



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA
DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE *Rattus
norvegicus* TRATADOS CON CICLOFOSFAMIDA”**

Trabajo de titulación presentado para obtener el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES: ALEXANDER DAVID CEPEDA VILLA

WALTER JACINTO LEON PILA

TUTORA: Dra. SANDRA ESCOBAR ARRIETA

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Alexander David Cepeda Villa, Walter Jacinto León Pila.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Pleurotus ostreatus* SOBRE *Rattus norvegicus* TRATADOS CON CICLOFOSFAMIDA” de responsabilidad de los señores Alexander David Cepeda Villa y Walter Jacinto León Pila, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Sandra Escobar

DIRECTORA DE TESIS

.....

.....

Dr. Iván Ramos

MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Nosotros, Alexander David Cepeda Villa y Walter Jacinto León Pila, somos responsables de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 15 de Marzo de 2017

Alexander David Cepeda Villa
060553534-3

Walter Jacinto León Pila
050390964-0

DEDICATORIA

A Dios, quien ha sido la guía que me ha permitido recorrer este largo y duro trayecto, permitiendo llegar hasta una de las metas más importantes de mi vida.

A mis padres, quienes han sido mi gran ejemplo y apoyo incondicional en todo momento, inculcándome valores que me permitieron ser una mejor persona, sonreír en todo momento, y a pesar de la adversidades y caídas que pueda tener, siempre levantarme, salir adelante y cumplir con mis objetivos propuestos.

Alexander

Dedico esta proyecto de tesis a mi Familia que con tanto esfuerzo y dedicación lograron transformarme en un ser útil y provechoso para la vida.

A mi madre, la mujer más amable, cariñosa y trabajadora que he conocido en toda mi vida, ella siempre ha sido mi faro de luz en la oscuridad, mostrándome lo que puedo llegar a ser, ella es la persona que me ha dado fuerza durante todo este tiempo, Gracias madre por acompañarme en este camino.

A mi padre, que con su mayor esfuerzo, cariño y un poco de terquedad, siempre supo cómo hacerme regresar a hacia la senda correcta, siendo humilde y responsable ante todas las situaciones. Gracias padre por mostrarme que no es necesario dañar a ningún ser para alcanzar la grandeza.

A mis hermanos que a pesar de no estar juntos me apoyan desde la distancia, enviándome siempre buenos deseos. Y a mis sobrinos/as que con sus sonrisas me alegran el día, a pesar de los problemas. Gracias Familia por estar conmigo y nunca abandonarme, los quiero mucho.

Walter

AGRADECIMIENTO

A dios por la vida, salud, sabiduría y por cada uno de los maravillosos y gratos momentos que me ha permitido vivir a lo largo de este largo camino recorrido.

A mis padres, por todo el apoyo moral y económico brindado, permitiéndome culminar con una meta más en mi vida. A mi hermana, por el apoyo y cariño brindado que me permitió seguir adelante en este largo trayecto sin rendirme en ningún momento.

A la Dra. Sandra Escobar y el Dr. Iván Ramos, quienes con su conocimiento y experiencia fueron un gran apoyo mediante la dirección y desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mis amigos y amigas que siempre estuvieron conmigo en todo momento, brindándome su apoyo incondicional y demostrándome que puede contar con ellos en todo momento.

Alexander

Agradezco a mi Familia, amigos y maestros por acompañarme durante este largo camino, enseñándome que las cosas buenas solo pueden obtenerse mediante esfuerzo y dedicación.

A mi madre, gracias a su apoyo moral y económico me permitió obtener esta oportunidad de avanzar en la vida A mi padre que con su firmeza y cariño me enseñó que nunca se debe dejar de ser humilde y trabajador.

A la Doctora Sandra Escobar por sus conocimientos, apoyo y paciencia impartidos que fueron de gran ayuda para el desarrollo del proyecto de titulación.

Al Doctor Iván Ramos que con su carisma y apoyo económico se pudo obtener la materia prima necesaria para la realización del proyecto de titulación.

A mis amigos de la universidad en especial a mi mejor amigo y camarada de tonterías (NAKAMA) John Ortiz que me enseñó que a pesar de ser de lugares distintos las personas pueden llegar a entenderse y formar una grandiosa amistad. A mi amigo y colaborador de proyecto David Cepeda, que me enseñó que el mundo es mejor verle con positivismo y no sentirse mal aun cuando las cosas sean difíciles.

Walter

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
Justificación de la investigación.....	2
Objetivos de la investigación	3
CAPÍTULO I	4
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1. Reino Fungi.....	4
1.1.1. Hongos.....	4
1.2. Genero <i>Pleurotus</i>	4
1.3. <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
1.3.1. Generalidades	5
1.3.2. Clasificación taxonómica.....	5
1.3.3. Propiedades Medicinales	6
1.3.4. Compuestos bioactivos del <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
1.4. Extracción de compuestos activos	8
1.4.1. Generalidades	8
1.4.1. Extracción mediante disolventes.....	8
1.5. Sistema Inmunológico.....	9
1.5.1. Generalidades.....	9
1.5.2. Antígeno y Anticuerpo	9
1.5.3. Respuesta Inmune	9
1.5.4. Inmunidad	10
1.5.5. Células del Sistema Inmunitario	10
1.5.5. Tipos de Inmunidad	13
1.5.6. Enfermedades del sistema inmune	14

1.5.7.	Inmunodeficiencias	14
1.5.8.	Enfermedades Autoinmunes	15
1.6.	Rata de laboratorio (<i>Rattus norvegicus</i>).....	16
1.6.1.	Condiciones de Mantenimiento de <i>Rattus norvegicus</i>	16
1.6.2.	Reproducción.....	18
1.6.3.	Valores hematológicos en <i>Rattus norvegicus</i>	18
1.6.4.	Sistema inmunológico de <i>Rattus norvegicus</i>	19
1.7.	Ciclofosfamida	21
1.7.1.	Mecanismo de Acción	21
1.7.2.	Farmacocinética.....	22
1.7.3.	Efectos secundarios	22
1.7.4.	Esquema de dosificación	23
1.7.5.	Farmacodinámica.....	23
CAPITULO II		24
2. PARTE EXPERIMENTAL.....		24
2.1.	Lugar de Investigación.....	24
2.2.	Materiales, Equipos y Reactivos	24
2.2.1.	Materia Prima	24
2.2.2.	Material Biológico.....	24
2.2.3.	Equipos	25
2.2.4.	Materiales de laboratorio	26
2.2.5.	Reactivos	27
2.3.	Métodos y Técnicas.....	28
2.3.1.	Recolección de la materia prima.....	28
2.3.2.	Limpieza de la materia prima	28
2.3.3.	Obtención del extracto.....	28
2.3.4.	Prueba de Molish (Identificación de azúcares).....	29
2.3.5.	Método de Fenol Sulfúrico	29
2.4.	Revisión parasitaria del material biológico (<i>Rattus norvegicus</i>).....	30

2.4.1.	Examen Coproparasitario	30
2.4.2.	Administración del antiparasitario (Tratamiento).....	31
2.5.	Evaluación de la actividad inmunomoduladora del <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
2.5.1.	Administración del Extracto	32
2.5.2.	Administración de la ciclofosfamida	32
2.6.	Biometría Hemática	32
2.6.1.	Conteo de Glóbulos Rojos	32
2.6.2.	Recuento de Plaquetas	33
2.6.2.1.	Fundamento.....	33
2.6.2.2.	Método	33
2.6.3.	Hematocrito	34
2.6.3.1.	Fundamento.....	34
2.6.3.2.	Método	34
2.6.4.	Hemoglobina	35
2.6.4.1.	Fundamento.....	35
2.6.4.2.	Método	35
2.6.5.	Recuento de Leucocitos.....	36
2.6.5.1.	Fundamento.....	36
2.6.5.2.	Método	36
2.6.6.	Recuento diferencial de Leucocitos.....	36
2.6.6.1.	Fundamento.....	36
2.6.6.2.	Metodología	37
2.7.	Análisis estadístico.....	37
CAPITULO III.....		38
3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS		38
3.1.	Identificación de azúcares en el extracto.....	38
3.1.1.	Prueba de Molish.....	38
3.1.2.	Método de fenol Sulfúrico	38
3.2.	Actividad Inmunomoduladora del extracto de <i>Pleurotus ostreatus</i>	42

CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Valores Hematológicos de referencia presentes en Ratas Hembra Wistar/UIS (<i>Rattus norvegicus</i>).....	19
Tabla 1-2: Preparación de la curva de calibración	30
Tabla 1-3: Absorbancia obtenidas por método espectrofotométrico de glucosa y muestra de extracto de <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
Tabla 2-3: Datos biométricos obtenidos por tratamiento con extracto de acuoso de <i>Pleurotus ostretus</i> a baja concentración en <i>Rattus norvegicus</i>	43
Tabla 3-3: Datos biométricos obtenidos por tratamiento con extracto de acuoso de <i>Pleurotus ostretus</i> a alta concentración en <i>Rattus norvegicus</i>	44
Tabla 4-3: Datos biométricos obtenidos mediante análisis de sangre en <i>Rattus norvegicus</i>	46
Tabla 5-3: Promedio de datos biométricos obtenidos mediante análisis de sangre en <i>Rattus norvegicus</i>	47
Tabla 6-3: Método de extracción por análisis de componentes principales en las variables obtenidas por tratamiento con extracto de acuoso de <i>Pleurotus ostretus</i> en <i>Rattus norvegicus</i> . 48	
Tabla 7-3: Varianza total explicada de los componentes principales en las variables obtenidas por tratamiento con extracto de acuoso de <i>Pleurotus ostretus</i> en <i>Rattus norvegicus</i>	49
Tabla 8-3: Análisis de los componentes por Método de rotación Varimax con normalización Kaiser. 6 Componentes extraídos.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
Figura 2-1: Diversos tipos de células sanguíneas del sistema inmune	10
Figura 3-1: <i>Rattus norvegicus</i>	16
Figura 4-1: Ratas en microambiente.....	17
Figura 5-1: Composición química de la Ciclofosfamida	21
Figura 6-1: Mecanismo de acción de la Ciclofosfamida	22

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1-3: Materia prima (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	11
Fotografía 2-3: Troceado de la materia prima	11
Fotografía 3-3: Pesaje de la materia prima	11
Fotografía 4-3: Lavado del hongo en etanol por 24 horas.....	11
Fotografía 5-3: Proceso de digestión de la materia prima.	11
Fotografía 6-3: Filtrado del extracto.....	11
Fotografía 7-3: Refrigeración del extracto a 4°C por 48h	12
Fotografía 8-3: Centrifugación	12
Fotografía 9-3: Prueba de Molish.....	12
Fotografía 10-3: Método del Fenol Sulfúrico.....	12
Fotografía 11-3: Preparado de las placas.....	12
Fotografía 12-3: Lectura de las placas.....	12
Fotografía 13-3: Antiparasitario (Albendazol)	13
Fotografía 14-3: Administración del antiparasitario.....	13
Fotografía 15-3: Material biológico (<i>Rattus norvegicus</i>)	13
Fotografía 16-3: Pesaje del material biológico.....	13
Fotografía 17-3: Cloruro de Sodio al 0.9%	13
Fotografía 18-3: Extracto acuoso de <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
Fotografía 19-3: Sedación de la rata.....	14
Fotografía 20-3: Administración del extracto.....	14
Fotografía 21-3: Administración de ciclofosfamida.....	14
Fotografía 22-3: Extracción de sangre a las ratas	14
Fotografía 23-3: Realización de las pruebas biométricas	14

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

ANEXO B. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EXTRACTO

ANEXO C. CONTROL PARASITARIO DEL MATERIAL BIOLÓGICO (*Rattus norvegicus*)

ANEXO D. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la evaluación de la actividad inmunomoduladora de un extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* sobre *Rattus norvegicus* tratados con ciclofosfamida. Este estudio se desarrolló bajo una metodología que consto de tres fases, la primera fase consistió en la extracción de un extracto acuoso de polisacáridos a partir del hongo *Pleurotus ostreatus*, utilizando como método de extracción un proceso de digestión (maceración a temperaturas elevadas); la segunda fase consistió en la evaluación de la actividad inmunomoduladora mediante un ensayo experimental en 15 ratas Winstar hembras (*Rattus norvegicus*), a las cuales se las dividió en tres grupos de estudio (blanco; alta y baja concentración), y se les administro el extracto a diferentes concentraciones según el grupo de estudio (0, 50 y 200mg/Kg) por vía intraperitoneal durante siete días, con la administración de una dosis única de ciclofosfamida por vía oral en el quinto día del estudio a los grupos de baja y alta concentración; la tercera fase consistió en la valoración de los efectos producidos por la administración del extracto en el organismo de los sujetos de estudio mediante la realización de biometrías hemáticas antes y después de la administración del extracto. Como resultado de este estudio se obtuvo que la administración del extracto, afecta principalmente a los niveles de dos tipos de células, los monocitos y los granulocitos, los cuales muestran niveles incrementados y relacionados de forma directamente proporcional a la concentración de extracto administrado, después del tratamiento. Se concluyó entonces que el uso del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* produce una modificación de las células del sistema inmunológico (monocitos y granulocitos), células de gran importancia en la respuesta inmunológica del organismo, principalmente ante procesos infecciosos. Se recomienda evitar prolongar las acciones que causen un estrés innecesario al espécimen, facilitando de esta manera el trabajo realizado.

Palabras clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <FITOQUÍMICA>, <ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA>, <HONGO (*Pleurotus ostreatus*)>, <GRANULOCITOS>, <CICLOFOSFAMIDA>, <B-GLUCANOS>, <POLISACARIDOS>, <BIOMETRÍA HEMÁTICA>.

SUMMARY

The present investigation aimed to evaluate the immunomodulatory activity of an aqueous extract of *Pleurotus ostreatus* on *Rattus norvegicus* treated with cyclophosphamide. The first phase consisted of the extraction of an aqueous extract of polysaccharides from the *Pleurotus ostreatus* fungus using a digestion process (maceration at high temperatures) as the extraction method. The first phase was the evaluation of immunomodulatory activity by an experimental test in 15 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), divided into three study groups (white, high and low concentration), and the extract was given to different concentrations according to the study group (0, 50 and 200mg / kg) intraperitoneally for seven days, with the administration of a single dose of cyclophosphamide orally on the fifth day of the study to the low and high concentration groups. The third phase consisted in the evaluation of the effects produced by the administration of the extract in the organism of the study subjects by means of the accomplishment of blood biometrics before and after the administration of the extract. As a result of this study it was obtained that administration of the extract mainly affects the levels of two types of cells, monocytes and granulocytes, which show increased levels and related directly proportional to the concentration of extract administered after treatment. It was concluded that the use of the aqueous extract of *Pleurotus ostreatus* produces a modification of the cells of the immune system (monocytes and granulocytes), cells of great importance in the immune response of the organism, mainly to infection processes. It is recommended to avoid prolonging the actions that cause unnecessary stress to the specimen, thus facilitating the work performed.

Key words: <TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCES>, <PHYTOCHEMISTRY>, <IMMUNOMODULATORY ACTIVITY>, <FUNGUS (*Pleurotus ostreatus*)>, <GRANULOCYTES>, <CYCLOPHOSPHAMIDE>, < β -GLUCANOS>, <POLYSACCHARIDES>, <HEMATOLOGICAL BIOMETRICS> .

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

Según la OMS actualmente, alrededor de 34 millones de personas en el mundo viven con algún tipo de enfermedad que produce inmunodeficiencia, según reportes recientes de ONUSIDA la mayoría de estas poseen VIH/SIDA. Por lo tanto, estas pandemias continúan siendo un motivo de preocupación para la comunidad sanitaria y científica a nivel mundial generando una necesidad de unificar esfuerzos para disminuir las cifras de morbilidad y mortalidad por dicha causa, especialmente en la población infantil. (Rodríguez, 2014, pp. 113-120)

Hoy en día uno de los mayores problemas de salud, constituyen aquellas enfermedades que están relacionados con las deficiencias del sistema inmunológico, ya que muchos de estos ocasionan complicaciones que pueden conllevar a la muerte. (De Luis, 2001, pp. 619-623)

Según Beatriz León, reportera de diario El Universo, en Ecuador, las inmunodeficiencias afectan en mayor proporción a la población infantil, ya que alrededor de diez mil niños son afectados por dichas patologías, pero no todos conocen acerca de su enfermedad. De cada 5 niños únicamente 1 de ellos llegara a la edad adulta, ya que muchos de estos defectos en el sistema inmunológico son causa de muerte; la mayoría de pacientes no son diagnosticados y los más susceptibles morirán antes de cumplir los 2 años, ya que una simple gripe puede ser fulmínate. Los pacientes inmunodeprimidos al no poseer defensas suficientes, poseen un riesgo mayor de muerte temprana, a pesar de poseer algún tipo de anormalidad física. (León, 2014)

Ecuador se encuentra en un nivel medio en la escala mundial y regional, colocando así a Ecuador como un país con una gran incidencia de enfermedades inmunológicas graves.

El sistema inmunológico al ser una red compleja de células, tejidos y órganos que funcionan como un equipo de defensa contra patógenos. Siendo considerado de esta manera como la principal línea de defensa principal contra las enfermedades, en el caso de que este sea vulnerado, permitirá el avance de microorganismos a centros susceptibles produciéndose así una enfermedad de tipo inmunológico. (Ochoa, 2002, pp. 352-354)

Estas enfermedades pueden ser tratadas con medicación o quimioterapia de ser necesario, especialmente si se detectan en una fase temprana de desarrollo, la mayoría de estos métodos no poseen una especificidad clara y generan efectos secundarios que pueden producir muerte a

células no patógenas. Es por ello, que por muchos años el uso de estos medicamentos ha sido opacado por los diversos efectos secundarios que estos producen. (Montero, 2005, pp. 41-50)

Debido a la gran cantidad de propiedades terapéuticas que se han atribuido a los hongos del género *Pleurotus*, como resultado de varias investigaciones; este género ha adquirido una mayor importancia en la actualidad, y en especial los polisacáridos que presenta, incluidos los β -glucanos, los cuales son considerados los principales responsables por sus propiedades terapéuticas (Facchini, 2014, p. 72).

Según un estudio realizado por (Kong 2014, p.561) se demostró, que un extracto de polisacárido extraído de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus. ostreatus* presenta efectos inmunomoduladores, al ser probado en ratones; en donde como resultado se obtuvo la inhibición significativa del crecimiento del sarcoma 180 en ratones portadores de tumores.

Justificación de la investigación

Debido a diferentes problemas relacionados con estados de malnutrición, cáncer, tratamientos con fármacos inmunosupresores, o las infecciones, especialmente por el virus como el VIH/SIDA las inmunodeficiencias se desarrollan. Los fármacos que poseen actividad estimuladora del sistema inmune se encuentran los modificadores de la respuesta biológica. Estas sustancias en grandes cantidades, causan efectos secundarios como capaces de modificar la respuesta normal del sistema inmunológico. (Llaurado, 2011, pp. 511-527)

Hoy en día existen diferentes factores capaces de producir deficiencias en el sistema inmunitario, es decir que dichos factores afectaran el sistema inmunológico produciendo debilitamiento frente a las células capaces de combatir dichas enfermedades. La capacidad de combatir infecciones variara dependiendo del estado en el que se encuentre sistema inmune. Ciertos tratamientos contra el cáncer, infecciones por VIH o una cirugía de trasplante son ejemplos de situaciones en las que el sistema inmunológico puede resultar inmunodeprimido. Las inmunodeficiencias se producen cuando una parte del sistema inmunológico no está presente o no funciona adecuadamente. (Santovenia, 2003, pp. 1-6)

Los pacientes inmunodeprimidos deben tener mucho cuidado, ya que incluso la infección más leve puede implicar el riesgo de hospitalización o muerte. Varios estudios revelan que una persona nace con inmunodeficiencia primaria, aunque puede que los síntomas del trastorno recién se manifiesten en etapas posteriores de la vida. Las inmunodeficiencias también se pueden adquirir a través de una infección o pueden ser producto de medicamentos, en algunos casos se denominan "inmunodeficiencias secundarias". Las inmunodeficiencias pueden afectar a los linfocitos B, los linfocitos T o los fagocitos. (Olabuena, 2000, pp. 205-215)

La medicina natural ha sido utilizada para el tratamiento de numerosas enfermedades en el transcurso de toda la historia de la humanidad. Desde la antigüedad se conocen los efectos beneficiosos de numerosas plantas sobre la salud humana, muchas de las cuales han sido utilizadas para curar y prevenir diversas enfermedades. (Rojas, 2013, pp. 107-123).

El ser humano al ver este problema que se producen durante el tratamiento de enfermedades inmunodeficientes ha buscado la forma de generar nuevos métodos para el control del mismo, utilizando nuevas técnicas que no impliquen la lisis celular y de esa manera disminuir los efectos adversos que se produzcan; uno de estos métodos ha sido la utilización de los recursos naturales con actividad inmunomoduladora. (Marovac, 2001, pp. 99-106)

Por lo tanto se considera justificada y de gran importancia el desarrollo de la presente investigación con la finalidad de generar nuevos métodos que garanticen la recuperación del paciente y disminuya el apareamiento de efectos secundarios a causa del tratamiento.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* sobre *Rattus norvegicus* tratados con ciclofosfamida.

Objetivos específicos

- Obtener un extracto de *Pleurotus ostreatus* mediante un proceso de digestión en medio acuoso.
- Identificar los polisacáridos presentes en el extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus*.
- Utilizar ciclofosfamida como sustancia control para la medición de la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* en *Rattus norvegicus*.
- Evaluar los efectos secundarios producidos por la utilización del extracto de *Pleurotus ostreatus*.
- Evaluar los efectos del extracto en el sujeto de estudio, mediante análisis biométricos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Reino Fungi

El reino Fungi es considerado uno de los grupos más grandes de organismos, con funciones y actividades de gran importancia para el ecosistema y otros organismos, además presenta una gran diversidad y variabilidad tanto en su morfología como en sus ciclos de vida. Dentro de este reino, se incluyen un inmenso número de organismos conocidos como hongos (Aguirre et al, 2014, pp.76-77).

1.1.1. Hongos

Son organismos que presentan una gran diferencia en relación con otros grupos de organismos, aunque en etapas anteriores fueron considerados en el grupo de las plantas debido a que no poseen movilidad y permanecen fijos en un solo sitio, además por poseer pared celular (Curtis y Barnes, 2007; p.5).

El hongo está formado por un cuerpo, al que se lo conoce como micelio, el cual está formado por varios filamentos, a los que se les denomina hifas, las paredes de las hifas están compuestas generalmente por quitina y polisacáridos; además posee un cuerpo fructífero, el cual produce esporas para la reproducción sexual del hongo (Kuhar et al, 2013, p11).

1.2. Genero *Pleurotus*

El género *Pleurotus*, también conocido como ostras, representa una de los tipos de hongo con mayor facilidad de cultivo, debido a su bajo costo económico, fácil adaptabilidad y productividad; por esta razón sus cultivos han ido adquiriendo una gran importancia en varios países.

Dichos hongos crecen con facilidad sobre varios desechos forestales y agrícolas, tales como: aserrín, pulpa de madera, bagazo de caña de azúcar, desechos de café como asientos, etc. Dentro

de este género, el más representativo y conocido es el *Pleurotus ostreatus*, pero también presenta otras especies de interés comercial como el *Pleurotus eryngii* y el *Pleurotus cornucopioides* (Barbado, 2003, pp.75-76).

1.3. *Pleurotus ostreatus*



Figura 1-1: *Pleurotus ostreatus*
Fuente: (López, 2014)

1.3.1. Generalidades

El *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprofítico, descomponedor y perteneciente al grupo de la podredumbre blanca, que crece generalmente en la corteza de árboles tales como el aliso, balsa y arce. Dicho hongo presenta carne delgada y blanca y se encuentra recubierto frecuentemente por una capa micelial en su base. La superficie del píleo es brillante, poco viscosa y lisa en tiempo húmedo, cuyo tamaño varía de acuerdo a las condiciones de fructificación, cuya superficie superior puede presentar variación en el color, con tonos entre blanquecinos, grises o azulados, dependiendo de la exposición a la luz. Su margen es ondulado, delgado, suave, y en ocasiones se presenta enrollado (Hernández y López, 2012: pp.27-28).

1.3.2. Clasificación taxonómica

Según (Varnero et al., 2010: p.14), el *Pleurotus ostreatus* se encuentra clasificado taxonómicamente de la siguiente forma:

REINO: Fungi

SUBREINO: Fungi Superior

DIVISIÓN: Basidiomycota

SUBDIVISIÓN: Basidiomycotina

CLASE: Basidiomycetes

ORDEN: Agaricales

FAMILIA: Agaricaceae

GÉNERO: *Pleurotus*

ESPECIE: *ostreatus*

1.3.3. Propiedades Medicinales

Entre las numerosas propiedades medicinales que ha presentado ciertas fracciones del *Pleurotus ostreatus* tenemos las inmunomoduladoras, antitumorales, antibacterianas, antiparasitarias, antivirales, cardiovasculares, antidiabéticas y hepatoprotectoras.

Entre los principales componentes del *Pleurotus ostreatus*, que presentan propiedades medicinales tenemos a los polisacáridos, los cuales presentan actividad inmunomoduladora, es decir que tienen la capacidad de estimular el sistema inmune brindando de esta manera protección al cuerpo y evitando el crecimiento de ciertos tumores (Roncero, 2015a, pp.10-12).

Además, dicho hongo presenta una fuente valiosa de nutrientes, así como también un sabor y aroma característico muy agradable, razón por la cual ha sido objeto de un creciente interés por el campo culinario. Estos alimentos pueden ser considerados como funcionales, debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos que presenta en su composición, lo cual genera efectos beneficiosos en la salud humana (Cortés et al, 2007, pp. 17-18).

1.1.3.1. Efectos inmunomoduladores

Esta variedad de hongo representa un importante fuente de polisacáridos de estructura compleja, a los cuales, según varios estudios e investigaciones se les ha encontrado una importante actividad moduladora de la respuesta inmune, mediante la cual estimula el sistema inmune y tiene la capacidad de actuar en contra de tumores, inhibiendo o retardando su crecimiento (Morris et al, 2011, pp.513-514).

1.3.4. Compuestos bioactivos del *Pleurotus ostreatus*

Se han identificado numerosos compuestos bioactivos en la composición de este tipo de hongo, en donde la concentración de cada uno de estos compuestos dependerá de la variedad de hongo, de su cultivo, del sustrato y de las condiciones de procesamiento, almacenamiento, etc. (Roncero, 2015b, p.9).

Dentro de los principales compuestos bioactivos responsables de cada una de las propiedades beneficiosas para la salud que presenta dicho hongo tenemos: Polisacáridos, , ligninas, terpenos, compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y lignanos), triterpenos, proteínas(contiene todos los aminoácidos esenciales), carbohidratos (polisacáridos), minerales (Potasio, fosforo, zinc, magnesio, hierro y cobre), y vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, ácido ascórbico, y biotina) (Ríos et al, 2010, p. 87).

1.3.4.1. Polisacáridos

Los polisacáridos son moléculas que se forman mediante la unión de varios monosacáridos entre sí. Existen dos grupos de polisacáridos, el primero denominado homopolisacáridos, que se caracterizan por estar formados por monosacáridos iguales; y el segundo grupo caracterizado por poseer en su estructura monosacáridos diferentes, a estos se los denomina heteropolisacáridos (Peña et al, 2004, p.143).

Los polisacáridos son los compuestos que presentan mayor actividad inmunoestimulante, ejerciendo su efecto mediante la activación de células efectoras del sistema inmune, principalmente los que se encuentran en la pared celular. Dentro de estos tenemos: celulosa, β -glucanos, quitina y complejos polisacáridos - proteína. Dichos compuestos pueden ser encontrados en el micelio cultivado, en los cuerpos fructíferos e incluso se puede extraer del medio en donde fueron cultivados (Ramírez, 2009, p.63).

1.3.4.1.1. β -Glucanos

Son un tipo de polímero de la glucosa que presenta enlaces tanto $\beta(1\rightarrow3)$, así como enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ en varias posiciones de la estructura, lo cual depende principalmente de la fuente de este polímero. Los β -lucanos son los responsables directos de la capacidad para regular el sistema inmune que presenta el *Pleurotus ostreatus* (Ziegler y Filer, 1997, p.627).

1.4. Extracción de compuestos activos

1.4.1. Generalidades

Las plantas constituyen una de las fuentes más importantes y de mayor utilización por parte tanto de las personas, que lo utilizan en medicina ancestral; como de las industrias farmacéuticas, que utilizan sus principios activos para la fabricación de diferentes medicamentos semisintéticos en la actualidad (Olivera et al, 2005, pp.453-454).

Para obtener los compuestos activos de la plantas, se utiliza diferentes métodos de extracción de las diferentes partes de la planta. A nivel popular se utiliza métodos tales como la infusión o decocción de la parte de la planta en la que se encuentran las sustancias de interés; a nivel de investigación más superiores se recurrirá a métodos más complejos , tales como la maceración, Soxhlet, etc. (Rivas et al, 2016, p.6).

1.4.1. Extracción mediante disolventes

Este tipo de extracción consiste principalmente en poner en contacto la planta con un disolvente, que generalmente puede ser agua, alcohol, una mezcla de estos dos., benceno o cloroformo; con el objetivo de que el principio activo pase al disolvente, para lo cual el los compuestos activos a extraer deben ser solubles en el disolvente empleado.

La extracción mediante disolventes puede ser *continua*, en la cual el disolvente es renovado cada cierto intervalo de tiempo, cuando se igualan las concentraciones entre planta y disolvente con la finalidad de extraer más principio activo; y *discontinua*, en la cual no existe renovación del disolvente, ya que la extracción termina cuando se igualan las concentraciones. Entre los métodos más utilizados tenemos la maceración, la digestión, etc. (Casado et al, 2012a, p. 168).

1.4.1.1. Maceración

Es un método de extracción sólido-líquido, que consiste generalmente en la extracción de los compuestos activos de una planta o de parte de ella, al poner en contacto la planta con un disolvente adecuado que puede ser alcohol o agua, etc., durante un cierto tiempo con agitación, al cual se lo denomina *maceración dinámica*; o en reposo, a la cual se le denomina *maceración estática*; este proceso se realiza generalmente a temperatura ambiente, pero también puede ser realizado a temperaturas más elevadas, en donde el proceso toma el nombre de digestión (Sharapin et al, 2000, pp.41-42).

1.4.1.2. Digestión

Este proceso presenta el mismo fundamento que la maceración, con la diferencia que en la digestión la extracción se realiza con temperaturas superiores a los 40°C, es decir a temperaturas más elevadas, y en un tiempo inferior a 24 horas (Casado et al, 2012b, p. 168).

1.5. Sistema Inmunológico

1.5.1. Generalidades

El sistema inmune constituye el medio de defensa natural del cuerpo humano, por tal razón es de gran importancia debido a que sirve de protección en contra de agentes microbianos patógenos, células tumorales, partículas extrañas, toxinas y procesos autoinmunes; mediante una serie de pasos.

El funcionamiento normal y correcto del sistema inmune, permite que se establezca un equilibrio biológico en el cuerpo humano, constituyendo de esta manera una fuerte barrera defensiva en contra de agentes nocivos y perjudiciales; caso contrario, se producirá un estado de inmunodeficiencia, permitiendo el ingreso de agentes nocivos al cuerpo, teniendo como consecuencia la adquisición de enfermedades (Zaldivar, 2002, p.352).

1.5.2. Antígeno y Anticuerpo

Bajo la denominación de antígeno se conoce a una sustancia que al ingresar en nuestro organismo provoca la producción de anticuerpos generando así una respuesta inmunitaria. La reacción antígeno-anticuerpo es específica, es decir que un antígeno puede combinarse únicamente con un anticuerpo, lo cual puede conllevar a la neutralización de un efecto tóxico de una toxina bacteriana, así como también a la inhibición de la multiplicación en el caso de los virus (Condori, 2011, p.672).

1.5.3. Respuesta Inmune

El sistema inmunitario tiene como función principal la discriminación de lo propio, de lo no propio y destruir o eliminar el agente extraño. Para el reconocimiento y eliminación subsiguiente de los antígenos extraños se necesita una red completa de células órganos y factores biológicos especializados. Tanto las células T como las B necesitan migrar a todo el

cuerpo para aumentar la posibilidad de encontrar un antígeno con el cual presente especificidad.

Las principales vías para la eliminación del antígeno son: la respuesta celular, la cual consiste en matar directamente a las células blancas mediante linfocitos T citotóxicos; y la respuesta humoral que consiste en eliminar el antígeno mediante eventos mediados por anticuerpos que se originan de interacciones entre los linfocitos T y B (McPhee y Ganong, 2007a, pp. 35-36).

1.5.4. Inmunidad

Es un estado de defensa, protección o resistencia que presentan los seres vivos en contra de la acción patógena de sustancias tóxicas de microorganismos u otras sustancias extrañas que pudieran ingresar al organismo, mediante un conjunto de mecanismos.

Esta propiedad es adquirida antes del nacimiento y se va desarrollando y afianzando durante los primeros años de vida, aspecto de gran importancia en el desarrollo de los vertebrados, ya que permite diferenciar lo propio de lo ajeno (Gerard et al, 2007, p.476).

El sistema inmune es el responsable de conferir inmunidad, por medio de la cual, los organismos a pesar de vivir en un entorno con elevada contaminación de microorganismos patógenos, solo en algunas ocasiones sufren de procesos infecciosos u otras enfermedades evidentes desde el punto de vista clínico, que además con el adecuado tratamiento presentan una recuperación rápida y sin muchas complicaciones (Fainboim y Geffner, 2008, pp.1-2)

1.5.5. Células del Sistema Inmunitario



Figura 2-1: Diversos tipos de células sanguíneas del sistema inmune

Fuente: (Badía y García, 2013)

El sistema inmunitario consiste en una red de células y órganos que se extienden alrededor de todo el cuerpo, también conocido como sistema linfoide, debido a que sus células principales son los linfocitos. Estas células son uno de los cinco tipos de leucocitos que existen y se caracterizan por ser células redondeadas y uniformes, que carecen de gránulos visibles y que presentan un tamaño muy pequeño (Ingraham y Ingraham, 1998a, pp.400-401).

Entre los componentes principales, que conforman el sistema inmunitario tenemos: los monocitos, macrófagos, linfocitos, y la familia de las células granulocíticas, dentro de las cuales incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Mcphee y Ganong, 2007b, p.32).

1.5.5.1. Monocitos

Los monocitos son leucocitos que circulan por la sangre, que se caracterizan por ser de gran tamaño, con tener un núcleo dentado, lo cual los diferencian de los granulocitos. Estas células son todas iguales, del cual proviene su nombre.

Los monocitos son progenitores móviles del macrófago tisular sedentario, los cuales se transportan a través de sangre hacia los tejidos, en donde después de un proceso de maduración se convierten en macrófagos y allí permanecen (Parham, 2006, p.13).

1.5.5.2. Macrófagos

Son células que presentan un gran capacidad fagocítica, mediante la cual eliminan los agentes patógenos, se originan a partir de los monocitos que ingresan a los tejidos y permanecen en los tejidos del cuerpo. Los macrófagos fagocitan el antígeno en respuesta a la estimulación antigénica, en seguida lo procesan y lo presentan a los linfocitos T de una manera reconocible.

Existe un tipo especial de macrófago que es conocido como células microgliales, que se localizan a nivel del sistema nervioso central, en esta porción del cuerpo dichas células constituyen alrededor del 20% de las células neurogliales, en donde actúan localizando y eliminando neuronas dañadas y agentes patógenos (Bastarrachea et al, 2007, pp. 506-507).

1.5.5.3. Linfocitos

Son células con aspecto uniforme y redondeado con núcleo redondeado, escaso citoplasma y que carecen de gránulos, representan alrededor del 20 a 40 % de los leucocitos presentes en sangre.

Existen dos tipos principales de linfocitos; los linfocitos B conocidos también como células B, y que responden a los antígenos mediante la producción de anticuerpos; y los linfocitos T conocidos también como células T, que responden a los antígenos matando células marcadas. Estos dos tipos de células reconocen antígenos de las superficies de todas las células y virus que inducen una respuesta de los linfocitos (Ingraham y Ingraham, 1998b, p.400).

1.5.5.4. Granulocitos

Los granulocitos se caracterizan por presentar una gran cantidad de gránulos en el citoplasma, estos gránulos al entrar en contacto con colorantes ácidos como el eosina, o colorantes básicos como el azul de metileno y el azul; se tiñen; aspecto de gran importancia al momento de clasificarlos. Este grupo de células se divide en: neutrófilos, basófilos y eosinófilos (Welsh, 2009, p.211).

1.5.5.4.1. Neutrófilos

Son células fagocíticas, que se caracteriza por presentar núcleos lobulados en número de uno a tres; constituyen del 50 al 60% de los leucocitos en sangre. Su función principal es la fagocitosis inespecífica de antígeno y la destrucción de partículas y microorganismos extraños.

En la mayoría de infecciones el neutrófilo cumple un papel de efector y posteriormente de destructor, mientras que en la sangre y en los espacios extravasculares su efecto protector lo ejercen mediante una acción recíproca con el anticuerpo (Arias et al, 2000, p.328).

1.5.5.4.2. Basófilos

Son células que se caracterizan por presentar gránulos de gran tamaño, que esconden al núcleo, el cual consta de dos lóbulos. Los basófilos tienen una función muy importante en las respuestas alérgicas inmediatas y de fase tardía.

Estas células liberan muchos de los potentes mediadores de las enfermedades inflamatorias alérgicas entre las que se incluyen: histamina, leucotrienos, prostaglandinas, etc., las cuales son de gran importancia en la respuesta inflamatoria (Mcphee y Ganong, 2007c, p.32).

1.5.5.4.3. Eosinófilos

Son células derivadas de la médula ósea, que contienen núcleo bilobulado y representan alrededor del 1 al 3% de leucocitos en sangre. Los eosinófilos se encuentran principalmente en tejidos inflamados y tienen una función muy importante en la defensa contra parásitos.

Además participan en respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, lo cual justifica su presencia en tejidos sanos no inflamados, como el aparato digestivo y los tejidos linfoides. A pesar de presentar muchas similitudes funcionales con los neutrófilos, estos son mucho menos eficientes en la fagocitosis (Wolff, 2009, p.284).

1.5.5. Tipos de Inmunidad

La inmunidad en los seres humanos puede dividirse en tres: adquirida, innata y pasiva.

1.5.5.1. Inmunidad innata

Todos los seres vivos presentan una inmunidad innata o natural. Este tipo de protección es general permitiendo que el cuerpo haga frente ante diferentes microorganismos, es decir estos microorganismos pueden llegar a afectar a otras especies mientras que al nuestro no. Dentro de la inmunidad innata se encuentran las barreras externas, tales como las mucosas y piel. Ambas constituyen la línea primaria de defensa contra enfermedades que intenten ingresar al cuerpo. En caso que una de estas se rompa las células inmunitarias atacan a los gérmenes invasores. (Tortora 2007a, p. 475)

1.5.5.2. Inmunidad adquirida

La inmunidad adquirida se refiere a las defensas que se presentan para el reconocimiento específico de un microorganismo, es el segundo mecanismo de protección que posee el cuerpo, es conocida también como inmunidad adquirida o activa, además esta se modifica durante el transcurso de la vida, ya sea mediante exposición a enfermedades o inmunización mediante vacunación. En el proceso de Defensa la inmunidad adquirida involucra Linfocitos de Tipo T y B (Tortora, 2007b, p. 475)

1.5.5.3. Inmunidad pasiva

La inmunidad pasiva como su nombre lo explica es prestada de otra fuente y dura poco tiempo. Es un tipo de inmunidad contraria a la activa ya que el propio organismo no puede generar los anticuerpos. Ejemplo Los anticuerpos presentes en la leche materna, estos sirven como vacunas temporales del bebe, ayudan a proteger al mismo contra enfermedades a las que la madre estuvo expuesta. (Chavarrias, 2002, p. 349).

1.5.6. Enfermedades del sistema inmune

Las enfermedades por inmunodeficiencias son estados patológicos en los que se constata un defecto parcial o total en uno o varios de los componentes del sistema inmune. Estas enfermedades pueden resultar de un trastorno intrínseco del sistema: inmunodeficiencias primarias (IDP) o aparecer como consecuencia de algún proceso patológico a otro nivel que secundariamente afecta la inmunidad: inmunodeficiencias secundarias. (Guntinas, 2003, p. 263)

1.5.6.1. Manifestaciones Clínicas

Las posibles señales de un problema en el sistema inmune pueden ser la presencia de infecciones recurrentes o que no son eliminadas. Además de infecciones graves causadas por microorganismos parcialmente patógenos o no patógenos. Durante las infecciones en personas con el sistema inmune pobre el tratamiento contra una enfermedad presenta una respuesta deficiente, además la enfermedad puede tener un tiempo de recuperación parcial o atraso de la misma. (Escalona, 2013, p. 4)

1.5.7. Inmunodeficiencias

Dentro del término inmunodeficiencias se encuentra todo un conjunto de alteraciones tanto cuantitativas como cualitativas de los diferentes componentes del sistema inmunológico. Esta dependiendo del tipo de defecto en el sistema inmune puede clasificarse en 2 grupos: inmunodeficiencias congénita o primaria e inmunodeficiencia adquirida o secundaria. (Sanchez, 2010, p. 199)

1.5.7.1. Inmunodeficiencia primaria

La inmunodeficiencia de tipo congénita se debe principalmente a un trastorno de tipo genético del sistema inmune. La incidencia de las inmunodeficiencias de tipo congénito es muy variable, pero entre las más conocidas tenemos a que se debe a un déficit de IgA en el organismo. En otro caso se afirma que las personas con infecciones recurrentes pueden ser portadores de inmunodeficiencia primaria. Aunque si bien son cierto las infecciones puede ser un signo de Inmunodeficiencia primaria no hay que descartar la posibilidad de que el paciente el organismo puede subestimar el número de infecciones que puede tratar para su edad y condiciones de vida. (Hernandez, 2010b, pp. 3)

1.5.7.2. Inmunodeficiencia Secundaria.

Esta inmunodeficiencia de tipo secundario se produce debido a un gran conjunto de a patologías las cuales afectan al sistema inmune, debilitándolo de tal manera que lo vuelven susceptible frente a microorganismos externos. (Hernandez, 2010a, pp. 2)

1.5.8. Enfermedades Autoinmunes

Cuando una persona presenta un sistema inmunológico hiperactivo los linfocitos se aglomeran en zonas específicas del cuerpo para atacar células sanas del cuerpo por error, produciendo inflamación. Ninguna persona sabe a ciencia cierta cuál es la principal causa de enfermedades autoinmunes debido a los diferentes factores implicados en estas. Los virus, bacterias, hormonas, genéticos e incluso los factores ambientales y químicos pueden ser causa de dichas enfermedades. (Kokuina, 2001, pp. 36-44)

1.5.8.1. Tratamiento de las Enfermedades Autoinmunes

Para combatir las diferentes enfermedades del sistema inmunológico se ha empleado diferentes procedimientos tales como el uso de fármacos antiinflamatorios (AINES) y glucocorticoides, para el tratamiento de la inflamación producida las células hemáticas. Ejemplos de estos aines está el naxopreno, ibuprofeno e incluso la aspirina.

Los glucocorticoides son una alternativa para el tratamiento de la inflamación, tales como la prednisona y cortisona son ejemplos de glucocorticoides para el tratamiento de la inflamación.

Otros fármacos como el metotrexato se encargan de bloquear el sistema inmune. (Serra, 2012, pp. 158-170).

1.6. Rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*)

La rata gris, marrón o china (*Rattus Norvegicus*), también conocida como rata de laboratorio, es un tipo de roedor de la familia Muridae, comúnmente utilizado en prácticas científicas. Debido a su rápida fácil manipulación y reproducción. El parecido a nivel genético entre Seres Humanos y la especie *Rattus norvegicus* ha permitido comparar genes, con el fin de determinar el mecanismo de las enfermedades humanas basándonos en modelos animales. (Bernis, 2001, p. 248).



Figura 3-1: *Rattus norvegicus*

Fuente: (Las maravillas de la ciencia y tecnología, 2015)

1.6.1. Condiciones de Mantenimiento de Rattus norvegicus

1.6.1.1. Morfología

La especie *Rattus Norvegicus* presenta un peso de 300 a 400 g en su etapa adulta, sus dimensiones varían de 21 a 27 cm, su cola mide 17 a 22 cm. Presentan un cuerpo tosco y una cola cubierta de escamas, sus orejas son cortas y su hocico es más romo. Además el manto del lomo presenta un color gris. (Aulagnier, 2009a, p. 274).

1.6.1.2. Alimentación

La alimentación que presenta el *Rattus Norvegicus* es voraz e omnívora ya que este puede consumir lo equivalente 1/3 de su peso por día, prefiere los alimentos ricos en féculas y proteínas tales como cereales. Aunque no es lo único que come ya que este también prefiere comer carne, pececillos, lombrices y cualquier material vegetal como semillas. Además no desprecia materiales como cartón huesos etc. (Aulagnier, 2009b, p. 274).

1.6.1.3. Convivencia

Según lo expresado por (Paredes, 2008a, p. 11) es preferible mantenerlos en grupo o parejas de preferencia hembras, debido a su rápida reproducción. A diferencia los ratones machos la convivencia es más complicada, por lo cual no se recomienda colocar más de uno en los lechos.

1.6.1.4. Alojamiento

El material que se colocara en los lechos deberá ser de tipo absorbente, por ejemplo viruta de madera, esta debe estar libre de partículas alergénicas y sustancias tóxicas. No deben presentar polvillo y deben ser esterilizables. (Paredes, 2008d, p. 46).



Figura 4-1: Ratas en microambiente

Fuente: (Animal Bioterio Web Site, 2016)

1.6.1.5. Microambiente

El microambiente es considerado como el medio que más tiene contacto con la rata, es decir su sitio de confinamiento o encierro primario. Este deberá contener todos los aditamentos para garantizar la supervivencia del sujeto, es decir que este deberá estar provisto de un perímetro delimitado, cama o jaula, alimento y agua; además se deberá eliminar cualquier elemento capaz de producir estrés en la rata. Se deberá garantizar que la jaula en la que se encuentre presente un espacio adecuado que le permita movilidad y la adopción de una postura adecuada. (Paredes, 2008b, p. 24).

1.6.1.6. Macroambiente

El macroambiente es el espacio siguiente al microambiente y es en este en donde se colocara al microambiente. Cualquier alteración en el macroambiente como respuesta también afectara al microambiente produciendo así la variación de los resultados. El macroambiente deberá poseer una ventilación con presión positiva con el fin de evitar que patógenos entren del exterior. (Paredes, 2008c, p. 32).

1.6.2. Reproducción

Esta especie alcanza la madurez sexual entre los 60 y 90 días. Presenta entre 8 a 12 camadas por año. El periodo de reproducción es corto ya que su copula no dura más de 2 a 3 segundos y su periodo de gestación no excede de 22 a 24 días. Después de este periodo las hembras dan a luz de 1 a 16 crías. Normalmente las crías no son de 8 a 12, y son alimentas por la madre durante el primer mes. (Williams, 2003, pp. 143-148.).

1.6.3. Valores hematológicos en *Rattus norvegicus*

Según lo expresado por (Hernán, 2010, p. 46) un el hemograma es el procedimiento más común a nivel de laboratorio con requerimientos mínimos de equipo y de mayor importancia, ya que la información obtenida proporciona una idea muy confiable del estado general de la salud del paciente.

Tabla 1-1: Valores Hematológicos de referencia presentes en Ratas Hembra Wistar/UIS (*Rattus norvegicus*).

Parámetros	Unidad	Promedio
Hematocrito	%	48,38
Hemoglobina	g/dL	13,90
Total de Glóbulos Rojos	106/mm ³	7,12
Total de Glóbulos Blancos	103/mm ³	12,92
Neutrófilos	103/mm ³	1,30
Linfocitos	103/mm ³	11,41
Monocitos	103/mm ³	0,05
Eosinófilos	103/mm ³	0,13
Basófilos	103/mm ³	0,02
Cayados	103/mm ³	0,01
VCM	fL	69,8
CHCM	g/dL	28,89
HCM	Pg	19,99

Realizado por: David Cepeda y Walter León

Fuente: Comparison of hematology reference values of strain wistar/UIS (*Rattus norvegicus*) with parameters established in standards laboratories

1.6.4. Sistema inmunológico de *Rattus norvegicus*

El sistema inmunológico de esta especie es similar a la humana, constituye la principal barrera de defensa y protección de esta especie. Las células del sistema inmune se originan en base a células precursoras correspondientes a la médula ósea, a partir de la cual se generan las diferentes células, tales como células macrófagas, linfocitos, granulocitos, etc.

En la actualidad, mediante varios estudios realizados en este campo, se ha demostrado que varias de estas células, principalmente los linfocitos son responsables de la respuesta inmune, tanto de la mediada por células (respuesta celular), así como también de la mediada por anticuerpos (respuesta humoral) (Rodríguez, 2013, p.21).

1.6.4.1. Enfermedades del sistema inmunológico en *Rattus norvegicus*

Casi todos los genes humanos asociados a una enfermedad tiene contrapartes en la especie *Rattus norvegicus*, por ello esta puede ser utilizada para generar modelos genéticos por inducción de enfermedades humanas en ratas. Debido a los resultados de estos estudios se ha demostrado que pequeñas variaciones ya sean fisiológicos o funcionales en la especie *Rattus norvegicus* pueden desarrollar enfermedades de tipo alérgico o autoinmunes, debido a que un factor común en dichas enfermedades es un sistema inmune comprometido.

Dentro del sistema inmune del *Rattus norvegicus* existen glóbulos blancos, que cumplen un papel doble en el sistema inmune. Las células llamadas T CD4 + activa la respuesta inmune, mientras que otras conocidas como las células T reguladoras activa una acción contraria, es decir la desactiva. Estos dos aspectos son importantes en la respuesta inmune ya que la alteración de los mismos pueden causar la aparición de respuestas inmunes exageradas (alergias o enfermedades autoinmunes) y por lo tanto produce que el sistema inmune ataque a sus propios tejidos y células. (Animal researched, 2004, pp. 428, 493)

1.6.4.2. Inmunodeficiencias en Rattus norvegicus

La inmunodeficiencia puede ser producida en un organismo sano esto se debe a que cuando en sus primeros días de vida a la especie *Rattus norvegicus* se le extrae el timo esta puede incrementar de mayor forma su susceptibilidad frente a enfermedades debido a que el timo es un ente regulador del sistema inmune. A estos sujetos se los denomina “desnudos”, debido a su falta de pelaje; estos son capaces de recibir injertos e infecciones, sin mostrar rechazo alguno, producido por las células inmunológicas. (Carbone, 2006, pp. 19-23)

1.6.4.3. Enfermedades autoinmunes tiroideas

Las denominadas Enfermedades autoinmunes tiroidea o EAT aparecen en diferentes especies animales como gatos, perros, pollos, ratones y ratas. Los tres últimos son los utilizados en mayor cantidad en investigaciones. En *Rattus norvegicus* es posible estudiar los efectos de las múltiples endocrinopatías de tipo autoinmune como son las tiroiditis linfocíticas y la diabetes mellitus. En los seres humanos la primera enfermedad que se produce es la Tiroiditis linfocítica, seguida de la diabetes mellitus, dichas enfermedades son producidas por la fagocitosis linfocítica de las células Beta del páncreas.

Esto se produce por la introducción de células linfocíticas capaces de realizar destrucción folicular, su potencia dependerá de genética que presente la especie, es decir que en una especie será más recurrente que en otra. En las ratas más propensas a sufrir estas enfermedades son aquellas que tienen anticuerpos contra células de musculo liso, antioglobulinas, células pancreáticas entre otras. (Bernard, 1992, pp. 40-41)

1.7. Ciclofosfamida

La Ciclofosfamida es un agente es un compuesto perteneciente la Familia de los Fármacos Alquilantes y puede retrasar el crecimiento celular en cualquier fase del ciclo celular. Posee actividad citotóxicos debido a su elevada interacción con la doble Hélice del DNA, ya que en esta genera puentes rígidos que evitan la replicación del DNA. Es sistema hematológico es el más susceptible a su acción lo que explica su actividad inmunosupresora. (Baltar, 2010, p. 9)

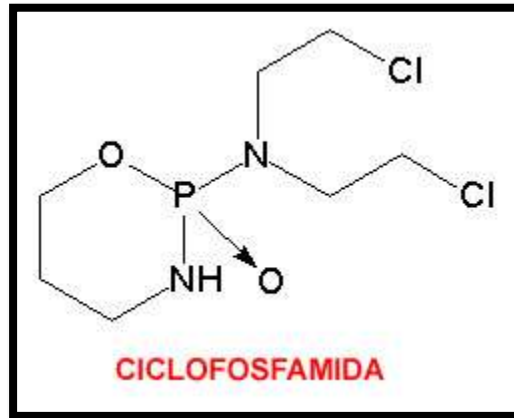


Figura 5-1: Composición química de la Ciclofosfamida

Fuente: (Vademecum Español, 2015)

1.7.1. Mecanismo de Acción

La ciclofosfamida es un profármaco que necesita ser activado por enzimas microsomales hepáticas y de esa manera generar efectos citotóxicos. Las enzimas transforman primeramente la ciclofosfamida en 4 – hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida, luego en fosforamida y acroleína ambas sustancias capaces de alquilar al DNA. Estos agentes alquilantes impiden la duplicación del DNA y por lo tanto provocan necrosis celular La inmunosupresión producida por la ciclofosfamida causa linfopenia (disminución de células B y T) y supresión selectiva de linfocitos B, además disminuye la producción de las inmunoglobulinas, retrasa la actividad de la actividad de los linfocitos y en ciertos casos inhibe las células T supresoras. (Lieberman, 2008, p. 460).

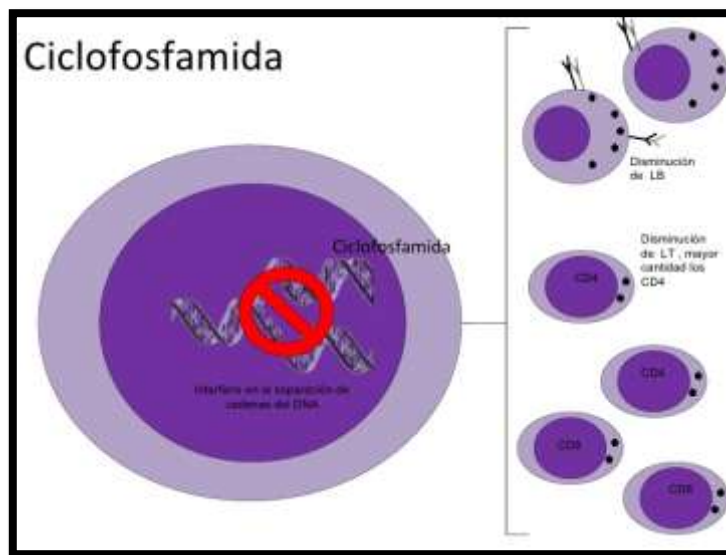


Figura 6-1: Mecanismo de acción de la Ciclofosfamida
Fuente: (Salud y Medicina 2008)

1.7.2. *Farmacocinética*

Por vía oral la ciclofosfamida se absorbe en el tracto digestivo y se metaboliza en el hígado. Presenta una biodisponibilidad del 74 %, se distribuye con gran facilidad en el organismo pero en dosis insuficientes no atraviesa la barrera hematoencefalica. Solo una pequeña porción de ciclofosfamida se une a las proteínas plasmáticas y no más del 10 a 20 % es eliminado en la orina de forma inalterada. (Fernandez, 2008, p. 567).

1.7.3. *Efectos secundarios*

Entre los más importantes efectos secundarios de la ciclofosfamida se encuentran:

- ✓ Produce disminución de las células sanguíneas incrementando de esa manera la probabilidad de contraer una infección.
- ✓ Produce disminución de las células germinativas en hombres y mujeres.
- ✓ Produce caída de cabello, cambio de coloración en uñas.
- ✓ Disminución del apetito acompañado de náuseas y vómitos.
- ✓ Su uso prolongado puede producir cáncer a la sangre.

La mayoría de los efectos secundarios pueden ser controlados. Además existen varios métodos para disminuirlos. (Ferreiro, 2003, pp. 69-74)

1.7.4. Esquema de dosificación

El fármaco ciclofosfamida en comprimidos tiene una concentración de 25 mg y 50 mg, al igual que su versión inyectable. La ciclofosfamida administrada por vía oral no debe superar la cantidad de 1 a 5 mg/Kg/día divididos o en una sola dosis. Para la administración se recomienda tener una abundante hidratación antes y durante con el fin de reducir su toxicidad. Para la administración en roedores es necesario realizar una dilución previa del medicamento tomando en cuenta la cantidad en función del peso. Además de que es necesario tomar en cuenta los límites de toxicidad (Wolff, 2008, p. 2172)

1.7.5. Farmacodinámica

La ciclofosfamida modifica los mecanismos de división celular, debido a la formación de enlaces en el DNA celular. Probablemente la principal causa de muerte celular sea debido a las alquilaciones producidas a nivel de DNA. La ciclofosfamida tiene una citotoxicidad dependiente de la dosis y se presenta con mayor recurrencia en células con alta proliferación como las que se encuentran en el tracto digestivo, gónadas y medula ósea. Después de la administración de ciclofosfamida la disminución de células sanguíneas alcanzara un punto mínimo de 10 a 12 días pero con una tasa de recuperación de 21 días. No es aconsejable administrar la ciclofosfamida con un mielosupresor ya que este incrementa los efectos tóxicos.

Leucopenia o Trombocitopenia son las patologías más comunes durante el tratamiento, aunque estas pueden ser revertidas al suspender la dosis del fármaco. Debido a la citotoxicidad que presenta la ciclofosfamida muchas de las respuestas inmunológicas serán disminuidas y por lo tanto el sujeto será más susceptible a enfermedades. (Salmon, 1998, pp. 1015, 1017)

CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar de Investigación

La presente investigación se llevó a cabo en:

- Obtención del extracto: Laboratorio de Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Cuantificación de los polisacáridos: Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Evaluación de la actividad inmunomoduladora: Bioterio de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Análisis de Biometría Hemática: Laboratorio Clínico Bacteriológico BIO-LAB

2.2. Materiales, Equipos y Reactivos

2.2.1. *Materia Prima*

Como materia prima se utilizó las diferentes partes frescas del hongo *Pleurotus ostreatus*, el cual fue cultivado y obtenido en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, de la Ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.2.2. *Material Biológico*

En el estudio de la actividad inmunomoduladora se utilizó ratas (*Rattus norvegicus*).

2.2.2.1. Descripción

Nomenclatura: Cr1 (WI) BR

Peso promedio: 120,1-196,5g

Edad: 4 meses

Sexo: Hembras

Lugar de nacimiento: Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2.2.2. Condiciones ambientales

Humedad relativa: 55% +/-10

Temperatura: 22°C +/- 2

Periodo de luz-oscuridad: 12 horas cada uno.

Cama con viruta: cambio cada 48 horas

Alimento: Balanceado para roedor en forma de pellets (15g) y Agua marca Vivant.

2.2.3. Equipos

- Balanza analítica
- Refrigeradora
- Centrifuga
- Sorbona
- Espectrofotómetro
- Homogeneizador
- Microscopio
- Cámara fotográfica
- Computador
- Agitador Automático

- Cronometro

2.2.4. *Materiales de laboratorio*

- Balones aforados de 100 ml.
- Vasos de precipitación 50, 100, 250, 500 y 2000 ml
- Pipetas volumétricas 1, 5, y 10mL
- Probetas 25 y 50 ml
- Trípode
- Varilla de agitación
- Reverbero
- Embudo buchner
- Kitasato
- Mangueras
- Termómetro
- Frascos de vidrio
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Espátula
- Cuchillo
- Piseta
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Cánula
- Jeringuilla de 3 ml (NYPRO)
- Bisturí
- Algodón
- Guantes, mascarilla, gorro y zapatones.
- Cuba
- Jaulas para rata
- Microtainer con anticoagulante
- Placas porta y cubre objetos
- Capilares
- Cámara de Neubauer
- Pipeta Pasteur

- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Micropipeta
- Puntas descartables
- Capilares
- Escala de Hematocrito
- Plastilina

2.2.5. Reactivos

- Agua destilada
- Etanol al 96%
- α Naftol al 5%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Alcohol antiséptico
- Vaselina
- Albendazol de 20mg/ml
- Suero fisiológico
- Lugol
- Ciclofosfamida 50 mg
- Crudo de Polisacaridos
- Glucosa
- Solución de Fenol al 5%
- Solución Isotónica
- Solucion Hipotonica
- Reactivo de Drabkin
- Reactivo de Turk
- Metanol absoluto
- Eosina
- Azul de policromo

2.3. Métodos y Técnicas

2.3.1. Recolección de la materia prima

El hongo necesario para la investigación fue cultivado y recolectado en el laboratorio de biotecnología, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, del Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.3.2. Limpieza de la materia prima

La materia prima (*Pleurotus ostreatus*), posterior a su recolección se sometió a un proceso de limpieza, de la siguiente forma:

- Se seleccionó la materia prima en buen estado, descartando las partes deterioradas del hongo, según su aspecto físico.
- Se sometió el hongo a un recipiente con abundante agua purificada, lavándolo varias veces, para eliminar impurezas.
- Se dejó la planta en reposo por un cierto tiempo con la finalidad de escurrir toda el agua.

2.3.3. Obtención del extracto

En la presente investigación, se realizó una extracción de polisacáridos del *Pleurotus ostreatus*, mediante un proceso de digestión (maceración en calor), dicho proceso fue realizado bajo el siguiente procedimiento:

- Primeramente se cortó las diferentes partes del hongo en fragmentos muy pequeños.
- Se pesó 49,3g de hongo y se procedió a colocar en un frasco de vidrio con etanol al 96%, en volúmenes de proporción 1:2 (biomasa-alcohol).
- Se dejó reposar por dos días, con la finalidad de eliminar los componentes de alto peso molecular.
- Al cabo de este tiempo se realizó una filtración del macerado, se lavó con agua purificada, para eliminar los residuos de etanol.
- Posteriormente al resto de hongo que queda en el papel filtro, se le añadió 5 volúmenes de agua y se sometió a calor por un tiempo de 4 horas, para obtener un extracto crudo de polisacáridos.

- La suspensión fue filtrada y posteriormente el filtrado fue tratado con etanol frío a 8°C, en proporciones de volumen 4:1 (etanol-muestra), y se dejó reposar durante 48 horas bajo refrigeración a 4°C.
- Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 5000 RPM durante 10 minutos
- Finalmente se desechó el sobrenadante y el precipitado que quedó después de la centrifugación corresponde a los polisacáridos.

2.3.4. Prueba de Molish (Identificación de azúcares)

La prueba de Molish es una prueba cualitativa general que permite detectar la presencia de hidratos de carbono en una muestra, mediante la formación de un color rosado. En esta prueba se utiliza el ácido sulfúrico en la deshidratación (del monosacárido) y el alfa naftol en la reacción de condensación del furfural (Quesada, 2007, p.90).

Esta prueba se realizó de la siguiente manera:

- En un tubo de ensayo se colocó 2 ml de la muestra problema.
- Posteriormente se añadió 2 gotas de reactivo de Molish (alfa naftol).
- Por último, se añadió dos gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo, y se observó la reacción.

2.3.5. Método de Fenol Sulfúrico

2.3.5.1. Fundamento

Los carbohidratos son destruidos por acción del ácido y el calor. En estas condiciones diversas reacciones se producen, primero se empieza con una deshidratación y luego una catálisis ácida produciendo de esa manera derivados del furano. Por condensación con el fenol los derivados del furano se obtienen compuestos coloreados los cuales pueden ser medidos por métodos espectrofotométricos. (Nuffield foundation, 1984 p. 159)

2.3.5.2. Método

Preparación de muestra

- Se pesó 0.5 g de muestra y se disolvió en 10mL de agua.
- Mantener en baño maría por 5 minutos.
- Filtrar y extraer 1mL.
- Aforar a 10mL y extraer 25mL
- Aforar a 100mL.

Preparación de Curva Patrón

Tabla 1-2: Preparación de la curva de calibración

Numero de Tubo	Muestra Patrón (mL)	Muestra de Polisacáridos (mL)	Agua destilada (mL)	Solución de Fenol al 5% (mL)	Ácido Sulfúrico (mL)
1	0.1	0	0.9	1	5
2	0.2	0	0.8	1	5
3	0.3	0	0.7	1	5
4	0.4	0	0.6	1	5
5	0.5	0	0.5	1	5
6	0.6	0	0.4	1	5
7	0.7	0	0.3	1	5
8	0.8	0	0.2	1	5
9	0.9	0	0.1	1	5
10	1	0	0	1	5
11	0	0	1	1	5
12	0	0.3	0.7	1	5
13	0	0.4	0.6	1	5
14	0	0.5	0.5	1	5

Realizado por: David Cepeda y Walter León (2016).

El primer tubo presentara una coloración amarillenta mientras que los demás unas tonalidades más anaranjadas. Se lee las absorbancias a 490 nm. Se realiza una curva de calibración con las absorbancias de Glucosa conocida y se determina la concentración de la muestra patrón mediante interpelación.

2.4. Revisión parasitaria del material biológico (*Rattus norvegicus*)

2.4.1. Examen Coproparasitario

El examen coproparasitario es un conjunto de técnicas diagnósticas que constituyen la indicación metodológica para la identificación de la mayoría de las enteroparasitosis motivadas por protozoarios o helmintos. Su eficacia y sensibilidad para establecer un diagnóstico correcto dependen de la adecuada indicación y preparación de la muestra, de los datos clínicos, antecedentes de interés que sean aportados al laboratorio y de su correcta ejecución con examen directo microscópico y examen macroscópico final (Salvatella, 2007, p.215).

Se realizó un examen coproparasitario a las ratas utilizadas en el experimento, con la finalidad de identificar y eliminar cualquier parásito que hubiera podido causar alguna interferencia con la investigación.

Este examen coproparasitario se realizó bajo el siguiente procedimiento:

- En una placa portaobjetos se colocó una gota de suero fisiológico al 0,85% en un extremo y una gota de lugol en el otro extremo de la placa portaobjetos.
- Con la ayuda de un aplicador, se tomó una pequeña cantidad de heces y se diluyó en la gota de suero fisiológico y lugol hasta formar una solución homogénea.
- Se colocó una placa cubreobjetos sobre cada uno de los preparados, evitando que se formen burbujas.
- Se observó la placa preparada al microscopio.

2.4.2. Administración del antiparasitario (Tratamiento)

El albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro para administración oral. Está indicado en el tratamiento de parasitosis intestinales únicas o múltiples, por lo cual es efectivo en el tratamiento de: ascariasis, tricocefalosis, enterobiasis, uncinariasis, teniasis, etc.

El efecto antihelmíntico del albendazol, se produce mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina, lo cual causa una interrupción del metabolismo del helminto, incluyendo la disminución de energía, que inmoviliza y después mata el helminto sensible (Bello, 1991, p.590).

Para el tratamiento de la parasitosis intestinal de las ratas se utilizó Albendazol de 400mg, en dosis única. Este fármaco fue administrado bajo una concentración de 400mg por cada 30kg de peso. El procedimiento fue el siguiente:

- Primeramente se inmovilizó al sujeto de estudio realizando una pinza en la zona del cuello.
- Se tomó 1ml de la suspensión de Albendazol de 400mg con una jeringa y se conectó a la cánula para posterior administración.
- Posteriormente se insertó la cánula en la boca del animal hasta la zona de la faringe.
- Se administró el líquido a velocidad media observando si hay alguna reacción anormal del animal.
- Una vez terminada la administración, se retiró la cánula de la boca del animal.

2.5. Evaluación de la actividad inmunomoduladora del *Pleurotus ostreatus*.

La evaluación de la actividad inmunomoduladora se desarrolló en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y se basó principalmente en: la administración de un extracto de polisacáridos obtenido del *Pleurotus ostreatus* en diferentes concentraciones a varios grupos de ratas (*Rattus norvegicus*), con la finalidad de evaluar el efecto modulador del sistema inmune que presenta dicho extracto.

2.5.1. Administración del Extracto

La administración del extracto se realizó en tres grupos de cinco ratas (*Rattus norvegicus*) cada uno, a los cuales se les administro el extracto de *Pleurutos ostreatus* disuelto en solución salina de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** El grupo uno estaba conformado por cinco ratas (*Rattus norvegicus*), con un peso promedio de 126,9g, a las cuales se les administro 1 ml de extracto, con una concentración de 50mg/Kg durante 7 días; este grupo fue considerado como de baja concentración.
- **Grupo 2:** El grupo uno estaba formado por cinco ratas (*Rattus norvegicus*), con un peso promedio de 133,2g, a las cuales se les administro 1 ml de extracto, con una concentración de 200mg/Kg durante 7 días; este grupo fue considerado como de alta concentración.
- **Grupo 3:** El grupo uno estaba formado por cinco ratas (*Rattus norvegicus*), con un peso promedio de 156,1g, a las cuales se les administro 1 ml solución salina unicamente durante siete días; este grupo fue considerado como blanco.

2.5.2. Administración de la ciclofosfamida

Se utilizó el fármaco ciclofosfamida en tabletas de 50 mg, en una dosis de 5 mg de principio activo por kg de peso. Este proceso se de la siguiente manera:

- **Grupo 1 (Alta concentración):** De acuerdo al peso promedio de 126,9g que presentan las ratas de este grupo, se le administro por vía oral con ayuda de una cánula, 1 ml de solución que contiene 0,63mg de ciclofosfamida.
- **Grupo 2 (Baja concentración):** De acuerdo al peso promedio de 133,2g que presentan las ratas de este grupo, se le administro por vía oral con ayuda de una cánula 1 ml de solución que contiene 0,67mg de ciclofosfamida.
- **Grupo 3 (Blanco):** De acuerdo al peso promedio de 156,1g que presentan las ratas de este grupo, se le administro por vía oral con ayuda de una cánula 1 ml de solución que contiene 0,78mg de ciclofosfamida.

2.6. Biometría Hemática

2.6.1. Conteo de Glóbulos Rojos

2.6.1.1. Fundamento

El Recuento eritrocitario se basa en someter a una solución isotónica una muestra de sangre. Esta solución tendrá la capacidad de destruir muchas células del paquete celular exceptuando las

células eritrocitarias y de esa manera poder diferenciarlas al utilizar la cámara de Neubauer. Las células eritrocitarias al estar intactas y no tener ningún otro factor e interferencia pueden ser observadas a través del microscopio con una lente de 40X y de esa manera obtener el número de eritrocitos por mm³. (Cambero, 2012a, p. 23)

2.6.1.2. Método

- Se obtiene la sangre venosa homogeneizada.
- Se diluye la sangre total en una solución isotónica.
- Con la ayuda de la pipeta Pasteur se aspira la sangre hasta la marca de 0.5 y luego se aspira el diluyente hasta la marca 101.
- Se agita constantemente por 3 minutos y se desecha las primeras 5 o 6 gotas.
- Se coloca el cubreobjetos en la cámara de Neubauer y se proceder a llenar con el líquido de la pipeta, tratando que el líquido fluya uniforme.
- Se deja sedimentar por de 2 a 3 minutos
- Se lo coloca en el microscopio con una lente de 40X.
- Se cuenta cada uno de los eritrocitos que se encuentran en los cuadros más pequeños, localizados en los bordes superiores e inferiores y centro.
- Se realiza los cálculos para determinar el número de los eritrocitos.

$$\text{Numero de eritrocitos/mm}^3 = \text{Eritrocitos contabilizados} * 10000$$

2.6.2. Recuento de Plaquetas

2.6.2.1. Fundamento

El fundamento del recuento de plaquetas consiste en la producción de una lisis controlada, por la aplicación de una solución hipotónica, la cual mantiene a las plaquetas intactas y sin ser agrupadas. De esa manera permite ser diferenciar de mejor manera, cuando estas son observadas al microscopio en una cámara de Neubauer. El valor obtenido es expresado en mm³. (Ángel, 2010, p. 467.)

2.6.2.2. Método

- Se obtiene una muestra de sangre con anticoagulante EDTA.
- Se coloca en un tubo 2 mL de reactivo de Gower.
- Tomar 10 uL de sangre con la ayuda de una micropipeta y colocarla en el tubo con diluyente.
- Lavar la punta de la micropipeta mediante absorción y expulsión del contenido.

- Homogeneizar la solución por 3 minutos.
- Con la ayuda de una micropipeta colocar en la parte superior de la cámara de Neubauer previamente colocada un cubreobjetos.
- Dejar que el líquido recorra por difusión toda la placa, en el caso de que se forme burbujas volver a repetir el procedimiento.
- Dejar reposar la cámara de Neubauer de 10 a 20 minutos, de esa forma las plaquetas pueden depositarse.
- Realizar el conteo de plaquetas con microscopio en una lente de 40X.
- Contar las plaquetas presentes en el área central de la cámara.
- Multiplicar el factor correspondiente para obtener el número real de plaquetas.

$$\text{Numero de plaquetas/mm}^3 = \text{Numero de Plaquetas contadas} * 2000$$

2.6.3. Hematocrito

2.6.3.1. Fundamento

La lectura del hematocrito se basa en determinar el porcentaje de elementos formes presentes en un volumen total de sangre. La sangre presenta cierta cantidad de elementos formes los cuales por centrifugación pueden separarse del plasma. Al desplazamiento producido es conocido como hematocrito y es expresado en porcentaje. (Cambero, 2012b, p.26)

2.6.3.2. Método

- Llenar con sangre venosa $\frac{3}{4}$ partes de un tubo capilar de 7 cm de largo X 1 mm de grosor.
- Sellar la parte inferior del tubo con plastilina
- Proceder a centrifugar por 5 min. a 10000 rpm.
- Leer el resultado obtenido con una escala comercial, de la siguiente manera; a) la parte inferior del capilar (eritrocitos sedimentados), deben estar en contacto con la línea 0, mientras que la línea superior (Plasma) deberá estar con la marca del 100.
- Independientemente de la línea media producida por la separación de los eritrocitos y plasma dará el valor del hematocrito.

2.6.4. Hemoglobina

2.6.4.1. Fundamento

El fundamento de la determinación de la hemoglobina se basa principalmente en la transformación de hemoglobina en cianometahemoglobina, la intensidad de color que presenta la reacción puede ser medida por acción de un espectrofotómetro o un fotocolorímetro. El reactivo de Drabkin posee ferrocianuro potásico y cianuro potásico, el ferrocianuro potásico hace pasar el hierro de la hemoglobina de hierro 2+ a hierro 3+ para formar metahemoglobina, posteriormente esta se combina con el cianuro potásico para generar una coloración estable denominada cianometahemoglobina. La concentración de la hemoglobina se determina mediante la intensidad de coloración que presente cuando se lee la misma a una longitud de onda de 540 nm. (Cambero 2012c, pp. 30-31)

2.6.4.2. Método

- Obtener una muestra de sangre total.
- Encender el espectrofotómetro y esperar su adecuamiento.
- Colocar 5 mL de Reactivo de Drabkin en dos tubos de ensayo. Cada uno rotulado como blanco y problema.
- Tomar 20 µL (0.02 ml) de la sangre con la ayuda de una micropipeta con puntas descartables.
- Llevar la pipeta hasta la parte interior de la solución muestra y proceder a depositarla.
- Realizar lavados de punta con la solución de Drabkin, esto se realiza mediante aspiración y expulsión repetitivas dentro del tubo.
- Dejar reposar por 10 minutos. En este tiempo se produce la reacción.
- Colocar en una cámara espectrofotométrica las soluciones para su lectura. (Longitud de onda 540 nm)
- Leer primero la solución Blanco y encerrar con la misma, en otra cámara colocar a solución muestra y leer la absorbancia.
- Calcular la concentración.

$$\text{Conc. Hb} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Estandar}} * \text{Conc. Estandar}$$

2.6.5. Recuento de Leucocitos

2.6.5.1. Fundamento

El fundamento del recuento leucocitario consiste en la separación de los glóbulos blancos de los rojos por medio de lisis controlada, el reactivo de Turk permite esta reacción y contiene una solución de ácido acético al 2%. Los leucocitos totales no podrán ser diferenciados en Eosinofilos, Basofilos, Neutrofilos, Monocitos y Linfocitos, sino se limitara al conteo de valores totales dados en mm³ o litros. (Cambero 2012e, p. 44)

2.6.5.2. Método

- Pipetear una muestra de sangre con la pipeta Pasteur hasta la marca 0.5, evitando que en esta se forme burbujas.
- Eliminar el exceso de sangre de la pipeta Pasteur.
- Con la pipeta Pasteur absorber el reactivo de Turk hasta el número 11, evitando formar burbujas.
- Llevar al agitador automático por 3 minutos
- Eliminar las primeras gotas de la solución.
- Colocar una gota de solución en la cámara de Neubauer y dejar por 3 minutos para que los leucocitos se asienten.
- Leer con el microscopio con el lente 10X solo en los cuadros grandes y contar el número de leucocitos.
- Calcular el número de leucocitos.

$$\text{Leucocitos totales} = \text{Numero de leucocitos en los cuatro cuadrantes} * 50$$

2.6.6. Recuento diferencial de Leucocitos

2.6.6.1. Fundamento

La mayor parte del tejido hemático está compuesto por leucocitos los cuales presentan las siguientes características: presentan un mayor tamaño en comparación de los eritrocitos, poseen cromatina de diferentes densidades y un núcleo de forma irregular, el citoplasma contiene granulaciones que pueden tomar diferentes tonalidades dependiendo del tipo de colorante a fin que tengan. A diferencia de conteo general de leucocitos este método diferencia en 5 grupos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos. (Cambero 2012f, p. 49)

2.6.6.2. Metodología

- Obtener una muestra de sangre homogeneizada.
- Colocar una gota de sangre en el extremo superior del portaobjetos y mediante la ayuda de otro tocar la gota, y esperar que la gota se distribuya por capilaridad en el portaobjetos.
- Deslizar suavemente el portaobjeto en un ángulo de 20 o 30 grados en sentido longitudinal.
- Dejar que el frotis se seque y teñir de la siguiente manera con los siguientes reactivos y tiempos:
 - Metanol absoluto por 30 segundos y enjuagar con agua de la llave.
 - Eosina por 20 segundos y enjuagar;
 - Azul de policromo durante 30 segundos, enjuagar y dejar secar al aire libre.
- Colocar en la placa una gota de aceite de inmersión y observar en el microscopio con la lente de 100X.
- Contar 100 células blancas tomando en cuenta cada tipo: Linfocitos, Monocitos, Eosinofilos, Basofilos y Neutrofilos.

2.7. Análisis estadístico.

El respectivo análisis estadístico se lo realizo en EXCEL 2013 conjuntamente con el programa estadístico IBM SPSS Statistic Version 19 de Windows y se realizó una interpretación de tipo inferencia y estadística descriptiva.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Identificación de azúcares en el extracto

En el presente estudio se realizó la obtención de un extracto acuoso mediante un proceso de digestión, por medio de la cual se obtuvo un extracto de polisacáridos, los cuales fueron identificados y cuantificados mediante la prueba de molish y el método de fenol sulfúrico respectivamente.

3.1.1. *Prueba de Molish*

Al realizar la prueba de Molish al extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus*, se observó la formación de una coloración rosado púrpura en el extracto, lo cual indica un resultado positivo, es decir la presencia de polisacáridos en el extracto obtenido.

3.1.2. *Método de fenol Sulfúrico*

3.1.2.1. *Calculo del porcentaje de polisacáridos en el extracto de Pleurotus ostreatus*

Datos:

A: - 0,0055

B: 0,0103

R²: 0.9832

Absorbancia de la muestra del tubo 1 = 0,550

Y= A+BX

X= (Y-A)/X

$$X = \frac{0.550 - (-0.0055)}{0.0103} = 53.93 \text{ ug/mL}$$

Para determinar

$$X = \frac{53.93 \text{ ug} * 0.3 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$X = 16.179 \text{ ug}$$

$$X = \frac{16.179 \text{ ug} * 100}{0.3}$$

$$X = 5393.20 \text{ ug} = 5.3920 \text{ mg}$$

$$X = \frac{5.3920 \text{ mg} * 100}{25}$$

$$X = 21.5728 \text{ mg}$$

$$X = \frac{21.5728 \text{ mg} * 100}{1}$$

$$X = 2157.28 \text{ mg} = 2.157 \text{ g}$$

$$X = \frac{2.157 \text{ g} * 100}{5}$$

$$X = 43.145 \%$$

Absorbancia de la muestra del tubo 2 = 0,585

$$Y = A + BX$$

$$X = (Y - A) / X$$

$$X = \frac{0.585 - (-0.0055)}{0.0103} = 57.33 \text{ ug/mL}$$

Para determinar

$$X = \frac{57.33 \text{ ug} * 0.4 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$X = 22.93 \text{ ug}$$

$$X = \frac{22.93 \text{ ug} * 100}{0.4}$$

$$X = 5733.00 \text{ ug} = 5.733 \text{ mg}$$

$$X = \frac{5.733 \text{ mg} * 100}{25}$$

$$X = 21.5728 \text{ mg}$$

$$X = \frac{22.932 \text{ mg} * 100}{1}$$

$$X = 2293.203 \text{ mg} = 2.293 \text{ g}$$

$$X = \frac{2.293 \text{ g} * 100}{5}$$

$$X = 45.865 \%$$

Absorbancia de la muestra del tubo 3 = 0,615

$$Y = A + BX$$

$$X = (Y - A) / B$$

$$X = \frac{0.615 - (-0.0055)}{0.0103} = 60.024 \text{ ug/mL}$$

Para determinar

$$X = \frac{60.024 \text{ ug} * 0.5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}}$$

$$X = 30.121 \text{ ug}$$

$$X = \frac{30.121 \text{ ug} * 100}{0.5}$$

$$X = 6024.271 \text{ ug} = 6.024 \text{ mg}$$

$$X = \frac{6.024 \text{ mg} * 100}{25}$$

$$X = 24.097 \text{ mg}$$

$$X = \frac{24.097 \text{ mg} * 100}{1}$$

$$X = 2409.708 \text{ mg} = 2.409 \text{ g}$$

$$X = \frac{2.409 \text{ g} * 100}{5}$$

$$X = 48.194\%$$

Tabla 1-3: Absorbancia obtenidas por método espectrofotométrico de glucosa y muestra de extracto de *Pleurotus ostreatus*.

Numero de Tubo	Muestra Patrón (mL)	Muestra de Polisacáridos (mL)	Agua destilada (mL)	Solución de Fenol al 5% (mL)	Ácido Sulfúrico (mL)	Concentración ug/ mL	Absorbancia
1	0.1	0	0.9	1	5	10	0,152
2	0.2	0	0.8	1	5	20	0,173
3	0.3	0	0.7	1	5	30	0,293
4	0.4	0	0.6	1	5	40	0,362
5	0.5	0	0.5	1	5	50	0,531
6	0.6	0	0.4	1	5	60	0,565
7	0.7	0	0.3	1	5	70	0,741
8	0.8	0	0.2	1	5	80	0,857
9	0.9	0	0.1	1	5	90	0,908
Muestra 1	0	0.3	0.7	1	5	53,93	0,550
Muestra 2	0	0.4	0.6	1	5	57,33	0,585
Muestra 3	0	0.5	0.5	1	5	60,24	0,615

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

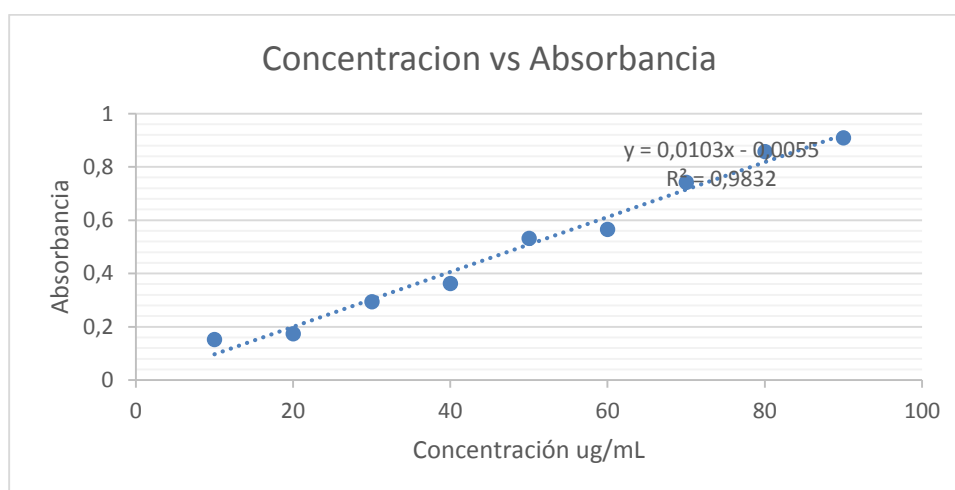


Figura 1-3: Concentración vs absorbancia obtenido por análisis espectrofotométrico.

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017).

Para la cuantificación de los polisacáridos presentes en el extracto acuoso obtenido del *Pleurotus ostreatus*, se realizó el método de fenol sulfúrico, en el cual se utilizó nueve soluciones estándares para el desarrollo de la curva de calibración, y tres muestras para determinar la concentración y posteriormente el porcentaje de polisacáridos presentes en el extracto.

Para la realización de la curva de calibración se midió las absorbancias de nueve soluciones estándares de concentración 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 ug/ml; las cuales dieron como absorbancia los siguientes valores: 0,152, 0,173, 0,293, 0,362, 0,531, 0,565, 0,741, 0,857, y 0,908 respectivamente; como se observa en la **Tabla 1-3**; a partir de estas absorbancias se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0,0103x - 0,0055$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9832$, como se observa en la **Figura 1-3**.

Las muestras de extracto que contienen polisacáridos, se preparó con una alícuota de 3,4 y 5ml de extracto y 7,8,y 9 ml de agua destilada respectivamente, las cuales al ser analizadas por espectrofotometría dieron como resultado absorbancias de: 0,550, 0,585, y 0,615 respectivamente. A partir de estas absorbancias y por medio de la ecuación de la curva de calibración patrón obtenido mediante las soluciones estándares, se obtuvo la concentración de las diferentes muestras de extracto, que dieron valores de 53.93, 57.33, 60.24 ug/ml; los cuales corresponden al 43.145, 45.865, y 48.194 % respectivamente de polisacáridos en relación a la totalidad del extracto, es decir a la cantidad de polisacáridos presentes en el extracto. Según Hernández en un estudio sobre el valor nutricional de setas, realizado en la Universidad de Guanajuato – México, muestra que existe un 60 % de carbohidratos totales en la muestra, existiendo una diferencia con nuestro estudio en donde el valor obtenido es menor.

3.2. Actividad Inmunomoduladora del extracto de *Pleurotus ostreatus*

En la presente investigación se utilizó para la evaluación de la actividad inmunomoduladora tres grupos de estudio, en los cuales se fue evaluando los diferentes efectos que produce el extracto al ser administrado en el material biológico de elección a diferentes dosis.

Tabla 2-3: Datos biométricos obtenidos por tratamiento con extracto de acuoso de *Pleurotus ostretus* a baja concentración en *Rattus norvegicus*.

Primer Grupo T1							
N° rata	Unid.	1	2	3	4	5	Promedio
<i>Peso</i>	g	120,1	120,5	122,3	136,7	134,7	126,9
<i>GB</i>	GB/L	9.070	6.440	6.110	6.850	8.500	7.394
<i>GB*</i>	GB/L	6.840	7.170	7.480	1.080	9.020	8.262
<i>Linfocitos</i>	%	79,2	72,8	67,3	72,1	81,0	74,5
<i>Linfocitos*</i>	%	60,1	75,4	67,2	71,8	73,4	69,6
<i>Monocitos</i>	%	13,4	16,9	19,5	15,9	11,5	15,4
<i>Monocitos*</i>	%	21,1	15,9	19,1	14,6	13,4	16,8
<i>Granulocitos</i>	%	7,4	10,3	13,3	12,1	7,5	10,1
<i>Granulocitos*</i>	%	18,9	8,7	13,8	13,6	13,2	13,6
<i>GR</i>	GR/L	6'970.000	7'910.000	7'560.000	7'030.000	6'920.000	5'873.400
<i>GR*</i>	GR/L	8'180.000	7'890.000	7'700.000	7'540.000	7'560.000	7'774.000
<i>Hemoglobina</i>	g/dL	14,3	15,9	15,7	14,1	14	14,8
<i>Hemoglobina*</i>	g/dL	16,4	16,2	15,2	15,5	16,1	15,9
<i>Hematocrito</i>	%	46,0	52,0	50,3	45,9	46,5	48,1
<i>Hematocrito*</i>	%	53,5	50,9	49,2	50,2	50,2	50,8
<i>Plaquetas</i>	Plaq./L	493.000	493.000	917.000	529.000	618.000	610.000
<i>Plaquetas*</i>	Plaq./L	870.000	868.000	893.000	101.000	775.000	883.200

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

GB= Glóbulos Blancos; GR = Glóbulos Rojos; * = post tratamiento; T1 = Tratamiento a Baja concentración.

El primer grupo conformado por cinco ratas con un rango de peso de 120,1 a 134,7 g, fue tratado con un extracto de *Pleurotus ostretus* que contiene polisacáridos en una dosis de 50mg de extracto por cada kg de peso, en un volumen de 1 ml. El tratamiento tuvo una duración de siete días administrándose una dosis al día, evaluando su actividad inmunomoduladora en base a un análisis biométrico de sangre. Se realizó una biometría hemática a cada rata del grupo antes del tratamiento y después del tratamiento para poder evaluar los cambios en los diferentes parámetros de la biometría hemática por efecto de la administración del extracto.

La biometría realizada al grupo uno presento los siguientes resultados: **antes del tratamiento:** Glóbulos Blancos: 7.394 GB/L; Linfocitos: 74,5%; Monocitos: 15,4%; Granulocitos%: 10,1; Glóbulos rojos: 5'873.400 GR/L; Hemoglobina: 14,8 g/dl; Hematocrito: 48,1%; Plaquetas: 610.000 Plaq/L; y **después del tratamiento:** Glóbulos Blancos: 8.262 GB/L; Linfocitos: 69,6%; Monocitos: 16,8%; Granulocitos: 13,6%; Glóbulos rojos: 7'774.000 GR/L; Hemoglobina: 15,9 g/dl; Hematocrito: 50,8%; Plaquetas: 883.200 Plaq/L; como lo indica la **Tabla 2.3.**

Al analizar estos resultados se puede indicar que todos los parámetros de la biometría presentan un aumento en su valor después del tratamiento, con excepción de los linfocitos, los cuales

presentan una disminución en su valor de 74,5 a 69,6%; el parámetro que presentó un aumento representativo en su valor en relación a los demás parámetros fue los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), que presentaron un aumento en su valor de 10,1 a 13,6%; aspecto que está relacionado de forma directa con la administración del extracto, debido a que según (Welsh, 2009), los granulocitos son células del sistema inmune de gran importancia en procesos infecciosos. Este ensayo evidencia que la administración del extracto a dosis baja produce un aumento de los granulocitos en el sujeto de estudio. Según (Morris et al. 2003) en el estudio “Immunomodulating Effects of Hot-Water Extract From *Pleurotus Ostreatus* Mycelium on Cyclophosphamide Treated Mice”, realizado en la University of Oriente, Santiago de Cuba, muestra que existe un incremento en los valores hematológicos en los animales de experimentación, existiendo una semejanza con nuestro estudio en donde los valores obtenidos incrementan a excepción de los linfocitos.

Tabla 3-3: Datos biométricos obtenidos por tratamiento con extracto de acuoso de *Pleurotus ostreatus* a alta concentración en *Rattus norvegicus*.

Segundo Grupo T2							
N° rata	Unid.	1	2	3	4	5	Promedio
<i>Peso</i>	g	124,7	125	126,4	142,8	147	133,2
<i>GB</i>	GB/L	6.590	6.820	6.000	6.520	6.580	6.502
<i>GB*</i>	GB/L	8.250	6.590	8.360	7.020	7.555	7.555
<i>Linfocitos</i>	%	82,1	83,9	81,0	87,9	82,0	83,4
<i>Linfocitos*</i>	%	56,6	52,5	76,4	60,9	61,6	61,6
<i>Monocitos</i>	%	11,8	11,6	12,5	8,8	12,1	11,3
<i>Monocitos*</i>	%	22,7	24,3	14,3	19,1	20,1	20,1
<i>Granulocitos</i>	%	6,2	4,5	6,5	3,3	5,9	5,3
<i>Granulocitos*</i>	%	20,6	23,2	9,4	20,0	18,3	18,3
<i>GR</i>	GR/L	7'500.000	7'930.000	7'750.000	8'540.000	7'920.000	7'928.000
<i>GR*</i>	GR/L	7'460.000	6'750.000	7'050.000	7'830.000	7'270.000	7'272.500
<i>Hemoglobina</i>	g/dL	14,7	15,3	15	16,7	16,1	15,6
<i>Hemoglobina*</i>	g/dL	15	13,4	14,8	16	14,8	14,8
<i>Hematocrito</i>	%	49,5	51,1	50,7	57,3	53,3	52,4
<i>Hematocrito*</i>	%	47,2	43,2	45,9	50,7	46,7	46,7
<i>Plaquetas</i>	Plaq./L	603.000	643.000	636.000	197.000	665.000	548.800
<i>Plaquetas*</i>	Plaq./L	754.000	107.000	899.000	102.000	934.000	934.250

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

GB= Glóbulos Blancos; GR = Glóbulos Rojos; *= post tratamiento; T2= Tratamiento a Alta concentración.

El segundo grupo conformado por cinco ratas con un rango de peso de 124,7 a 133,2g, fue tratado con un extracto de *Pleurotus ostreatus* que contiene polisacáridos en una dosis de 200mg de extracto por cada kg de peso, en un volumen de 1 ml. El tratamiento tuvo una

duración de siete días administrándose una dosis al día, evaluando su actividad inmunomoduladora en base a un análisis biométrico de sangre. Se realizó una biometría hemática a cada rata del grupo antes del tratamiento y después del tratamiento para poder evaluar los cambios en los diferentes parámetros de la biometría hemática por efecto de la administración del extracto.

La biometría realizada al grupo dos presento los siguientes resultados: **antes del tratamiento:** Glóbulos Blancos: 6.502 GB/L; Linfocitos: 83,4%; Monocitos: 11,3%; Granulocitos: 5,3%; Glóbulos rojos: 7'928.000 GR/L; Hemoglobina: 15,6g/dl; Hematocrito: 52,4%; Plaquetas: 548.800 Pla/L; y **después del tratamiento:** Glóbulos Blancos: 7.555 GB/L; Linfocitos: 61,6%; Monocitos: 20,1%; Granulocitos: 18,3%; Glóbulos rojos: 7'272.500 GR/L; Hemoglobina: 14,8 g/dl; Hematocrito: 46,7%, Plaquetas: 934.250 Pla/L; como lo indica la **Tabla 3.3**.

Al analizar estos resultados se puede indicar que todos los parámetros de la biometría presentan un aumento en su valor después del tratamiento, con excepción de los linfocitos los cuales presentan una disminución en su valor de 83,4 a 61,6%; Glóbulos Rojos de 7'928.000 a 7'272.500 GR/L; Hemoglobina de 15,6 a 14,8 g/dl y Hematocrito 52,4 a 46,7%, los parámetro que presentaron un aumento representativo en su valor en relación a los demás parámetros fue los granulocitos (neutrófilos ,basófilos y eosinofilos), que presentaron un aumento en su valor de 5,3 a 18,3%; y los monocitos que su valor aumento de 11,3 a 20,1%; aspecto que está relacionado de forma directa con la administración del extracto, debido a que según (Welsh, 2009), los granulocitos y monocitos son células del sistema inmune que actúan en procesos infecciosos y como precursores de células macrófagas respectivamente. Además existe un incremento de Plaquetas de 548.800 a 934.250 Pla/L. Este ensayo evidencia que la administración del extracto a dosis alta produce un aumento de los granulocitos y monocitos en el sujeto de estudio. Según (Cox et al. 1988) demuestra en el estudio “Extrinsic allergic alveolitis caused by spores of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*” que los valores del sistema inmune puede ser modificado al utilizar el extracto de *P. ostreatus* independiente de la concentración, lo cual coincide con nuestra investigación ya que muchos de los valores hematológicos fueron modificados en especial las células del sistema inmune.

Tabla 4-3: Datos biométricos obtenidos mediante análisis de sangre *Rattus norvegicus*.

Tercer Grupo T0							
N° rata	Unid.	1	2	3	4	5	Promedio
<i>Peso</i>	g	128,2	129,5	130,3	196,2	196,5	156,1
<i>GB</i>	GB/L	9.130	5.270	6.990	6.130	8.060	7.116
<i>GB*</i>	GB/L	7.190	7.940	11.630	10.170	9.232	9.233
<i>Linfocitos</i>	%	84,7	83,5	81,9	82,7	83,3	83,2
<i>Linfocitos*</i>	%	70,3	81,8	82,4	78,5	78,3	78,3
<i>Monocitos</i>	%	10,3	12,0	11,9	12,0	11,1	11,5
<i>Monocitos*</i>	%	12,1	11,0	11,7	13,4	12,1	12,1
<i>Granulocitos</i>	%	5,0	4,5	6,2	5,3	5,6	5,3
<i>Granulocitos*</i>	%	17,6	7,2	5,9	8,1	9,7	9,7
<i>GR</i>	GR/L	2'330.000	7'260.000	7'820.000	7'540.000	5'080.000	6'005.000
<i>GR*</i>	GR/L	8'420.000	8'210.000	8'100.000	8'430.000	8'290.000	8'290.000
<i>Hemoglobina</i>	g/dL	16,5	14,3	15,4	14,9	16,0	15,4
<i>Hemoglobina*</i>	g/dL	14,6	16,6	17,1	16,0	16,0	16,1
<i>Hematocrito</i>	%	21,7	47,8	50,6	49,2	36,1	41,1
<i>Hematocrito*</i>	%	55,9	53,0	54,5	53,7	54,3	54,3
<i>Plaquetas</i>	Plaq./L	450.000	570.000	633.000	602.000	542.000	559.200
<i>Plaquetas*</i>	Plaq./L	688.000	633.000	640.000	812.000	693.000	693.250

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

GB= Glóbulos Blancos; GR = Glóbulos Rojos; *= post tratamiento; T0= Tratamiento Blanco

El tercer grupo denominado blanco conformado por cinco ratas con un rango de peso de 128,2 a 196,5g, fue tratado con una solución salina al 0,9%, en un volumen de 1 ml, con una duración de siete días administrándose una dosis al día. Se realizó una biometría hemática a cada rata del grupo antes del tratamiento y después del tratamiento.

La biometría realizada al grupo tres presento los siguientes resultados: *antes del tratamiento*: Glóbulos Blancos: 7.116 GB/L; Linfocitos: 83,2%; Monocitos: 11,5%; Granulocitos: 5,31%; Glóbulos rojos: 6'005.000 GR/L; Hemoglobina: 15,4 g/dl; Hematocrito: 41,1%; Plaquetas: 559.200 Plaq/L; y *después del tratamiento*: Glóbulos Blancos: 9233 GB/L; Linfocitos: 78,3%; Monocitos: 12,1%; Granulocitos: 9,1%; Glóbulos rojos: 8'290.000 GR/L; Hemoglobina: 16,1 g/dl; Hematocrito: 54,3%; Plaquetas: 693.250 Plaq/L; como lo indica la **Tabla 4.3**.

Al analizar estos resultados se puede indicar que todos los parámetros de la biometría no presentan una variación representativa en sus valores debido a que a este grupo no se le administro extracto a ninguna concentración, razón por la cual no se observa efectos notables en el valor de cada uno de los parámetros de la biometría hemática. Según (Pernambuco et al. 2009) en su estudio "Parámetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtenidos a través de método

automatizado” en el Instituto de Ciencias Biológicas – Brasil, demuestra que los valores se mantiene en un rango cercano a los valores obtenidos durante el estudio realizado.

Tabla 5-3: Promedio de datos biométricos obtenidos mediante análisis de sangre en *Rattus norvegicus*.

		<i>Primer Grupo T1</i>	<i>Segundo Grupo T2</i>	<i>Tercer Grupo T0</i>
	Unid.	Promedio		
<i>Peso</i>	g	126,9	133,2	156,1
<i>GB</i>	GB/L	7394	6502	7116
<i>GB*</i>	GB/L	8262	7555	9233
<i>Linfocitos</i>	%	74,5	83,4	83,2
<i>Linfocitos*</i>	%	69,6	61,6	78,3
<i>Monocitos</i>	%	15,4	11,3	11,5
<i>Monocitos*</i>	%	16,8	20,1	12,1
<i>Granulocitos</i>	%	10,1	5,5	5,3
<i>Granulocitos*</i>	%	13,6	18,3	9,7
<i>GR</i>	GR/L	5'873.410	7'928.000	6'005.000
<i>GR*</i>	GR/L	7'774.000	7'272.500	8'290.000
<i>Hemoglobina</i>	g/dL	14,8	15,6	15,4
<i>Hemoglobina*</i>	g/dL	15,9	14,8	16,1
<i>Hematocrito</i>	%	48,1	52,4	41,1
<i>Hematocrito*</i>	%	50,8	46,7	54,3
<i>Plaquetas</i>	Pla./L	610.000	548.800	559.200
<i>Plaquetas*</i>	Pla./L	883.200	934.250	693.250

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

GB= Glóbulos Blancos; **GR** = Glóbulos Rojos; *= post tratamiento; **T1** = Tratamiento a Baja concentración; **T2** = Tratamiento a Alta concentración; **T0** = Tratamiento Blanco

La tabla 5-3 muestra los valores de cada uno de los parámetros de la biometría hemática para cada grupo de estudio, en donde al realizar las respectivas comparaciones entre estos tres grupos se observa que el parámetro que presenta una diferencia más significativa entre sus valores posterior al tratamiento, corresponde a los granulocitos, que presenta un valor de 9,7% en el caso del grupo al que se le administro únicamente solución salina (blanco); 13,6% en el caso del grupo al que se le administro extracto en baja concentración; y 20,1% en el caso del grupo al que se le administro extracto de alta concentración. Estos datos obtenidos pueden evidenciar que el extracto provoca un aumento en el porcentaje de los granulocitos presentes en la sangre; esto dependiendo de la cantidad o concentración de extracto administrado, ya que el porcentaje de granulocitos presentes en sangre es directamente proporcional a la concentración de extracto administrado; es decir que mientras mayor sea la concentración del extracto administrado mayor es el porcentaje de granulocitos después del tratamiento. Según (Morris et al. 2011) en su artículo “Immunomodulating properties of pleurotus sp. Fruiting bodies powder on

cyclophosphamide treated mice” explica que al utilizar el extracto de *P. ostreatus*, ciertos valores del sistema inmunitario pueden ser afectados incrementando o disminuyendo, existiendo una similitud con nuestro estudio ya que muchos valores también fueron modificados.

Tabla 6-3: Método de extracción por análisis de componentes principales en las variables obtenidas por tratamiento con extracto de acuoso de *Pleurotus ostreatus* en *Rattus norvegicus*.

Comunalidades		
	<i>Inicial</i>	<i>Extracción</i>
Tratamiento	1,000	,932
<i>Peso</i>	1,000	,656
<i>GB</i>	1,000	,795
<i>GB*</i>	1,000	,824
<i>Linfocitos</i>	1,000	,996
<i>Linfocitos*</i>	1,000	,916
<i>Monocitos</i>	1,000	,979
<i>Monocitos*</i>	1,000	,861
<i>Granulocitos</i>	1,000	,988
<i>Granulocitos*</i>	1,000	,936
<i>GR</i>	1,000	,905
<i>GR*</i>	1,000	,896
<i>Hemoglobina</i>	1,000	,878
<i>Hemoglobina*</i>	1,000	,967
<i>Hematocrito</i>	1,000	,984
<i>Hematocrito*</i>	1,000	,963
<i>Plaquetas</i>	1,000	,868
<i>Plaquetas*</i>	1,000	,934

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

GB= Glóbulos Blancos; GR = Glóbulos Rojos; *= post tratamiento.

La tabla 6-3 muestra las comunalidades asignadas en un inicio a las variables (inicial) y las de extracción, las cuales fueron reproducidas por el análisis factorial e indica la cantidad de varianza que puede ser explicada. Al analizar estos datos se puede observar que la variable que puede ser explicada de peor forma es el peso, en donde el modelo factorial únicamente es capaz de reproducir un 65,6% de su variabilidad original; este aspecto no afecta a la investigación, ya que el peso no es una variable determinante del estudio.

El resto de variables presentan valores de extracción alrededor del 90%, lo cual es muy positivo en el estudio, ya que indica que el modelo es capaz de reproducir alrededor del 90% de la variabilidad original de dichas variables.

Tabla 7-3: Varianza total explicada de los componentes principales en las variables obtenidas por tratamiento con extracto de acuoso de *Pleurotus ostretus* en *Rattus norvegicus*.

Varianza total explicada									
C*	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado			Sumas de rotación de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	6,096	33,867	33,867	6,096	33,867	33,867	5,018	27,878	27,878
2	4,130	22,945	56,812	4,130	22,945	56,812	3,896	21,642	49,521
3	2,430	13,503	70,315	2,430	13,503	70,315	2,585	14,360	63,880
4	1,398	7,768	78,083	1,398	7,768	78,083	1,943	10,795	74,675
5	1,185	6,581	84,664	1,185	6,581	84,664	1,423	7,906	82,581
6	1,038	5,767	90,431	1,038	5,767	90,431	1,413	7,850	90,431
7	,733	4,074	94,505						
8	,417	2,314	96,819						
9	,361	2,005	98,824						
10	,111	,617	99,441						
11	,060	,331	99,772						
12	,037	,205	99,977						
13	,003	,018	99,995						
14	,001	,005	100,000						
15	2,271E-16	1,262E-15	100,000						
16	-4,462E-17	-2,479E-16	100,000						
17	-3,611E-16	-2,006E-15	100,000						
18	-7,957E-16	-4,421E-15	100,000						

Realizado por: Walter Leon y David Cepeda (2017).

C*= Componente

En la tabla 7-3 se indica el porcentaje de varianza total explicada, en donde se observa que existe un total de seis auto valores mayores que 1, razón por la cual en este análisis se extrae un total de seis factores, los cuales en conjunto consiguen explicar un 90,431% del total de la varianza de los datos originales.

Tabla 8-3: Análisis de los componentes por Método de rotación Varimax con normalización Kaiser. 6 Componentes extraídos.

Matriz de componente rotado						
	Componente					
	1	2	3	4	5	6
Tratamiento	-,366	,720	,052	-,345	-,265	,297
Peso	,205	-,289	-,023	,691	,206	,103
GB	,073	-,121	-,788	-,295	-,073	,249
GB*	,384	,051	-,011	,677	-,460	-,061
Linfocitos	-,017	-,986	-,019	,017	,051	,141
Linfocitos*	,803	,073	,049	,466	-,107	-,183
Monocitos	,033	,958	,116	-,058	,018	-,207
Monocitos*	-,760	,063	,206	-,466	,074	,119
Granulocitos	,001	,981	-,073	,023	-,115	-,074
Granulocitos*	-,774	-,173	-,245	-,429	,125	,219
GR	,018	-,248	,810	-,403	,122	-,098
GR*	,834	-,083	-,294	,047	,226	,232
Hemoglobina	-,055	-,146	-,001	,006	,920	,083
Hemoglobina*	,847	,068	,212	,019	-,233	,382
Hematocrito	-,254	,144	,908	-,032	-,186	,198
Hematocrito*	,850	-,074	-,400	,081	,116	,234
Plaquetas	-,066	,420	,143	-,011	-,147	-,804
Plaquetas*	-,812	,297	,211	,077	,089	,358

Realizado por: Walter León y David Cepeda (2017)

GB= Glóbulos Blancos; GR = Glóbulos Rojos; *= post tratamiento.

La tabla 8-3 indica el análisis de los componentes por el método de rotación Varimax con normalización Kaiser, en donde se observa que las variables se agrupan en los siguientes grupos: *Primer grupo* formado por linfocitos, glóbulos rojos, hemoglobina, y hematocrito; el *Segundo grupo* formado por tratamiento, monocitos, granulocitos y plaquetas; el *Tercer grupo* formado por monocitos, glóbulos rojos, y hematocrito; el *Cuarto grupo* formado por el peso y glóbulos blancos; el *Quinto grupo* formado por hemoglobina; y el *Sexto grupo* formado por glóbulos blancos, linfocitos, granulocitos y plaquetas. De todos estos grupos el grupo de mayor importancia es el grupo dos, en el cual se relaciona el tratamiento con las células del sistema inmune; lo cual indica que la administración del extracto provoca efectos en los niveles de los monocitos y granulocitos que son células del sistema inmune de gran importancia en la inflamación y formación de células macrófagas respectivamente.

CONCLUSIONES

- Mediante un proceso de digestión se obtuvo un extracto acuoso, debido a que los polisacárido se solubilizan fácilmente en agua caliente, y es por ello que pueden ser separados del resto del material orgánico innecesario del *Pleurotus. ostreatus*, pero debido a la necesidad de obtener un compuesto con mayor pureza se optó por realizar un post tratamiento de precipitación con etanol y de esa forma separarlos completamente.
- El extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* posee una gran cantidad de polisacáridos derivados de los B-Glucanos, los cuales fueron identificados mediante una prueba rápida con reactivo de Mollish y posteriormente cuantificados mediante el método espectrofotométrico con Fenol Sulfúrico dando un porcentaje de promedio del 45%.
- Se utilizó la ciclofosfamida como base control del estudio ya que esta al disminuir el número de células del sistema inmune permitirá observar de manera clara la disminución o aumento de dichas células por acción del extracto de *Pleurotus. ostreatus*.
- Durante el tratamiento con extracto de P. ostreatus no se observó cambio alguno en la conducta de los sujetos prueba, los *Rattus norvegicus* se alimentaron durante el tiempo tratamiento con la misma cantidad de alimento y agua que normalmente estos consumen.
- Para poder verificar el efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus* se recurrió, a la realización de biometrías hemática las cuales permitieron realizar un perfil completo de los principales componentes del sistema inmune, siendo los más afectados por la acción del extracto los monocitos, granulocitos y plaquetas. Estos fueron afectados principalmente con el tratamiento en alta concentración

RECOMENDACIONES

- Para mejorar la capacidad de extracción en medio acuoso se recomienda mantener una temperatura constante y evitar la evaporación innecesaria de líquido.
- En la administración del extracto por vía intraperitoneal, se recomienda hacerlo como explica la técnica de administración ya que al administrar de manera incorrecta se puede causar laceraciones en el tejido u órganos internos del espécimen.
- Se recomienda obtener la sangre un corte transversal de la cola del espécimen, ya que de esta forma se facilita la extracción de cantidad suficiente para los análisis.
- Para la extracción de sangre, se recomienda utilizar tubos pediátricos con anticoagulante y agitarlos una vez extraída la sangre para evitar la coagulación de la sangre.
- Se recomienda codificar de manera correcta cada una de las muestras, con la finalidad de evitar confusiones.
- Evitar prolongar las acciones que causen un estrés innecesario al espécimen, facilitando de esta manera el trabajo realizado.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE ACOSTA, Elvira; et al. “Biodiversidad de hongos en México”. *Revista Mexicana de Biodiversidad* [en línea], 2014, (Mexico) 85(1), pp. 76-77 [Consulta: 2017-01-04]. ISSN 1870-3453. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v85sene/v85senea9.pdf>

MEJIA M., Angel Mauricio R. et.al, *Interpretacion Clinica del Laboratorio* [En línea] 7^{ma} ed. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, Editorial Medica Internacional, 2010 [Citado: 12 de enero 2017] p. 467. Disponible en: <https://libromedicogratis.blogspot.com/2015/09/interpretacion-clinica-del-laboratorio.html>

ANIMAL RESEARCHED. *Rat Genome Sequencing Project Consortium.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* [En línea] 2004, [Consulta: 10 de enero 2017], pp. 428, 493 Disponible en: <http://www.animalresearch.info/es/el-diseno-de-la-investigacion/animales-de-investigacion/la-rata/>

ARIAS, Jaime; et al. *Enfermería Médico-Quirúrgica I.* Madrid-España: Tebar, 2000, p.328.

AULAGNIER, Sthepane; Haffner, Patrick., et al. *Guía de los Mamíferos de Europa, del norte de África y de Oriente Medio.* Barcelona, España: Lynx Edicions, 2009. p. 274. [Consulta: Fecha de consulta]. ISBN 978-84-96553-52-1.

BADÍA VILA, María Amparo, & GARCIA MIRANDA, Enriqueta. *Imagen corporal y hábitos saludables* [en línea]. Madrid-España: Parainfo, 2013, p. 139. [Consulta: 2017-01-05]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=cYlr_6Abq9YC&pg=PA139&dq=monocitos+imagen&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=monocitos%20imagen&f=false

BALTAR J.M., Marín R., & Ortega F. “Ciclofosfamida en glomerulonefritis primarias y secundarias” *Nefroplus* [En línea], 2010, (Oviedo Asturias) 3(10), p, 9 [Consulta: 05 Enero de 2017]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-nefroplus-485-pdf-X1888970010000603-S300>

BARBADO, José Luis. *Hongos comestibles* [en línea]. Buenos Aires-Argentina: Albatros, 2003, pp.75-76. [Consulta: 2017-01-04]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=qPykPteTTkC&pg=PA75&dq=genero+pleurotus&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=genero%20pleurotus&f=false

BASTARRACHEA, Raul; et al. “Macrofagos, inflamacion, tejido adiposo, obesidad y resistencia insulina”. *Medigraphic Literatura Biomedica* [en línea], 2007, (Mexico) 143(6), pp. 506-507 [Consulta: 2017-01-04]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2007/gm076h.pdf>

BELLO, Andrés. *Vademécum: Farmacológico terapéutico*. Santiago-Chile: Editorial Andrés Bello, 1991, p.590

BERNARD NF, Ertug F, Margolies H. *High incidence of thyroiditis and antibodies in NOD mice*. *Diabetes* [En línea] 1992, [Consulta: 10 de enero 2017], pp. 41:40-4 Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol13_3_02/end09302.htm

BERNIS Francisco, et al. *Rutas de la Zooarqueología*. [En línea]. 1ra ed. Madrid-España, Editorial Graficas Marte, 2001 [Consulta: 2017-01-05]. p. 248 Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Pb0DO42Bce8C&pg=PA248&dq=rata+de+laboratorio+rattus+norvegicus&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwis7seJIKvRAhXENSYKHdw3AG0Q6AEIzAC#v=onepage&q=rata%20de%20laboratorio%20rattus%20norvegicus&f=false>

CAMBERO Martínez Sara E. et al; *Manual de Practicas de Laboratorio “Biometría Hemática”* [En línea]. 1^{era} ed. Mexico DF. 2012 Editorial Interamericana SA.; Centro de bachillerato tecnológico Industrial [Citado: 12 de enero 2017] pp. 23, 26, 30-31, 35, 44, 49 Disponible en: <http://www.plerus.ac.cr/docs/manual-de-practic-as-biometrica-hermatica.pdf>

CARBONE Cecilia; Fabricio M., “El raton nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia” *QuimicaViva* [En línea], 2006, Universidad nacional de la Plata. 1(1) pp. 19-23 [Consulta: 10 de enero de 2017]. ISSN 1666-7948. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n1/carbone.pdf>

CASADO SÁNCHEZ, Eva María; et al. *Operaciones básicas laboratorio*. Madrid-España: Paraninfo, 2012, p.168.

CONDORI LOPEZ, Paola. “Reacción antígeno anticuerpo”. *Revista de Actualización Clínica* [en línea], 2011, (Bolivia) 13, p. 672 [Consulta: 2017-01-01]. ISSN 2304-3768. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S23043768201100100009&lng=es&nrm=iso

CORTÈS, Misael; et al. “Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C”. *Scielo* [en línea], 2007, (Colombia) 14(1), pp. 17-18 [Consulta: 2017-01-01]. ISSN 0121-4004. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v14n1/v14n1a03>

COX, A., Folgering, H. & Van Griensven, “Extrinsic allergic alveolitis caused by spores of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*” *European Respiratory Journal*. [en línea], 1988 (Van Griensven Wageningen University) 1(5), pp.466–468 [Consulta: 2017-03-02] ISSN 0903-1936, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3169217>

ESCALONA G., Yanett, Rozo, et al, *Inmunodeficiencias primarias: inmunopatogenia, infecciones asociadas y estrategias terapéuticas Avances en Biomedicina* [en línea] 2013, 2

(Octubre): [Consulta: 5 de enero de 2017] Disponible en:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330397004> ISSN 2244 -7281

FAINBOIM, Leonardo, & GEFNER, Jorge. *Introducción a la inmunología humana*. 5^a ed. Madrid-España: Medica Panamericana, 2008, pp. 1-2.

FERNADEZ P., Moreno A., Leza J.C. et al. *Farmacología Basica y Clinica* [En línea] 18^{ava} ed. Departamento de Farmacología de Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España. Editorial panamericana, 2008 [Consulta; 05 de enero 2017]. p. 567. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=BeQ6D40wTPQC&pg=PA567&dq=farmacologia+ciclofosfamida&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiMiveWu6vRAhXEYyYKHS8mAncQ6AEIGTAA#v=onepage&q=farmacologia%20ciclofosfamida&f=false>

FERREIRO J., Garcia J.L. et al. “Quimioterapia: efectos secundarios” *Gac Med Bilbao* [En Línea], 2003, (Osakidetza. Barakaldo) 30(100), pp, 69-74 [Consulta 05 de Enero 2017]. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista-gaceta-medica-bilbao-316-pdf-S0304485803744321-S300

FRANCISCO H, Chavarrías. *Fundamentos de Epidemiología*. [En línea] Primera edición. Costa Rica: Editorial Asoingraf, 2002 [Consulta: 18 de Julio de 2016.], p. 349. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=vu7xOb6X_qkC&pg=PA349&dq=inmunidad+pasiva&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjY45jom6rRAhXB6SYKHZx_BQUQ6AEIHZAB#v=onepage&q=inmunidad%20pasiva&f=false

GERARD J. Tortora, Berdell R. *Introducción a la microbiología* [En línea]. 9^{na} ed. Buenos Aires-Argentina: Editorial Panamericana, 2007, p. 475 [Consulta: 2016-07-16]. Disponible en: <https://books.google.es/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA475&dq=inmunidad+innata&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwib6KOhlKrRAhXCOSYKHSVrAMYQ6AEILzAA#v=onepage&q=inmunidad%20innata&f=false>

GUNTINAS Z., María Victoria. Inmunodeficiencias en la infancia. *Revista Cubana Pediatra* [En línea]. 2003, volumen 75, [Consulta 2017-01-05], p. 263. . ISSN 1561-3119.

Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312003000400007

ARCILA Víctor A. ;, Carlos A., et al., “Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas winstar/UIS (*Rattus norvegicus*) con parámetros establecidos en laboratorios de altos estándares.” *Spei Domus* [En línea], 2010, (Colombia) 6 (12) p. 46 [Consulta: 05 de Enero 2017]. Disponible en: <http://wb.ucc.edu.co/sdmvz/files/2013/06/articulo-6-vol-6-n-12.pdf>

HERNANDEZ Pamela S. *Inmunodeficiencias* [En línea]. Universidad de Chile. Aula digital 2010. [Consulta: 05 de Enero 2017], pp. 2-3 Disponible en: http://www.basesmedicina.cl/inmunologia/902_inmunodeficiencias/92_inmunologia_inmunodeficiencias.pdf

HERNÁNDEZ, Ricardo, & LÓPEZ, Claudia. Evaluacion del Crecimiento y Produccion del *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca [en línea] (tesis)(tercer nivel). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Escuela de Microbiología Industrial. Bogota-Colombia. 2012. pp. 27-28 [Consulta: 2017-01-01]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis257.pdf>

INGRAHAM, John & INGRAHAM, Catherine. *Introducción a la microbiología.* 5^{ta} ed. Barcelona-España: Reverte, 1998, pp. 400-401.

KOKUINA, Elena. *De la autoinmunidad a las enfermedades autoinmunes.* *Revista cubana de Medicina* [En línea]. 2001, volumen 40, [citado 2017-01-05], pp. 36-44. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232001000100006 ISSN 1561-302X

KUHAR, Francisco; et al. “Reino Fungi: morfología y estructura de los hongos”. n°28 (2013) (Argentina), p. 11.

LIBERMAN Ana C., Ducker Jimena, Refojo Damian, et al. “Mecanismo moleculares de acción de algunas drogas inmunosupresoras” *MEDICINA* [En línea], 2008, (Buenos Aires) 68 (6), p. 460. ISSN 0025-7680. Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v68n6/v68n6a10.pdf>

LÓPEZ RAMÍREZ, Armando. “El género pleurotus y su diversificación taxonómica en especies”. *Fungicultura* n°14 (2014) (Mexico), p. 12.

MCPHEE, Stephen & GANONG, William. *Fisiopatología médica: introducción a la medicina clínica*. 5^{ta} ed. México. D.F.- México: El Manual moderno, 2007a, pp. 35-36.

MCPHEE, Stephen & GANONG, William. *Fisiopatología médica: introducción a la medicina clínica*. 5^{ta} ed. México. D.F. - México: El Manual Moderno, 2007b, p. 32.

MORRIS QUEVEDO, Humberto; et al. “Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune”. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas* [en línea], 2011, (Cuba) 30(4), pp. 513-514 [Consulta: 2017-01-01]. ISSN 0864-0300. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v30n4/ibi09411.pdf>

MORRIS, H.J. et al. “Immunomodulating Effects of Hot-Water Extract From *Pleurotus Ostreatus* Mycelium on Cyclophosphamide Treated Mice”. *Micología Aplicada Internacional*, . [en línea] 2003 (Mexico) 15(1), pp.7–13. [Consulta: 2017-03-02] ISSN: 1534-2581, Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Humberto_Morris/publication/26484134_Immunomodulating_effects_of_hotwater_extract_from_Pleurotus_ostreatus_mycelium_on_cyclophosphamide_treated_mice/links/53f39f930cf256ab87b452d2.pdf%0Ahttp://micaplint.fws1.com

MORRIS, H.J. et al., “Immunomodulating properties of Pleurotus sp. fruiting bodies powder on cyclophosphamide treated mice”. *7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*, [en línea] 2011 (Cuba) 1, [Consulta: 2017-03-02] pp.329–338. Disponible en: https://colloque4.inra.fr/var/icmbmp7/storage/fckeditor/file/proceedings_individual_articles/ICMBMP7-Oral-3-21-Morris.pdf

NUFFIELD FOUNDATION, *Química Avanzada Nuffield* [En línea]. 1ra ed. Universidad de Barcelona- España, Editorial Reverte S.A. 1984 [Citado: 12 de enero 2017] p. 159, Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=CYDxxtY90L8C&pg=PA159&dq=metodo+del+fenol+sulfurico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiU_9zblL7RAhWMdSYKHetNCzgQ6AEIGDAA#v=onepage&q=metodo%20del%20fenol%20sulfurico&f=false

OLIVEIRA MIRANDA, María; et al. “La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales”. *Revista de ciencia y tecnología de América* [en línea], 2005, (Mexico) 30(8), pp. 453-454 [Consulta: 2017-01-09]. ISSN 0378-1844. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1373833>

PAREDES, Flor de María; Mendoza Rosa. *Guía de Manejo de animales de Laboratorio* [en línea]. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud Lima 2008. pp. 11, 24, 32, 46. [Consulta: 01 de 07 de 2016.] ISBN: 978-9972-857-69-0 Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf

PARHAM, Peter. *Inmunología.* 2^{da} ed. Buenos Aires-Argentina: Medica Panamericana, 2006, p.13.

PEÑA, Antonio; et al. *Bioquímica.* 2^{da} ed. México. D.F-México: Limusa, 2004, p. 143.

PERNAMBUCO, U. De et al., “Parâmetros hematológicos de Rattus norvegicus obtidos através de método automatizado e não automatizado” *Artigo Científico / Scientific Article* Intr.

[en línea] 2009 (Brazil), 3(2), pp.1–8. [Consulta: 2017-03-02] ISSN: 1809-4678, Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/289688609_Hematological_parameters_of_Rattus_norvegicus_gotten_through_automatized_and_not_automatized_method

QUESADA MORA, Silvia. *Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica.* San José-Costa Rica: Euned, 2007, p. 90.

RAMÍREZ ANGUIANO, Ana Cristina. *Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales* [en línea] (tesis)(doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Física Aplicada. Madrid-España. 2009. p. 63 [Consulta: 2017-01-01]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/117/22590_ramirez_anguiano_ana_cristina.pdf?sequence=1

RIOS, María del Pilar; et al. “Evaluación de los parámetros productivos de la semilla *Pleurotus ostreatus* propagada en diferentes medios de cultivo”. *Revista Facultad de Ciencias de la Salud Unicauca* [en línea], 2010, (Cuba) 8(2), p. 87 [Consulta: 2017-01-01]. ISSN 0124-308X. Disponible en: <http://revistabiotechnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotechnologia/article/viewFile/148/124>

RIVAS MORALES, Catalina; et al. *Investigación en plantas de importancia médica.* Nuevo León- México: OmniaScience, 2016, p.6.

RODRÍGUEZ, Claudio. Las células del sistema inmune: respuesta celular. [En línea]. Educacyl, 2013. [Consulta: 2017-01-09]. Disponible en: <http://iespoetaclaudio.centros.educa.jcyl.es/sitio/upload/01.inmunidad.pdf>

RONCERO RAMOS, Irene. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos [En línea]. CTICH, 2015a. [Consulta: 2017-01-01]. Disponible en: <http://www.adenyd.es/wp-content/uploads/2015/02/Informe-sobre-champi%C3%B1%C3%B3n-y-setas.pdf>

RONCERO RAMOS, Irene. Propiedades nutricionales y saludables de los hongos [En línea]. CTICH, 2015b. [Consulta: 2017-01-01]. Disponible en: <http://www.adenyd.es/wp-content/uploads/2015/02/Informe-sobre-champi%C3%B1-y-setas.pdf>.

SALMON S, Sartorelli A. *Quimioterapia del cáncer* [En línea] 7^{ma} ed. Katzung B. Farmacología básica y clínica. México DF. Editorial El Manual Moderno; 1998. [Consultado el 10 de Enero 2017] pp. 1015, 1017. Disponible en: <https://www.losmedicamentos.net/medicamento/ciclofosfamida>

SALVATELLA, Roberto & EIRALE, Carlos. “Examen coproparasitario. Metodología y empleo”. *Revista medica uruguaya* [en línea], 2007, (Uruguay) 12(3), p. 215 [Consulta: 2017-01-09]. Disponible en: <http://www.rmu.org.uy/revista/1996v3/art6.pdf>

SANCHEZ Tania L., “Conexion entre inmunodeficiencia primaria y autoinmunidad” *Revista Cubana de Hematología* [En línea], 2010; Cuba, 26(1), p. 199 [Consulta: 05 de Enero 2017] Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v26n3/hih03310.pdf>

SERRA, Héctor A.; ROGANOVICH, Juan Manuel y RIZZO, Leonardo F. L. “Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico.” *Medicina (B. Aires)* [En línea]. 2012, .72 (2) [Consulta 2017-01-05], pp. 158-170. ISSN 0025-7680. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802012000200015.

SHARAPIN, Nikolai; et al. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* [en línea]. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello, 2000, pp.41-42. [Consulta: 2017-01-09]. Disponible en: http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=XH2HzSIJPywC&oi=fnd&pg=PA13&dq=maceracion&ots=iTvSE0NCFr&sig=RZM8CwF_9Tx6N7tZoNwfhao8yiQ#v=onepage&q&f=false

VARNERO, Maria; et al. “Utilizacion de residuos forestales Lignocelulòsicos para produccion del hongo *Pleurotus ostreatus*”. *Scielo* [en linea], 2010, (Chile) 21(2), p. 14 [Consulta: 2017-01-01]. ISSN 0718-0764. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642010000200003&script=sci_arttext

WELSCH, Ulrich. *Histología*. 2^{da} ed. Buenos Aires-Argentina: Medica Panamericana, 2009, p.211.

WILLIAMS Martha, et al. *Observaciones preliminares sobre comportamiento prenatal y postnatal de *Rattus rattus* var. *norvegicus* (linneo 1758) en el laboratorio. Ecología. aplicada.* [En linea]. 2003, [citado 2017-01-05], pp. 143-148. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162003000100023

WOLFF K., Lowell A., Barbara A. et al. *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General* [En linea]. 7^a ed. Madrid España, 2008 [Consulta: 05 de Enero 2017]. p. 2172. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=1Osiphav6GMC&pg=PA2173&dq=ciclofosfamida&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiYzaWIyavRAhXM5CYKHWovB8AQ6AEIGTAA#v=onepage&q=ciclofosfamida&f=false>

WOLFF, Klaus; et al. *Dermatología en medicina general*. 7^{ma} ed. Buenos Aires-Argentina: Medica Panamericana, 2009, p.284.

ZALDÌVAR OCHOA, Miriam. “El sistema inmunològico de las mucosas”. *Revista Cubana de Medicina Integral* [en linea], 2002, (Cuba) 18(5), p. 153 [Consulta: 2017-01-01]. ISSN 1561-3038. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-21252002000500012&script=sci_arttext&tlng=en

ZIEGLER, E, & FILER, L. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 7^{ma} ed. Washington-Estados Unidos: ILSI Press, 1997, p. 627.

ANEXOS

ANEXO A. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO



Fotografía 1-3: Materia prima (*Pleurotus ostreatus*).

Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 2-3: Troceado de la materia prima

Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 3-3: Pesaje de la materia prima

Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 4-3: Lavado del hongo en etanol por 24 horas.

Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



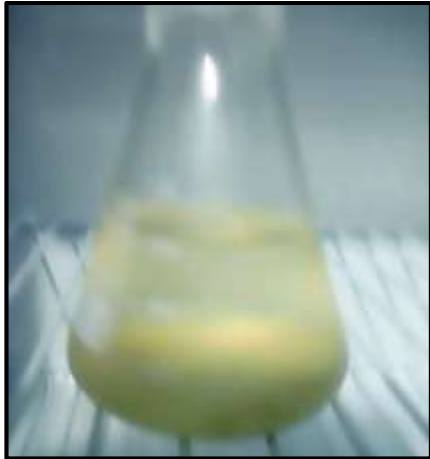
Fotografía 5-3: Proceso de digestión de la materia prima.

Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 6-3: Filtrado del extracto

Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 7-3: Refrigeración del extracto a 4°C por 48h
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 8-3: Centrifugación
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)

ANEXO B. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EXTRACTO



Fotografía 9-3: Prueba de Molish
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 10-3: Método del Fenol Sulfúrico
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)

ANEXO C. CONTROL PARASITARIO DEL MATERIAL BIOLÓGICO (*Rattus norvegicus*)



Fotografía 11-3: Preparado de las placas
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 12-3: Lectura de las placas
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 13-3: Antiparasitario (Albendazol)
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 14-3: Administración del antiparasitario
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)

ANEXO D. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA



Fotografía 15-3: Material biológico (*Rattus norvegicus*)
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 16-3: Pesaje del material biológico
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 17-3: Cloruro de Sodio al 0.9%
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 18-3: Extracto acuoso de *Pleurotus ostreatus*
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 19-3: Sedación de la rata
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 20-3: Administración del extracto
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 21-3: Administración de ciclofosfamida
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 22-3: Extracción de sangre a las ratas
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)



Fotografía 23-3: Realización de las pruebas biométricas
Tomada por: David Cepeda y Walter Leon (2017)

