extracts from red beans showed higher activity than those from white ones, in agreement with Madhujith et al. which demonstrated that beans, and especially those with coloured skins, possess strong antioxidant activity as measured by different model systems (Madhujith, Nacz, & Shahidi, 2004).

Macrophages play an important role in the cascade of events that produce inflammation. Stimulation of macrophages with LPS induces a high production of NO by the inducible enzyme iNOS (Boscá, Zeini, Través, & Hortelano, 2005; Gupta, Sundaram, Reuter, & Aggarwal, 2010). In the present work, bean extracts were able to reduce the production of NO in macrophages stimulated with LPS through the inhibition of iNOS mRNA expression. Besides NO, other mediators have been identified as important key factors in inflammation such as TNF- α or cytokines. There is a large body of evidence on the effect of phenolic compounds modulating inflammatory cascade at different levels, including the expression of inflammatory genes encoding interleukins (García-Lafuente et al., 2009). In our work, phenolic rich extracts from beans inhibited the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α genes of stimulated macrophages RAW 246.7, with coloured beans showing more activity than white beans.

Potential health benefits of common beans are attributed to the presence of phenolic compounds that possess antioxidant properties. The extent of anti-inflammatory activity may be associated with the antioxidant capacity and the phenolic content of the extract (Oomah, Corbé, & Balasubramanian, 2010). In our work, the studied extracts had a mixture of diverse phenolic compounds and the different compounds might contribute in different ways to the overall antioxidant and anti-inflammatory activities. The individual profile of phenolic compounds showed phenolic acids as the predominant components in white bean extracts, whereas coloured bean extracts presented mainly catechin derivatives, proanthocyanidins and catechin glucoside. These results are in accordance with bibliography (Aguilera, Estrella, Benitez, Esteban, & Martín-Cabrejas, 2011; López-Amorós, Hernández, & Estrella, 2006). Nevertheless, results obtained for coloured beans (RPB) presented higher concentrations of phenolic compounds, mainly catechin derivatives, procyanidins and catechin glucoside, which are only present in this kind of bean (Aguilera et al., 2011; Ranilla, Genovese, & Lajolo, 2009). Although most of these phenolic compounds are bioactive, the absence in WKB extracts of some potent active molecules such as catechin derivatives, proanthocyanidins, flavonols or anthocyanidins could explain the differences in activity found between both types of extract.

Epidemiological studies have indicated that populations that consume procyanidin rich foods have a lower incidence of inflammatory disease and diseases of multifactorial pathogenesis, including metabolic syndrome, atherosclerosis and cancer (Khan et al., 2010). Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that procyanidins can down regulate the transcription and secretion of proin-

flammatory cytokines, including interleukins IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , and interferon- γ (Al-Hanbali et al., 2009; Terra et al., 2009).

NF- κ B plays a critical role in the transcriptional regulation of a wide range of genes that are involved in inflammatory response and immunity. NF- κ B proteins exist normally in the cytoplasm of inactive cells, but upon stimulation they become active and translocate into the nucleus, inducing transcription of diverse inflammatory genes. In this study we found that phenolic rich extracts from common beans reduced the expression of NF- κ B p65 in the nucleus of LPS stimulated macrophage like cells. This effect was stronger for RPB than for WKB, suggesting that the studied extracts inhibited the expression of iNOS, IL-1 β , IL-6 and TNF- α via inactivation of NF- κ B pathway, although other points of regulation cannot be ignored. Ethanol extract derived from *Phaseolus angularis* was able to suppress NO and PGE₂ production at the transcriptional level, and this activity was linked to the suppression of some factors of different signalling pathways (Yu et al., 2001). Phenolic compounds from different origins have been proven to inactivate the NF- κ B pathway (Denis et al., 2013; Park et al., 2012; Terra et al., 2007) so that in our work the inhibitory effect on the nuclear expression of the p65 subunit may be attributed to the phenolic composition of the extracts.

Although TNF- α is a very important mediator involved in the inflammatory response in our work, the treatment with bean extracts was not able to reduce gene expression in response to high dose of LPS. We found similar results using mushroom extracts to reduce inflammatory response to LPS; phenolic rich extracts from some edible mushrooms species were able to reduce the production and expression of NO, IL-1 β , and IL-6 but not TNF- α (Moro et al., 2012). Regulation of the expression of different inflammatory genes is controlled by different signal transduction pathways such as NF- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK). The inhibition of NF- κ B produced by the extracts was not enough to reduce the TNF- α mRNA expression, suggesting that expression of different cytokines are regulated by different pathways.

5. Conclusions

Our work demonstrates that common beans exhibit both antioxidant and anti-inflammatory activities. Round purple bean extracts present higher phenolic content than white bean extracts and a different component profile related to differences in activity. Higher phenolic content was associated with higher antioxidant and anti-inflammatory activities. These data suggest that common beans, and in particular coloured beans, may be used as a source of anti-inflammatory compounds.

Acknowledgements

The authors acknowledge funding from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Projects AT07-003 and RTA2009-0049. C. Moro and N. Manchón acknowledge the award of their FPI INIA grants. The authors would also like to thank the participation of Rosario Vicente in the experimental part of this work, and Isabel Estrella and M. Teresa Hernández from the Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC) for allowing us to do the HPLC-MS analysis.

References

- Aguilera, Y., Estrella, I., Benitez, V., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44, 774–780.
- Al-Hanbali, M., Ali, D., Bustami, M., Abdel-Malek, S., Al-Hanbali, R., Alhussainy, T., et al. (2009). Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production

- with NF-kappaB nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuroendocrinology Letters*, 30, 131–138.
- Anton, A. A., Ross, K. A., Beta, T., Gary Fulcher, R., & Arntfield, S. D. (2008). Effect of pre-dehulling treatments on some nutritional and physical properties of navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT – Food Science and Technology*, 41, 771–778.
- Boscá, L., Zeini, M., Través, P. G., & Hortelano, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*, 208, 249–258.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Cardona, S. M., García, J. A., & Cardona, A. E. (2013). The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation, and homeostasis. *Methods in Molecular Biology*, 1013, 1–16.
- Curran, J. (2012). The nutritional value and health benefits of pulses in relation to obesity, diabetes, heart disease and cancer. *British Journal of Nutrition*, 108, S1–2.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 48–54.
- Denis, M. C., Furtos, A., Dudonné, S., Montoudis, A., Garofalo, C., Desjardins, Y., et al. (2013). Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One*, 8, e53725.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., & Rabanal, R. (2003). Phenolic composition and antioxidant activity of mocan seeds (*Visnea mocanera* L.f.). *Food Chemistry*, 82, 373–379.
- Espinosa-Alonso, L. G., Lygin, A., Widholm, J. M., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 4436–4444.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58, 537–552.
- Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799, 775–787.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., & Romani, A. (2005). Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 3053–3056.
- Hutchins, A. M., Winham, D. M., & Thompson, S. V. (2012). *Phaseolus* beans: impact on glycaemic response and chronic disease risk in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 108, S52–65.
- Khan, N., Monagas, M., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Rabassa, M., Estruch, R., et al. (2010). Targeted and metabolomic study of biomarkers of cocoa powder consumption effects on inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 21, 51–54.
- Lee, Y. J., Han, S. B., Nam, S. Y., Oh, K. W., & Hong, J. T. (2010). Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1539–1556.
- Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78, A18–25.
- López-Amorós, M. L., Hernández, T., & Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 277–283.
- Madhujith, T., Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 11, 220–233.
- Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., et al. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130, 350–355.
- Oomah, B. D., Corbè, A., & Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 8225–8230.
- Park, K. I., Kang, S. R., Park, H. S., Lee, D. H., Nagappan, A., Kim, J. A., et al. (2012). Regulation of proinflammatory mediators via NF-κB and p38 MAPK-dependent mechanisms in RAW 264.7 macrophages by polyphenol components isolated from Korea *Lonicera japonica* THUNB. *Evidence-Based Complementary and Alternate Medicine*, 12, 828521.
- Pradhan, A. (2007). Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders. *Nutrition Reviews*, 65, S152–156.
- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 1439–1452.
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2007). Polyphenols and antioxidant capacity of seed coat and cotyledon from Brazilian and Peruvian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 90–98.
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2009). Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected Brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 5734–5742.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012, 119–128.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Terra, X., Montagut, G., Bustos, M., Llopiz, N., Ardevol, A., Blade, C., et al. (2009). Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 210–218.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J. M., Arola, L., Ardèvol, A., et al. (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 4357–4365.
- Xu, B., & Chang, S. K. (2008). Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 8365–8373.
- Xu, B. J., Yuan, S. H., & Chang, S. K. (2007). Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science*, 72, S167–177.
- Yu, T., Ahn, H. M., Shen, T., Yoon, K., Jang, H. J., Lee, Y. J., et al. (2001). Anti-inflammatory activity of ethanol extract derived from *Phaseolus angularis* beans. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1197–1206.