USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA USC

Catalina
Fernández de Ana Portela

Tesis doctoral

MICOTERAPIA APLICADA EN ONCOLOGÍA INTEGRATIVA.

La aplicación de extractos de hongos con capacidad medicinal en el tratamiento de cáncer colorrectal para mejorar la calidad de vida y el pronóstico del paciente

Santiago de Compostela, 2021

PD en Investigación Clínica en Medicina

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DE DOCTORADO

MICOTERAPIA APLICADA EN ONCOLOGÍA INTEGRATIVA

La aplicación de extractos de hongos con capacidad medicinal en el tratamiento de cáncer colorrectal para mejorar la calidad de vida y el pronóstico del paciente

Catalina Fernández de Ana Portela

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2021

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Catalina Fernández de Ana Portela**

Título de la tesis: **Micoterapia aplicada en oncología integrativa. La aplicación de extractos de hongos con capacidad medicinal en el tratamiento de cáncer colorrectal para mejorar la calidad de vida y el pronóstico del paciente.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Pontevedra, 3 de mayo del 2021.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Micoterapia aplicada en oncología integrativa. La aplicación de extractos de hongos con capacidad medicinal en el tratamiento de cáncer colorrectal para mejorar la calidad de vida y el pronóstico del paciente.

Prof. Dr. D. **Manuel Pereiro Ferreirós**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dª. ***Catalina Fernández de Ana Portela***, bajo mi dirección y tutela, y autorizo su presentación, considerando que reúne l os requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, a 24 de abril de 2021.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Micoterapia aplicada en oncología integrativa. La aplicación de extractos de hongos con capacidad medicinal en el tratamiento de cáncer colorrectal para mejorar la calidad de vida y el pronóstico del paciente.

Prof. Dr. D. **Jaime Antonio Fabregas Casal**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dª. ***Catalina Fernández de Ana Portela***, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne l os requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, a 24 de abril de 2021.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN CONFLICTO DE INTERES

Micoterapia aplicada en oncología integrativa. La aplicación de extractos de hongos con capacidad medicinal en el tratamiento de cáncer colorrectal para mejorar la calidad de vida y el pronóstico del paciente.

Dña. Catalina Fernández de Ana Portela

Declaro que no existe ningún conflicto de interés económico ni de otra índole en relación con este estudio.

En Santiago de Compostela, a 15 de febrero de 2021

En Pontevedra, 3 de mayo del 2021.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice

Agradecimientos 15

Resumen 17

Resumo 19

Abstract 21

Resumen esquemático de resultados 23

Índice de tablas 25

Índice de figuras 27

1 INTRODUCCIÓN 29

1.1 Los hongos en medicina 29

1.1.1 El concepto de micoterapia 32

1.1.2 El uso de los hongos medicinales en la actualidad 34

1.1.3 Principios activos de los hongos medicinales 41

1.1.4 Propiedades medicinales y mecanismos de acción 45

1.1.4.1 Efectos en la salud emocional 57

1.1.4.2 Efectos adversos y contraindicaciones 58

1.1.5 Los hongos como prebióticos 59

1.2 Los hongos en oncología integrativa 63

1.2.1 Cáncer de mama 70

1.2.2 Cáncer de pulmón 74

1.2.3 Cáncer de próstata 77

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.4 Cáncer gástrico 78
1.2.5 Cáncer colorrectal 82
1.3 Antecedentes y estado actual de la micoterapia 86

2 HIPÓTESIS 93

3 OBJETIVOS 95

4 METODOLOGÍA 97
4.1 Cultivos y extractos de hongos 97
4.2 Ensayo *in vitro* sobre actividad prebiótica 98
4.3 Ensayo de toxicología farmacológica (CYP450) 101
4.4 Ensayos preclínicos *in vivo* 102
4.4.1 Animales y procedimiento experimental 105
4.4.2 Análisis de los marcadores inflamatorios 106
4.4.3 Marcadores de perfil lipídico y de estrés. 108
4.4.4 Caracterización de la microbiota intestinal 109
4.4.5 Análisis estadístico 110
4.5 Ensayo clínico – Estudio piloto 111
4.6 Financiación y Colaboraciones 112
4.7 Conflicto de intereses 113

5 RESULTADOS 115
5.1 Capacidad prebiótica *in vitro* 115
5.2 Resultados con el citocromo P450 119
5.3 resultados preclínicos *in vivo* 120
5.3.1 Análisis de los marcadores inflamatorios 120
5.3.2 Marcadores lipídicos y de estrés 125
5.3.3 Análisis de la microbiota intestinal 127
5.4 Resultados clínicos 134

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1 Protocolo del ensayo clínico 134
5.4.1.1 Hipótesis 134
5.4.1.2 Objetivos 135
5.4.1.3 Diseño del estudio 135
5.4.1.4 Población 137
5.4.1.5 Intervención 138
5.4.1.6 Tamaño muestral y análisis estadístico 139
5.4.1.7 Esquema del estudio 141
5.4.1.8 Actividades y determinaciones 144
5.4.1.9 Consideraciones éticas y confidencialidad 146
5.4.1.10 Cronograma 147

6 DISCUSIÓN 151
6.1 Prólogo 151
6.2 Ensayos preclínicos *in vitro* 152
6.3 Toxicología farmacológica 157
6.4 Efectos prebióticos 159
6.5 Ensayos preclínicos *in vivo* 164
6.6 Los extractos de hongos en oncología integrativa 168
6.7 Efectos neuroprotectores 174
6.8 Otras aplicaciones clínicas 177
6.9 Proyecciones de futuro 180
6.10 Epílogo 185

7 CONCLUSIONES 189

8 BIBLIOGRAFÍA 191

Glosario de siglas y abreviaturas 257

Anexos 261

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Quiero agradecer la posibilidad de haber llegado a la realización de esta tesis, en primer lugar, a mis directores de tesis Jaime Fábregas y Manuel Pereiro por haberme apoyado desde el final de la carrera hasta el depósito de la misma.

A todo el equipo de Hifas da Terra, por trabajar por esta ciencia; la micoterapia, investigando, estudiando y aplicando todo su potencial. Gracias, por haber hecho posible que me fuese a vivir a Reino Unido y dedicarme en exclusividad a escribir esta tesis.

A todos los pacientes que buscan mejorar su calidad de vida y pronóstico con la integración de la micoterapia en sus tratamientos.

Este ha sido uno de los trayectos más bonitos e intensos de mi vida profesional, en el que el estudio y la aplicación de lo aprendido me ha permitido ayudar a mucha gente en una patología tan compleja como el cáncer.

Me siento muy afortunada por tener el gran privilegio de aprender, desarrollar, y enseñar micoterapia, que da vida, sobre todo calidad de vida.

Por supuesto, agradecer a mis padres por todo, empezando por darme la vida. Ser mis guías, referencia y maestros.
A mis hermanas por ser mis compañeras de viaje, aventuras y aprendizaje.
A mis hijos, Nuno y Lucas por acompañarme y animarme cada día.

A mi marido Esteban por apoyarme siempre, incondicionalmente. Por ser mi roca, mis cimientos, tanto a nivel personal como profesional, en el precioso proyecto científico llamado Hifas da Terra.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Resumen

Como modificadores de la respuesta biológica (MRB), los hongos han demostrado en numerosos estudios clínicos y preclínicos tener importantes propiedades terapéuticas, incluyendo actividad antioxidante, inmunoestimuladora, antiinflamatoria y antitumoral, a lo que se suman las capacidades de los hongos de actuar como prebióticos. Surge así el término de Micoterapia, entendido como el uso de los hongos y sustancias fúngicas aplicados a la prevención y el tratamiento de enfermedades.

El cáncer es la enfermedad mortal número uno en el mundo actual. En el caso concreto del cáncer colorrectal (CCR), esta enfermedad supone aproximadamente el 15 % de los casos totales de cáncer, siendo el segundo tipo de cáncer en incidencia en los países occidentales, donde es una de las principales causas de mortalidad. Las limitaciones de las terapias oncológicas disponibles, como la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía, están favoreciendo el uso creciente de productos medicinales complementarios y alternativos (CAM). Estos productos actuarían como coadyuvantes, tanto para incrementar la eficacia de la terapia convencional, como para paliar los efectos secundarios y reducir el riesgo de recidiva. En este sentido, los extractos ricos en polisacáridos obtenidos de ciertas especies de hongos medicinales han mostrado efectos antitumorales en diferentes modelos experimentales. Por lo tanto, el uso de los hongos como nutracéuticos, sobre todo en oncología integrativa, responde a una demanda social, clínica y económica de incuestionable envergadura.

La presente tesis doctoral pretende evidenciar y determinar la capacidad anticancerígena y prebiótica de diversos extractos de hongos medicinales, respondiendo así de una manera múltiple a la arriba mencionada demanda.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por un lado, se hace una revisión del conocimiento generado en los últimos veinte años en el campo de la Micoterapia, en particular de la micología aplicada a la oncología. Por otro lado, se presentan y analizan los efectos citotóxicos y antitumorales de diferentes extractos de hongos medicinales, observados *in vitro* sobre líneas celulares humanas de CCR. También se muestran *in vivo*, en un modelo murino (ratones) de colitis ulcerosa y CCR, los efectos de los extractos de origen fúngico con capacidad prebiótica sobre los marcadores de inflamación y la microbiota intestinal.

Los resultados preclínicos confirmaron las propiedades prebióticas de los extractos fúngicos ensayados (*Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei* Murrill, *Lentinula edodes*, *Polyporus umbellatus* y *Ophiocordyceps sinensis*) y su potencialidad como terapia coadyuvante.

El extracto de *Hericium erinaceus* mostró propiedades prebióticas *in vitro*. Todos los extractos mostraron baja o nula capacidad de inhibición de las enzimas CYP450 (IC_{50} > 800 μg/ml), indicando una baja posibilidad de interacciones medicamentosas. *In vivo*, la fórmula Mico-Digest 2.0® indujo en ratones con CCR una reducción de los niveles de IL-6 y TNF-α en suero, así como una modificación significativa de la microbiota intestinal.

En función de los resultados preclínicos obtenidos, se ha diseñado el protocolo de un ensayo clínico aleatorizado, en doble ciego, que se llevará a cabo en pacientes diagnosticados con CCR candidatos a tratamiento quirúrgico con intención curativa. Este ensayo evaluará el efecto beneficioso de la administración del nutracéutico Mico-Digest 2.0®. Se evaluarán también los efectos sobre la microbiota intestinal, el patrón inflamatorio sistémico y la calidad de vida de los pacientes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumo

Como modificadores da resposta biolóxica (MRB), os fungos demostraron en numerosos estudos clínicos e preclínicos posuíren importantes propiedades terapéuticas, incluída a actividade antioxidante, inmunoestimuladora, antiinflamatoria e anticancerosa, á que se engaden as habilidades dos fungos para actuar como prebióticos. Xorde así o termo Micoterapia, entendido como o uso de fungos e substancias fúngicas aplicadas á prevención e tratamento de enfermidades.

O cancro é a enfermidade mortal número un no mundo actual. No caso específico do cancro colorrectal (CCR), esta enfermidade representa aproximadamente o 15% do total de casos de cancro, sendo o segundo tipo de cancro en incidencia nos países occidentais, onde é unha das principais causas de mortalidade. As limitacións das terapias contra o cancro dispoñibles, como a quimioterapia, a radioterapia ou a cirurxía, están a favorecer o uso crecente de medicamentos complementarios e alternativos (CAM). Estes produtos actuarían como coadxuvantes, tanto para aumentar a eficacia da terapia convencional como para aliviar os efectos secundarios e reducir o risco de recorrencia. Neste sentido, os extractos ricos en polisacáridos obtidos de certas especies de cogomelos medicinais demostraron ter efectos anticancerosos en diferentes modelos experimentais. Polo tanto, o uso de fungos como nutracéuticos, especialmente na oncoloxía integradora, responde a unha demanda social, clínica e económica de indubidable importancia.

A presente tese de doutoramento ten como obxectivo demostrar e determinar a capacidade anticancerosa e prebiótica de varios extractos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de cogomelos medicinais, respondendo así dun xeito múltiple á mencionada demanda.

Por unha banda, faise unha revisión do coñecemento xerado nos últimos vinte anos no mundo da Micoterapia, en particular da micoloxía aplicada á oncoloxía. Tamén se amosan *in vivo*, nun modelo múrido (ratos) de colite ulcerativa e CCR, os efectos de extractos de fungos con capacidade prebiótica sobre os marcadores inflamatorios e a microbiota intestinal.

Os resultados preclínicos confirmaron as propiedades prebióticas dos extractos de fungos ensaiados (*Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei* Murrill, *Lentinula edodes*, *Polyporus umbellatus* y *Ophiocordyceps sinensis*) e o seu potencial como terapia coadxuvante.

O extracto de *Hericium erinaceus* mostrou propiedades prebióticas *in vitro*. Todos os extractos mostraron baixa ou nula capacidade de inhibición dos encimas CYP450 (IC_{50} > 800 μg/ml), o que indica una baixa posibilidades de interaccións medicamentosas. *In vivo*, a fórmula Mico-Digest 2.0® induciu unha redución dos niveis séricos de IL-6 e TNF-α en ratos con CCR, así como unha modificación significativa da microbiota intestinal.

Baseándose nos resultados preclínicos obtidos, deseñouse o protocolo para un ensaio clínico aleatorio de dobre cego, que se levará a cabo en pacientes diagnosticados de CCR que son candidatos a tratamento cirúrxico con intención curábel. Este ensaio avaliará o efecto beneficioso da administración do nutracéutico Mico-Digest 2.0®. Tamén se avaliarán os efectos sobre a microbiota intestinal, o patrón inflamatorio sistémico e a calidades de vida dos pacientes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Abstract

As modifiers of the biological response (MBR), fungi have shown in numerous clinical and preclinical studies to have important therapeutic properties, including antioxidant, immunostimulatory, anti-inflammatory and anti-tumor activity, besides to their prebiotic capabilities. Arises thus the term of Micotherapy, understood as the use of fungi and fungal substances applied to the prevention and treatment of diseases.

Cancer is the number one deadly disease in the world today. In the specific case of colorectal cancer (CRC), this disease accounts for approximately 15% of total cancer cases, being the second most frequent type of cancer in Western countries, and one of the main causes of mortality. The limitations of available anti-cancer therapies, such as chemotherapy, radiotherapy, or surgery, favor the increasing use of complementary and alternative medicinal (CAM) products. These products would act as treatment's adjuvants, to increase efficacy of the conventional therapy, to alleviate side effects, and to reduce recurrence risk. In this sense, extracts rich in polysaccharides obtained from certain species of medicinal mushrooms have shown antitumor effects in different experimental models. Therefore, the use of fungi as nutraceuticals, especially in integrative oncology, responds to a social, clinical, and economic demand of unquestionable importance.

This doctoral thesis aims to demonstrate and determine the anticancer and prebiotic capacity of various medicinal mushrooms extracts, thus responding in a multiple way to the aforementioned demand.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

On the one hand, the knowledge generated in the last twenty years in the field of Micotherapy, particularly on mycology applied to oncology, is reviewed. The effects of fungal extracts with prebiotic capacity on inflammatory markers and the intestinal microbiota are also shown *in vivo* in a murine (mice) model of ulcerative colitis and CRC.

The preclinical results confirmed the prebiotic properties of the fungi extracts tested (*Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei* Murrill, *Lentinula edodes*, *Polyporus umbellatus* y *Ophiocordyceps sinensis*) and their potential as adjuvant therapy.

Hericium erinaceus extract showed prebiotic properties *in vitro*. All extracts showed low or no inhibition capacity of CYP450 enzymes (IC_{50} > 800 μg/ml), indicating a low possibility of drug-to-drug undesirable interactions. *In vivo*, the Mico-Digest 2.0® formula induced a reduction of IL-6 and TNF-α serum levels in mice with CRC, as well as a significant modification of the intestinal microbiota.

Based on the preclinical results obtained, a protocol for a randomized, double-blind clinical study has been designed. This trial will be carried out in patients diagnosed with CRC who are candidates for surgical treatment with curative intent. This trial will evaluate the beneficial effects of the nutraceutical Mico-Digest 2.0® administration. The effects on the patients' intestinal microbiota, systemic inflammatory pattern and quality of life will also be evaluated.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Resumen esquemático de resultados

A) Resultados preclínicos *in vitro*.

- El extracto de *Hericium erinaceus* aumentó el crecimiento de bacterias probióticas (efecto prebiótico).
- Los extractos de *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei* Murrill, *Lentinula edodes* y *Polyporus umbellatus* presentaron baja o nula inhibición de las enzimas CYP450.

B) Resultados preclínicos *in vivo* en un modelo murino de CCR:

- La fórmula Mico-Digest 2.0® mostró una tendencia a reducir los marcadores inflamatorios (IL-6 y TNF-α en suero, peso del bazo).
- Los ratones con CCR tratados con Mico-Digest 2.0® mostraron diferencias estadísticamente significativas (diversidad beta) en la composición de la microbiota intestinal con respecto a los grupos control en las Familias Bifidobacteriaceae, Erysipelotrichaceae y Clostridiaceae (concretamente el género *Candidatus* Arthromitus).

C) Resultados clínicos:

- Diseño detallado del protocolo de un ensayo clínico en Fase II para el tratamiento con micoterapia coadyuvante (fórmula Mico-Digest 2.0®) en pacientes oncológicos de CCR sometidos a cirugía curativa.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de cultivo y grupos de tratamiento de las bacterias entéricas y probióticas. Tiempos, temperatura y medio de cultivo de las distintas cepas de bacterias ensayadas. 100

Tabla 2. Composición de la fórmula Mico-Digest 2.0® para tratamientos preclínicos *in vivo*. Composición por cada 10 ml de preparado. 104

Tabla 3. Grupos experimentales en los ensayos preclínicos *in vivo*..... 106

Tabla 4. Índice de actividad prebiótica. Actividad prebiótica del extracto de *Hericium erinaceus* en dos especies de bacterias probióticas con respecto a dos cepas de bacterias entéricas a las 24 y 48 h de cultivo..... 116

Tabla 5. Inhibición del citocromo P450. Resumen de las concentraciones inhibitorias medias de los extractos fúngicos suplementarios sobre las principales isoenzimas de la familia CYP450..... 120

Tabla 6. Estadísticos del análisis de la diversidad alfa. El análisis se realizó entre cada 2 grupos mediante el test de Kruskal-Wallis H. 130

Tabla 7. Estadísticos del análisis de la diversidad beta. El análisis se realizó entre cada 2 grupos mediante el análisis PERMANOVA (999 permutaciones)..... 132

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Variación de la composición de microbiota tras la suplementación con Mico-Digest 2.0 ® durante 3 meses. 133

Tabla 9. Formulación del nutracéutico Mico-Digest 2.0® para el ensayo clínico. 136

Tabla 10. Sinopsis del protocolo del ensayo clínico. 147

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Índice de figuras

Figura 1. Actividad prebiótica *in vitro* del extracto de *Hericium erinaceus* en cultivos de las bacterias probióticas *Lactobacillus plantarum* (panel A) y *Lactobacillus rhamnosus* (panel B). 117

Figura 2. Evolución del peso promedio por grupo experimental en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. 122

Figura 3. Promedio del peso del bazo en cada grupo experimental. Ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico..... 123

Figura 4. Valores en suero de IL-6 en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico.. 124

Figura 5. Valores en suero de TNF-α en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. 125

Figura 6. Valores de colesterol en suero en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. 126

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 7. Valores de corticosterona en suero en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico.....127

Figura 8. Diversidad alfa filogenética en la microbiota intestinal de ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. N = 5 para control. N = 12 para CCR y CCR + prebiótico. u.a., unidades arbitrarias según métricas de *Faith Phylogenetic Diversity*. 129

Figura 9. Esquema de seguimiento del estudio clínico. ASA, American Society of Anesthesiologists' Physical Status Classification; CCR, cáncer colorrectal; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; TNM, estadio Tumor-Node-Metastases. 143

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS HONGOS EN MEDICINA

Su gran diversidad y su presencia en casi todos los ecosistemas hacen que los especialistas no se pongan de acuerdo respecto al número total de especies de hongos que habitan el planeta: entre 250.000 y 3.000.000, según sean incluidos o no en el recuento los hongos microscópicos como mohos y levaduras (se calcula que la biomasa fúngica existente podría llegar a dos toneladas por habitante de la Tierra). [116, 249] De este número total han sido descritas unas 100.000 especies. Entre estas, alrededor de unas 14.000 son macromicetos (hongos que producen en determinados momentos estructuras visibles con función reproductora denominadas carpóforos, cuerpos fructíferos o, popularmente, setas) y de las cuales aproximadamente 2.000 son seguras para el consumo humano. De estas, a su vez unas 650 poseen propiedades farmacológicas reconocidas. [6, 108] Unas 200 especies han demostrado tener importantes propiedades de inhibición del crecimiento tumoral en diversos tipos de cáncer. [415] Tomando como referencia estos datos, podemos afirmar por lo tanto que se conoce poco más del 10 % de los hongos superiores presumiblemente existentes. [219, 249] Asumiendo por hipótesis que un 1 % tenga propiedades farmacológicas, se podría aventurar que existen alrededor de 10.000 especies aún desconocidas para el ser humano que podrían tener aplicaciones medicinales y de salud. [108, 219, 367, 488]

La mayor parte de los hongos productores de cuerpos fructíferos o setas pertenecen a la división de los basidiomicetos (Basidiomycota), que incluye los hongos que producen basidios (estructuras microscópicas) con basidiosporas. Es el filo más evolucionado y el más conocido. Los hongos basidiomicetos son incapaces de sintetizar

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

materiales orgánicos a partir del dióxido de carbono, minerales y agua. Sólo pueden ingerir los nutrientes necesarios en solución por absorción. En general, requieren unas condiciones ambientales (aireación, luz, humedad, temperatura, pH, etc.) adecuadas. Además de agua y oxígeno, esenciales para su crecimiento, también requieren microelementos (N, P, K, Mg, Ca, Ga, Fe, Zn, Cu, Mn, Mb). Los hongos saprófitos son netamente ecológicos pues constituyen un elemento clave de la biodiversidad. Juegan un papel ecológico importante como recicladores de nutrientes en el ecosistema. [70] Sintetizan sus propios nutrientes a partir de residuos agrícolas que, de no ser degradados, supondrían un riesgo para la salud. [56]

Aunque el término hongo es muy genérico, pues agrupa, entre otros, a los basidiomicetos, los ascomicetos y las levaduras, en la presente tesis doctoral el término hongo hará referencia en su mayor parte a los hongos superiores, es decir, a los basidiomicetos. Si bien existen otros hongo superiores con propiedades medicinales que no pertenecen a la división de los basidiomicetes. Este sería el caso de *Ophiocordyceps sinensis*, que pertenece a la división de los ascomicetos (Ascomycota).

Los hongos viven en el nivel más hostil del ecosistema, caracterizado por sustancias en descomposición y por estar en contacto con muchos agentes patógenos, con un mayor riesgo de enfermedad en relación con otras formas de vida: un suelo cargado de microorganismos y de otros hongos muy competitivos. Por estas razones, para poder sobrevivir, han tenido que desarrollar sistemas «inmunitarios» preventivos. Es precisamente la presencia de poderosas enzimas y la abundancia de múltiples sustancias con propiedades antimicrobianas lo que sustenta la importancia del uso terapéutico de los hongos. [219, 249] Una misma especie de hongo puede poseer una gran variedad de compuestos bioactivos y, por lo tanto, de posibles efectos farmacológicos. [219] Los hongos representan una mezcla compleja de ingredientes individuales, cada uno de los cuales puede contribuir a su actividad biológica. [278]

Los hongos se han utilizado durante siglos como nutrientes en la dieta humana, como agentes de fermentación en la producción de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alimentos y bebidas y, desde luego, como medicinas. [216, 251, 337, 367, 418] De hecho, los hallazgos arqueológicos han demostrado el uso de los hongos medicinales desde el Paleolítico y, ya en épocas históricas, la aplicación de hongos en heridas abiertas aparece en jeroglíficos egipcios de hace más de 4.600 años. [109, 216, 251, 253]

Existen, sin embargo, importantes diferencias culturales en cuanto al uso medicinal de los hongos. En Oriente, las setas con propiedades curativas han sido muy apreciadas desde la más remota antigüedad. [6, 249] De hecho, el conocimiento más amplio de las propiedades terapéuticas de los hongos proviene de Oriente, en particular de China, Japón, Corea y Rusia septentrional y oriental, donde la tradición los ha considerado como una maravilla culinaria y un recurso importante de la medicina popular y la Medicina Tradicional China (MTC). [253, 299, 417] Un ejemplo de la importancia cultural de los hongos en las civilizaciones orientales es que, en el primer tratado de materia médica, el Pen Ts'ao Kang Mu, escrito en el año 1578 por el emperador, médico y literato Li Shih-chên, se recogen los efectos del hongo *Ganoderma lucidum* (llamado *reishi* en Japón o *Linh Chi* en China), que conocían como seta de la inmortalidad y la eterna juventud. Los emperadores de las grandes dinastías chinas bebían los extractos de este hongo para aumentar su vitalidad y longevidad. [105, 219] Por el contrario, los hongos han gozado históricamente de muy mala fama en Occidente. Tenemos constancia del gran uso y conocimiento que hubo en las primeras etapas de desarrollo de la humanidad. A principios del Neolítico pertenece la momia Ötzi, recuperada en los Alpes tiroleses y datada de 5300 años de antigüedad. Esta momia pertenece a un cazador neolítico que en su zurrón cargaba 3 tipos distintos de hongos empleados con distintos fines: como tizón para empezar un fuego, como alucinógeno para poder establecer conexión con sus dioses, y como antiparasitario. A partir de la Edad Media se fue reduciendo el uso de los hongos dada su relación con los fines curativos, la elaboración de pócimas y la persecución de las brujas por la Santa Inquisición. Además del efecto de la persecución a aquellos que utilizaban hierbas y hongos para curar, y el intento de proteger a la población contra las confusiones en la recolección de setas y sus consecuencias, ocurrieron distintos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

eventos que no ayudaron a la popularización de los hongos. Así, el «cornezuelo del centeno» diezmó la población europea en la Edad Media; en 1850 el «tizón de la patata» causó años de hambruna en Irlanda y miles de muertes por desnutrición; y el «mildiu» asoló los viñedos europeos a finales del siglo XIX. [6, 249]

Por otra parte, la medicina occidental moderna hasta el siglo pasado ha hecho escaso uso de los hongos medicinales, principalmente por la complejidad de la estructura que les caracteriza y por la dificultad de aislar las sustancias puras con propiedades farmacológicas. Pero a partir de 1960 la MTC empezó a despertar gran interés en Occidente y propulsó la investigación de las setas utilizadas con fines terapéuticos. Es a partir de la década de 1990 cuando realmente eclosiona el interés en el mundo occidental por comprobar y transmitir los efectos de los hongos y sus capacidades a nivel farmacológico. [219, 249, 337, 379, 396] Un número creciente de estudios han identificado las propiedades terapéuticas y el potencial farmacológico de diversas sustancias aisladas de diferentes especies de hongos. [6, 80, 216, 299, 448] En las últimas décadas, los hongos se han convertido en una maravillosa fuente de nutracéuticos, antioxidantes, anticancerígenos, prebióticos, inmunomoduladores, antiinflamatorios, diuréticos, cardioprotectores, antimicrobianos y antidiabéticos, constituyéndose así en la nueva generación de productos «bioterapéuticos». [236, 299, 337, 351, 482] Los productos fúngicos y sus derivados constituyen más del 50 % de los medicamentos clínicos usados en la actualidad en el mundo. [351] Los compuestos anticancerígenos extraídos de estos hongos desempeñan un papel crucial como inductores antioxidantes, antimitóticos, inhibidores de la angiogénesis, inductores de la apoptosis y controladores de la proliferación cancerígena. [299, 429, 443] En esta Introducción revisaremos en detalle las propiedades anticancerígenas de los hongos medicinales.

1.1.1 El concepto de micoterapia

El término «Micoterapia», entendido como el uso de los hongos y sustancias fúngicas en la prevención y el tratamiento de enfermedades, fue acuñado en 1997 por el profesor eslovaco Jan I. Lelley. [26] Aunque

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el término fue utilizado desde entonces por algunos expertos en el campo de la micología, el concepto de micoterapia fue puesto en boga en España por el grupo de investigación de la compañía Hifas da Terra a partir del año 2007, que también acuñó el término micoinmunoterapia. Este último hace referencia a las propiedades inmunoreguladoras de los extractos de hongos, como se explicará más adelante.

Las primeras publicaciones científicas internacionales que utilizan el término «mycotherapy» aparecen en 2011 y hasta la actualidad ha aparecido en apenas unas pocas docenas de publicaciones. La etimología del término procede del griego «myke», que significa hongo y de «therapeía», terapia, y haría referencia a la terapia basada en la aplicación sinérgica de distintas especies de hongos (o fracciones de estos) en el tratamiento, prevención, cura o mantenimiento de una patología en concreto. Es decir, la micoterapia consiste en la utilización de los hongos como elementos medicinales, en la mayoría de los casos como suplemento terapéutico integrador añadido al tratamiento convencional de la patología. [124]

La estrategia convencional de la industria farmacéutica consiste en investigar el mundo *fungi* buscando componentes activos, moléculas específicas de bajo peso molecular (metabolitos secundarios) que sirvan para combatir una determinada enfermedad. Una vez extraída dicha molécula, aislada y ensayada para probar su efectividad, la industria farmacéutica busca la forma más rentable para poder producirla masivamente y llevarla al mercado (previa patente del método de producción y de la efectividad terapéutica). [83, 96, 105, 176, 249] En la actualidad, universidades y centros de investigación a nivel nacional e internacional centran su interés sobre la actividad concreta de un tipo de molécula procedente de un hongo concreto. Este sería el caso de las erinacinas y hericenonas, presentes en el hongo *Hericium erinaceus*, de las que se ha descrito interesantes propiedades como activadores de la síntesis de la vaina de mielina y, por lo tanto, recuperadores de la actividad neuronal. [187, 225]

En micoterapia, por el contrario, lo que se investiga es el efecto del hongo en su totalidad (por lo general, del cuerpo fructífero o seta,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aunque a veces también del micelio), con todos sus principios activos. Las razones de esta estrategia alternativa son fundamentalmente dos. Por un lado, las moléculas actúan en sinergia, es decir, sumando la acción específica de una a la similar o complementaria de otra. Así, si en una seta tenemos un compuesto antitumoral y otro antiinflamatorio, la acción combinada de ambos será mucho más efectiva contra un determinado cáncer que cada uno de los compuestos actuando por separado. En segundo lugar, porque muchas setas medicinales que se utilizan para tratar determinadas enfermedades han demostrado su efectividad de forma empírica a lo largo de siglos de utilización. [249]

Aún conocemos muy poco sobre los hongos y cada día se descubren nuevos hechos sorprendentes acerca de estos organismos. [249] Pero, antes de alcanzar la generalización del uso clínico de los hongos, se requiere conseguir una producción estandarizada y aportar evidencias científicas de sus efectos beneficiosos, como sería el uso de hongos como terapia coadyuvante en los enfermos oncológicos.

1.1.2 El uso de los hongos medicinales en la actualidad

Resulta difícil definir qué es la medicina complementaria y alternativa hoy en día, pues se trata de un campo relativamente nuevo, muy amplio y en constante evolución. [263] El Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa (NCCIH, por sus siglas en inglés, *National Center for Complementary and Integrative Health*), dependiente del NIH (*National Institutes of Health*) es el principal organismo del gobierno federal de los Estados Unidos para la investigación científica sobre este tipo de medicina. Según este organismo, podemos distinguir diversos tipos de medicina en la actualidad: [263, 337]

- La «medicina convencional», también denominada medicina occidental, alopática, formal, ortodoxa, ordinaria o biomedicina. Sería la medicina ejercida por aquellos que poseen un título de doctor en medicina y los profesionales sanitarios asociados, como fisioterapeutas, psicólogos y enfermeros. Esta medicina convencional abarca una serie de terapias y prácticas que difieren mucho de un país a otro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- La «medicina complementaria» haría referencia a la medicina que se utiliza conjuntamente con la medicina convencional. Un ejemplo sería el empleo de la acupuntura como método adicional de alivio del dolor, o el uso de la aromaterapia para ayudar a mitigar la falta de comodidad del paciente después de la cirugía. Sin embargo, la eficacia y validez de muchas de las terapias de esta «medicina complementarias» está aún por demostrar.

- La «medicina alternativa», por el contrario, sería la medicina que se utiliza en lugar de la medicina convencional. Un ejemplo de terapia de medicina alternativa es el empleo de una dieta especial para el tratamiento del cáncer en lugar de la cirugía, la radiación o la quimioterapia recomendados por un médico convencional. Llevada al extremo, esta práctica puede acarrear serias y graves consecuencias para la salud.

- Por último, tenemos el término de «**medicina integrativa**», que haría referencia al empleo combinado de terapias médicas convencionales y terapias más propias de la medicina complementaria y alternativa. En el caso de estas últimas, se trataría de aquellas terapias para las cuales existen datos científicos de alta calidad sobre su seguridad y eficacia. [263, 337] El concepto de utilizar los hongos medicinales, es decir, la micoterapia, como complemento en oncología integrativa, constituye el fundamento de la presente tesis doctoral.

Las prácticas de medicina complementaria y alternativa suelen agrupar categorías amplias y no definidas formalmente. [263] Una de estas amplias categorías sería el empleo de los llamados «productos naturales», que comprendería la ingesta de hierbas y medicamentos derivados de las mismas, vitaminas, minerales, probióticos (microorganismos vivos, en general bacterias, similares a los microorganismos que normalmente se encuentran en el tracto digestivo del ser humano y que pueden tener efectos beneficiosos), prebióticos (ingredientes alimenticios no digeribles que estimulan de forma selectiva el desarrollo o la actividad de los microorganismos presentes en el cuerpo), suplementos dietéticos y, por supuesto,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hongos, que tradicionalmente se han incluido dentro de las «plantas medicinales». [263, 324, 367] A estas prácticas y suplementos también se les conoce de forma laxa como «productos medicinales complementarios y alternativos» (**CAM**, *complementary and alternative medicine*). [337]

Desde un punto de vista preventivo, las razones principales para tomar un producto natural como suplemento terapéutico son el mantener una buena salud, mejorar la homeostasis y crear las condiciones adecuadas para reducir el riesgo de enfermedad. [336] La falta de nuevas terapias convencionales disponibles y el deseo de empoderamiento ha llevado a muchos pacientes (más del 20 % según los estudios) a explorar el uso de medicamentos complementarios y alternativos. [341, 375] Por ejemplo, se ha publicado que los pacientes oncológicos a menudo toman suplementos dietéticos, tales como vitamina D, vitamina B6, vitamina C y magnesio, tras el diagnóstico. Un estudio ha establecido que en Europa el 62 % de las mujeres y el 29 % de los hombres, entre los supervivientes al cáncer, toman algún tipo de suplemento dietético. [310] Sin embargo, la información acerca de los beneficios específicos para la salud de estas prácticas es a menudo escasa y poco contrastada. Esta creciente demanda del mercado ha hecho que la búsqueda de compuestos naturales y suplementos efectivos, no tóxicos, con propiedades antioxidantes y ergogénicas se haya convertido en un tema de gran interés. [336] Se entiende aquí el término «suplemento» como compuestos que pueden usarse junto con el medicamento convencional para el tratamiento de una enfermedad, que conducen a un mejor resultado general de dicho tratamiento, o a una reducción de los efectos secundarios indeseables causados por el medicamento primario. [375]

Las medicinas complementarias y alternativas (CAM) han surgido en las últimas décadas como una estrategia prometedora para tratar una amplia cantidad de enfermedades, incluido el cáncer. [109, 331, 337] La medicina complementaria y alternativa se ha asociado en un buen número de estudios con un impacto positivo en los pacientes con cáncer, en lo que se refiere a respuesta al tratamiento convencional, reducción de los efectos secundarios y mejora de la calidad de vida. [337] En este sentido, los hongos y sus extractos serían una de las opciones de la medicina integrativa que ofrecen en la actualidad un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mayor número de posibilidades terapéuticas. Las setas medicinales serían así consideradas no como un medicamento, ni como una alternativa excluyente a la terapia convencional, sino como un complemento nutricional y farmacológico (nutracéutico) que podrían ejercer una acción coadyuvante con el correspondiente tratamiento médico de la enfermedad diagnosticada. [249] Un **nutracéutico**, neologismo formado por la fusión de las palabras «nutrición» y «farmacéutico», se define como un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos para la salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de enfermedades. [169]

Los «complementos alimenticios» se encuentran recogidos en la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros de la UE en materia de complementos alimenticios. En esta directiva se define a los complementos alimenticios como: «Los productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir, cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras forma similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias». La etiqueta, presentación y publicidad no atribuirán a los complementos alimentarios la propiedad de prevenir, tratar o curar una enfermedad humana, ni se referirá en absoluto a dichas propiedades. Además, la Directiva es tajante: «En la fabricación de los complementos alimenticios pueden asimismo emplearse las sustancias que hayan sido aprobadas por el comité científico de la alimentación humana sobre la base de los criterios mencionados, para su utilización en la fabricación de alimentos destinados a lactantes y a niños de corta edad, y otros alimentos para usos nutricionales particulares.»

Esta Directiva europea no regula la concentración de nutrientes, dosis ni forma química de muchos de los productos naturales necesarios para la salud humana, como pueden ser la coenzima Q10, la cúrcuma, los carotenoides, etc. Tampoco están regulados, ni en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Directiva 2002/46/CE ni en los Reglamentos 1952/2006 y 1170/2009, ya que estos hacen sólo referencia a vitaminas y minerales. Incluso la Directiva 2008/100/CE, dirigida específicamente a la cantidad diaria recomendada (CDR) está incompleta, ya que, por ejemplo, indica que la CDR del ácido fólico es de 200 µg diarios, y no reconoce que para la prevención de la espina bífida en bebés es necesario que la madre tome 400 µg de ácido fólico al día. El Reglamento (UE) N.º 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una «lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños», está algo más desarrollado y adecuado a la demanda científica y social actual.

En conclusión, ninguna directiva europea hace referencia a los términos «suplemento alimenticio», «alimento funcional» o «nutracéutico». Por lo tanto, en la presente tesis doctoral no se utilizará el término «complemento alimenticio», cuya base es exclusiva para vitaminas y minerales. Cuando se haga referencia a los extractos de hongos superiores utilizados en los distintos ensayos se utilizarán los términos «suplemento alimenticio» o «nutracéutico».

En los últimos tiempos, la cultura occidental ha empezado a valorar la gran potencialidad del hongo medicinal como recurso natural para combatir diferentes enfermedades ante las problemáticas que presenta el abuso de fármacos. Por lo tanto, no es de extrañar que el número de estudios científico-médicos en esta materia aumente rápidamente. De esta manera, a finales del siglo XX y comienzos del XXI, las producciones de hongos crecieron de forma exponencial, tanto por el desarrollo de nuevas y modernas tecnologías (cultivo estéril, cultivo de micelios, etc.) como por el crecimiento de la aceptación popular de las propiedades nutricionales y saludables de los hongos. [6]

Diversos organismos nacionales e internacionales han emitido diversas directrices para el uso de los hongos como nutracéuticos, como es el caso de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la FDA (*Food and Drug Administration*) estadounidense y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

European Food Safety Authority) el organismo responsable de la normativa para la comercialización de componentes alimentarios con fines sanitarios en la Unión Europea (UE).

Aunque la medicina occidental en el siglo pasado ha hecho escaso uso de los hongos medicinales, las investigaciones realizadas en las últimas décadas han cambiado por completo ese panorama. De hecho, se espera que el impacto de la industria de los hongos continúe creciendo significativamente, tanto por su producción y comercialización, como por el descubrimiento de nuevas sustancias de origen fúngico con propiedades farmacológicas. [412] Con una tasa de incremento de la producción anual estimada en un 11 %, la producción mundial de los hongos cultivados supera los 6 millones de toneladas anuales, con un valor cercano a los 30 mil millones de dólares. [45] En EE.UU., las ventas de hongos como suplementos medicinales se incrementaron en más de un 40 % en 2018 con respecto al año anterior, con un valor de mercado de 7,8 mil millones de dólares. [362] La mayor parte de este incremento en la producción industrial de hongos se debe a la confirmación y difusión de sus propiedades medicinales y nutritivas. [45] El valor mundial del comercio de hongos cultivados se calculó para 2013 en aproximadamente 63 mil millones de dólares estadounidenses, de los cuales un 38 % (24 mil millones de dólares) correspondieron a hongos medicinales. [338]

En la actualidad se ha recuperado en gran medida el uso medicinal de las setas, y multitud de centros de investigación micológica rescatan el antiguo acervo de muchos usos tradicionales, a la vez que confirman con rigor científico el valor terapéutico de los hongos y sus derivados. Además, se investigan nuevas especies y variedades de las que se extraen sustancias con actividades farmacológicas y terapéuticas (antitumorales, inmunomoduladoras, antiinflamatorias, anti-coagulantes, etc.). Como ejemplos tenemos la «ciclosporina», molécula inmunosupresora que se aisló hace pocos años de un hongo ascomiceto que se desarrolla en los suelos: *Tolypocladium inflatum*. [34] También hace poco se aisló la «flutamida», de un extracto de *Delitschia confertaspora*, una seta tropical originaria de Namibia, que es un poderoso antiviral contra la gripe A. [383] Más recientemente se obtuvo la «aparicina», del hongo *Fusarium* sp., un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

agente antiprotozoario y antiparasitario (malaria, toxoplasmosis, etc.). [302] Una lacasa (enzima oxidasa) aislada del hongo *Cerrena unicolor* ha demostrado tener actividad antitumoral, mediante estimulación de la apoptosis, en diversas líneas tumorales en cultivo. [245] Las propiedades antitumorales del hongo *Trametes trogii* (*Funalia trogii*) también parecen estar ejercidas por una enzima lacasa, entre otros componentes potencialmente bioactivos. [321] El flavonoide rutina (un metabolito secundario con gran potencial como nutracéutico), oligomerizado enzimáticamente empleando lacasas de *Trametes versicolor*, presentó propiedades antiproliferativas en una línea celular de leucemia humana. [326] En células primarias de pacientes con leucemia mieloide, el tramesan, un compuesto bioactivo aislado de *Trametes versicolor* también mostró propiedades citotóxicas. [327]

Además de sus propiedades terapéuticas y su utilización en la medicina integrativa, hoy en día se están empleando varias especies de hongos como elementos de biorremediación para recuperar entornos naturales contaminados por la acción del hombre o para combatir con lucha biológica plagas mediante hongos entomopatógenos que destruyen insectos dañinos para las cosechas, evitando de esta manera el uso de los peligrosos insecticidas químicos. [70] En este sentido, el polisacárido P (PSP) aislado de *Trametes versicolor* (también conocido como *Coriolus versicolor*) ha mostrado excelentes propiedades como potencial pesticida en el control de virus vegetales. [481] Las lacasas, enzimas esenciales en la degradación de la lignina producidas por algunos hongos (además de plantas y algunos insectos) tienen un gran potencial en diferentes aplicaciones biotecnológicas, como la detoxificación de residuos industriales, limpieza de herbicidas y purificación de aguas. [70, 334] También se investigan varios hongos por su propiedad de transformar celulosas en alcohol o azúcares, lo que permitiría la elaboración de biocombustibles a partir de restos agrícolas o forestales sin repercutir en el ciclo de producción de alimentos. [249] Ejemplos de estas otras aplicaciones de los hongo son algunos de los proyectos desarrollados en la empresa Hifas da Terra. Así, tenemos el proyecto Mico-Tecnosoles, que consiste en el diseño, formulación y elaboración de suelos técnicos (tecnosoles) para la biorrecuperación de suelos contaminados por hidrocarburos y metales

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pesados mediante la aplicación de diferentes especies de hongos. O el proyecto Sanavid, sobre la incidencia de la podredumbre blanca de la raíz en plantaciones vitícolas y su control biológico por medio de soluciones edáficas, avanzadas y sostenibles (para más información, consultar en: https://www.hifasforesta.com).

En la actualidad, los hongos medicinales y sus derivados se usan en todo el mundo con cinco funciones esenciales: [418]

1. Como alimento.
2. Como suplemento dietético.
3. Como fármacos.
4. Como agentes de control biológico.
5. Como cosméticos.

En definitiva, el valor de los hongos y de los productos derivados de los mismos va en aumento, por lo que resulta esencial profundizar en su estudio y en su conocimiento para optimizar su utilización. Solo de esta forma los hongos podrán contribuir diariamente al bienestar del hombre.

1.1.3 Principios activos de los hongos medicinales

El valor terapéutico de los hongos no reside solo en sus constituyentes nutricionales, sino principalmente y en lo que se refiere al propósito de la presente tesis doctoral, en su contenido en moléculas muy especiales que cumplen una función terapéutica específica. [105, 249, 277] Estas moléculas pueden ser agregadas a la dieta e ingerirse por vía oral, lo que supone un enfoque seguro y útil para el tratamiento de muchas enfermedades. [253] De las distintas moléculas de valor terapéutico, farmacológico o medicinal que contienen los hongos medicinales y sus cuerpos fructíferos, las setas, conviene destacar los siguientes principios activos: [29, 48, 56, 105, 109, 249, 253, 269, 277, 291, 311, 324, 325, 337, 341, 394, 407, 415, 416, 418, 435, 492]

1. **β-glucanos**. Forman parte de la membrana celular de los hongos y son largas cadenas de polisacáridos, es decir, grandes

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

moléculas formadas por monosacáridos (D-glucosa) unidas mediante enlaces glucosídicos entre los carbonos 1 de una molécula de glucosa y los carbonos 3, 4 y 6 de la molécula adyacente, formando polímeros lineales o ramificados. La mayoría de los basidiomicetos superiores contienen polisacáridos. Por lo que se sabe hasta hoy, parece que las propiedades terapéuticas de los betaglucanos están más relacionadas con las ramificaciones laterales que con la cadena principal. Hay varios tipos de betaglucanos, pero los más importantes y estudiados son los denominados β-glucanos 1,3. Son capaces de activar la respuesta inmune innata y adquirida del huésped. Según los resultados de estudios experimentales en animales, los β-glucanos se unen, entre otros, al receptor del complemento CR3, presente en algunas células del sistema inmune, como neutrófilos, monocitos, macrófagos, células NK (*natural killer*, un tipo de linfocitos componentes del sistema inmunitario innato) y células LAK (*lymphokine-activated killer cells*). La activación del receptor CR3 favorece la lisis de las células tumorales o la fagocitosis de las mismas. Otros estudios han demostrado que los β-glucanos inducen una disminución en la producción y un bloqueo de la acción del TGF-β (factor de crecimiento transformante beta) y de la IL-10 (interleucina-10), contrarrestando así el efecto inmunosupresor de estas citoquinas. También se ha descrito que los β-glucanos actúan sobre los linfocitos T CD (cúmulo de diferenciación) 4+ y CD8+, lo que promovería la transformación de los primeros en linfocitos Th1 (linfocitos T *helper* tipo 1) y de los segundos en linfocitos T citotóxicos (CTL). Estas transformaciones celulares a su vez promueven la liberación de citoquinas como la IL-2 y el IFN-γ (interferón gamma) que activan la inmunidad celular innata (células NK y macrófagos) y adquirida (CTL), e inhiben las respuestas inmunosupresoras. [109] Se ha descrito que el 1,6-α-D-glucopiranosil extraído del cuerpo fructífero de *Trametes versicolor* induce la producción de citoquinas, IFN-α (interferón alfa) e IFN-γ en ratones con sarcoma mediante la estimulación de linfocitos Th2 y Th17, actuando como inmunomodulador. [15,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[16] Además de sus efectos sobre el sistema inmune, los β-glucanos también ejercen acciones antitumorales de forma directa, inhibiendo la proliferación y favoreciendo la apoptosis de las células tumorales. También bloquean la producción de metástasis al inhibir la producción de TGF-β, de las metaloproteinasas y de factores angiogénicos. [50, 60, 75, 109, 195, 253, 341, 398] (ver Novak et al., 2009 para una revisión sobre los efectos de los β-glucanos). [278] Los 1,3-β-D-glucanos son aqwcapaces de aumentar la actividad de macrófagos [42] e inducir la producción de óxido nítrico en los mismos, promovida igualmente por β-glucanos con ramificaciones 1,6. [342] Promueven además el aumento de la capacidad citostática frente a células tumorales en animales, [348] presentan capacidad hematopoyética, y estimulan la proliferación de monocitos y macrófagos. [298] Los polisacáridos, entre otros metabolitos fúngicos, han mostrado efectos hematopoyéticos. [253] Los 1,3-β-D-glucanos estimulan también la producción de componentes proinflamatorios del complemento como la IL-1 α/β, TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-2, IFN-γ, IL-10, e IL-4. [106] Sin embargo, los mecanismos precisos por los que los β-glucanos ejercen sus distintos efectos terapéuticos aún no se han dilucidado por completo. [337]

2. **Glicoproteínas o proteoglicanos**. Son cadenas lineales de proteínas (péptidos) a las que se unen varias cadenas laterales de β-glucanos. Suelen tener una función inmunomoduladora o antitumoral más potente que estos últimos. Su acción se vincula al hecho de que estos proteoglicanos provocan un aumento en el número y la actividad de los macrófagos, de los neutrófilos, de las células NK y de algunos de los linfocitos T, a la vez que potencian la secreción de citoquinas específicas (actividad citotóxica). También impiden que haya una sobrerreacción del sistema inmunitario, regulando su funcionamiento y evitando una reacción autoinmune.

3. **Triterpenos**. Son moléculas de hidrocarburos típicas de las plantas, pero también presentes en el tejido animal y en los cuerpos fructíferos de las setas medicinales. Algunos ejemplos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

serían el ácido ganodérico, ácido betulínico, ácido trametenólico, etc. Se les atribuyen las siguientes propiedades: antiviral, hipotensora, hepatoprotectora, antihistamínica, antiagregante y anticolesterolémica, entre otras. [29] También tienen efecto antitumoral directo, al inhibir la proliferación celular, promover la apoptosis y bloquear la invasión celular y la neoangiogénesis. Los datos preclínicos han mostrado que los triterpenos aislados de hongos superiores tienen un amplio espectro de propiedades anticancerígenas, incluyendo inhibición de la proliferación celular, la metástasis y la angiogénesis, así como la estimulación de la apoptosis. Sin embargo, los mecanismos intracelulares implicados en estos procesos están aún sin dilucidar por completo. [435]

4. **Esteroles**. Son un tipo de grasa, como la provitamina D (ergosterol), de acción antiviral y antitumoral.
5. **Lectinas**. Son proteínas que se unen de forma esporádica y temporal con los glúcidos. Algunas tienen la propiedad de aglutinar las células tumorales bloqueando su proliferación.
6. **Enzimas**. Podemos distinguir tres tipos de enzimas contenidas en las setas:
    a. Enzimas antioxidantes, como la SOD (superóxido dismutasa) y la lactasa, que actúan neutralizando los radicales libres.
    b. Enzimas que limitan la proliferación celular, como las proteasas y la glucosa-2-oxidasa.
    c. Enzimas hepáticas como la peroxidasa, el citocromo P450 (CYP450) y la citocromo P450-reductasa, que tienen una importante acción detoxificante.
7. **Nucleósidos**. Son moléculas monoméricas formadas por la unión covalente entre una base nitrogenada y una pentosa, que puede ser ribosa o desoxirribosa. Algunos nucleósidos encontrados en los hongos han demostrado también tener actividad antitumoral *in vitro*, como es el caso de la cordicepina,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

presente en el hongo *Ophiocordyceps sinensis*. Este nucleósido bloquea la síntesis de ARN y ADN, lo que probablemente constituye la base de su acciones antitumoral y antiviral directas. [105]

8. **Otras sustancias**. Las setas medicinales contienen otras sustancias de poder terapéutico que son específicas de cada especie de hongo. Por ejemplo: las estatinas, la eritadenina, la ergotioneina, el factor de crecimiento nervioso (NGF por su siglas en inglés, *nerve growth factor*), las FIP (*fungal immunomodulatory proteins*), etc.

Históricamente, cada uno de estos grupos de metabolitos fúngicos se ha asociado con una actividad oncológica específica. Por ejemplo, los compuestos de alto peso molecular se creía que ejercían sus efectos antitumorales mediante la activación del sistema inmunitario del huésped, tanto el sistema innato como el adaptativo. Mientras que las moléculas de bajo peso molecular actuarían directamente sobre las células tumorales, regulando sus rutas de señalización intracelulares. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la división de funciones no es tan clara ni específica. [337, 351] En las secciones siguientes profundizaremos con mayor detalle en los mecanismos de acción y los principios activos de las diferentes especies de hongos medicinales, principalmente en sus aplicaciones para el tratamiento de enfermos oncológicos.

1.1.4 Propiedades medicinales y mecanismos de acción

Los hongos, en su conjunto de sustancias y principios activos, son considerados **modificadores de la respuesta biológica** (MRB). [30, 270, 418, 475, 488] Gracias a sus actividades inmunoestimulante y adaptógena, permiten una mejor gestión de la situación de estrés psíquico-físico, se comportan como tónicos y apoyan a los principales sistemas orgánicos, en particular los sistemas nervioso, inmunitario y endocrino, así como a las funciones de regulación fisiológica del organismo. Un número considerable de estudios han demostrado que los hongos medicinales tienen efectos beneficiosos en una amplia variedad de enfermedades que incluyen infecciones, alergias, asma,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

trastornos inflamatorios y cáncer. Los efectos anticancerígenos de los hongos medicinales y sus extractos se han asociado principalmente con la modulación del sistema inmune ejercida por los polisacáridos, glucanos, sesquiterpenos y glicoproteínas. [157, 337] Los resultados obtenidos hasta la fecha parecen indicar que la mayor parte de las propiedades terapéuticas de los hongos son debidas a la estimulación de la inmunidad innata, un efecto «de amplio espectro» que principalmente implica la estimulación del sistema inmune no específico. Es decir, los hongos ejercen su actividad antitumoral principalmente mediante la estimulación de los mecanismos de defensa del huésped. [92, 219, 341]

En líneas generales, los principales efectos terapéuticos atribuidos a los hongos son los siguientes: [7, 56, 139, 180, 219, 236, 249, 291, 292, 320, 353, 364, 416, 418, 429, 480, 488]

- Actividad estimuladora del sistema inmunitario.
- Actividad reguladora del sistema inmunitario (inmuno-moduladora).
- Actividad bactericida, fungicida y antiviral.
- Actividad antitumoral.
- Actividad citotóxica.
- Actividad antiaterogénica (previene la acumulación de lípidos en las paredes arteriales).
- Actividad hipocolesterolemizante.
- Actividad antihipertensiva.
- Actividad hepatoprotectora.
- Actividad nefroprotectora.
- Actividad antitrombótica.
- Actividad antidiabética.
- Actividad adaptógena de respuesta al estrés.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Actividad antiinflamatoria.
- Actividad antioxidante.
- Actividad antialérgica.
- Actividad genoprotectora.
- Actividad estimuladora de la regeneración de las células nerviosas.
- Actividad hematopoyética.
- Actividad estimuladora de la libido.
- Actividad aumentadora de la fertilidad.

Estas actividades se explican gracias a los contenidos de diversas sustancias con propiedades farmacológicas (ver epígrafe 1.1.3). [105, 176, 278, 418] Dentro de estas sustancias, los β-glucanos son probablemente el metabolito más versátil de los hongos medicinales debido a su amplio espectro de actividades biológicas. [60, 278, 299, 406] Existen publicados más de 6.000 artículos que describen dichas actividades. [278]

El funcionamiento del sistema inmunitario se involucra de manera crítica en la progresión tumoral, lo que hace que la inmunoterapia sea una estrategia de primer orden en el tratamiento del cáncer. [337] El efecto inmunoestimulador de los β-glucanos ha sido observado tanto en animales como en humanos. [195] De hecho, diversos estudios *in vitro* y con modelos animales *in vivo* han mostrado que los β-glucanos derivados de hongos y levaduras tienen propiedades inmuno-moduladoras, siendo los efectos evaluados con mayor frecuencia aquellos ejercidos sobre las poblaciones de leucocitos. [253, 401] Los β-glucanos son capaces de aumentar la actividad de macrófagos [42] y de inducir la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos [342] y leucocitos. [14] Promueven el aumento de la capacidad citostática frente a células tumorales en modelos animales, [348] presentan capacidad hematopoyética y estimulan la proliferación de monocitos y macrófagos. [298] La ingestión oral de los β-glucanos presentes en los hongos medicinales son capaces de activar diversos componentes del sistema inmunitario, incluyendo macrófagos, células NK, células

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*) y linfocitos T, lo que afecta a la viabilidad tumoral. [346] Los β-glucanos estimulan también la producción de componentes proinflamatorios del complemento como la IL-1 α/β, TNF-α, IL-2, IFN-γ, IL-10, e IL-4 tanto *in vitro* como *in vivo*. [16, 106, 150,175] (revisar Novak et al., 2009 para los mecanismos de acción de los β-glucanos). [278] Su mecanismo de acción implica que se les reconozca como moléculas ajenas al organismo, por lo que el sistema inmunológico se ve estimulado ante su presencia. [299, 337]

La evidencia que proporcionan los estudios en animales indica que la acción antitumoral de los polisacáridos de los hongos está mediada principalmente por la regulación inmunomoduladora de estos compuestos y, en menor medida, por una acción citotóxica directa sobre las células tumorales. [375] Por ejemplo, se ha demostrado que el polisacárido K (PSK, también llamado krestin) de *Trametes versicolor* (anteriormente denominado *Coriolus versicolor*) regula las citoquinas y activa el sistema del complemento de las células NK en pacientes con cáncer colorrectal. [286] Este aumento de la actividad de las células NK, así como de la fagocitosis, pueden conducir a una mayor destrucción del tumor. [109] Además, la presencia de múltiples tipos de moléculas podría inducir múltiples actividades terapéuticas, ya que los polímeros derivados de distintas fuentes pueden activar distintos receptores y rutas celulares específicas. [398] Se ha descrito que el incremento de células NK es dependiente de la dosis, hasta un máximo de 6 g de extracto por día, de *Trametes versicolor*. En el caso de las células T, la dependencia de la dosis se mantiene incluso para dosis de 9 g por día. [385] Un glucano aislado del micelio de *Pleurotus ostreatus* mostró capacidad antitumoral e inmunomoduladoras en modelos de ratón. [76] Un extracto acuoso de *Pleurotus eryngii* mostró una inhibición significativa de las células HCT116 (línea tumoral humana de cáncer de colon) y promovió la apoptosis. También tuvo un efecto negativo en la migración y la adhesión celulares de esta línea tumoral. [94] La seta en polvo de *Pleurotus eryngii* es capaz de reducir el número de lesiones precancerosas inducidas tanto en colon como en recto de modelos animales. [172] Extractos solubles del hongo *Agaricus blazei* Murrill favorecieron la proliferación de linfocitos T y aumentaron la actividad de células NK, la fagocitosis ejercida por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

macrófagos y monocitos, así como la proliferación de citoquinas proinflamatorias IL-1b, IL-6 e IFN-γ en ratones. [217, 250] Una proteína aislada del cuerpo fructífero de *Grifola frondosa* mostró capacidad de activar las células NK y DC en ratones, a través de mecanismos dependientes del INF-γ y los receptores TLR4 (*toll-like receptors* tipo 4). [390]

Los efectos inmunomoduladores de los polisacáridos de los hongos afectan a la mitogenicidad y a la activación de las células efectoras del sistema inmunitario, como son las células T, macrófagos y células NK, lo que resulta en la producción de citoquinas, incluyendo interleucinas, factor de necrosis tumoral e interferones. [25, 236] También se ejercerían estos efectos, entre otras vías, a través de la activación de las células dendríticas, la inducción de la respuesta antitumoral de las células T a través de la activación de la dectina-1, el incremento de la infiltración de las células T activadas y la disminución del número de células inmunosupresoras causadas por el tumor, como las células T reguladoras. Esta activación e inactivación celular se ha demostrado en estudios preclínicos con modelos animales. [50, 236, 241, 316]

El sistema inmunológico protege al cuerpo humano contra la invasión de organismos patógenos como bacterias, virus y parásitos, pero también participa en la lucha contra células tumorales. Este sistema es el resultado de dos sistemas que interactúan mutuamente: el sistema inmunitario innato o inespecífico y el adaptativo o específico. [253, 401] La respuesta inmune innata depende en gran medida del reconocimiento de estructuras microbianas conservadas, los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*). Los β-glucanos de los hongos serían un ejemplo de PAMP. [253] Estas pequeñas secuencias de moléculas son reconocidas por los receptores tipo *toll* (TLR) y otros receptores de reconocimiento de patrón (*pattern-recognition receptors*, PRR) presentes en las células del sistema inmune , como por ejemplo la dectina-1. Algunos estudios sugieren que las sustancias bioactivas de los β-glucanos y proteoglicanos modulan el sistema inmunológico principalmente por medio de su interacción con los receptores TLR2 y TLR4 de los leucocitos periféricos, lo que activaría las rutas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intracelulares que darían lugar a la síntesis de las citoquinas antes mencionadas. [84, 210, 209, 216, 226, 261, 278, 284, 306, 316, 409, 449, 484]

En este sentido, estudios *in vitro* [449] y con modelos de ratones *in vivo* [413] han demostrado que el polisacárido P (PSP, también llamado coriolan) de *Trametes versicolor* ejerce sus efectos inmuno-moduladores a través de mecanismos dependientes de la ruta intracelular del TLR4, además de otras vías de señalización celular, como las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), las inmunoglobulinas, el NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) [449] o las proteínas adaptadoras de transducción de la señal. [408] Este polisacaropéptido induce la producción de muchas citoquinas de efecto pleiotrópico, aunque predominan las de perfil proinflamatorio, con acciones tanto locales como sistémicas. [341] Varios estudios *in vitro*, usando células leucémicas HL-60 como modelo, han demostrado las propiedades antitumorales del PSP, que es capaz de reducir la proliferación celular, interrumpir el ciclo celular e inducir la apoptosis. [133, 341, 470] Estudios *in vitro* con macrófagos de ratón mostraron que el PSK de *Trametes versicolor* estimula la producción de IL-6 y TNF-α a través de la activación del receptor TLR4, [312] así como la producción de inmunoglobulina M en una línea celular de linfoma humano. [240] Como las interleucinas o los interferones, el PSK [92] y el PSP [347] son inmunoestimuladores no específicos, es decir, que aumentan la respuesta inmune natural sin dirigirla contra ningún antígeno tumoral específico. Otros hongos también parecen activar rutas intracelulares similares. Así, los extractos polisacáridos de *Ganoderma lucidum* incrementan la actividad fagocítica de neutrófilos humanos en cultivo a través de rutas dependientes de la proteína quinasa C (PKC) y la MAPK. [138] En resumen, una vez que los compuestos fúngicos se unen a sus receptores específicos en la membrana celular, se activan diversas vías intracelulares que eventualmente inducen la activación del NF-κB. Esto a su vez conlleva la estimulación de citocinas que provocan el fortalecimiento de las respuestas inmunes y ayudará en la batalla contra tumores y agentes patógenos. [351]

Parece haber un consenso general de que los efectos moduladores inmunitarios reportados de los β-glucanos de hongos y levaduras

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dependen de la dectina-1, aunque también otros receptores podrían jugar un papel. Los receptores alternativos involucrados pueden ser TLR2 y TLR6, el CR3, los receptores del secuestrador o la lactosilceramida. El receptor dectin-1 (en humanos también llamado receptor de β-glucano, βGR) se expresa altamente en células inmunes, tales como células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, monocitos y algunas células T y en humanos también en células B. Además, las células intestinales pueden expresar dectina-1 en cantidades más bajas, aunque esta expresión es cuestión de debate. [50, 71, 209, 226, 253, 316, 401] En el intestino, los β-glucanos administrados por vía oral son capturados por diversas células en las placas de Peyer , el tejido linfático que recubre las mucosas y el intestino. [241] En estudios en líneas celulares se ha visto que determinados receptores de estas células del epitelio intestinal facilitan el transporte de los β-glucanos hacia el bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea, donde interactúan con los macrófagos para activar la función inmune. [50]

En resumen, los efectos antitumorales de los β-glucanos *in vivo* están asociados a una inducción de la respuesta antitumoral de los linfocitos T a través de la activación de la ruta de la dectina-1, a un incremento de la infiltración de linfocitos T en el tumor, y a una disminución de la inmunosupresión causada por el tumor. [241]

Se ha propuesto un mecanismo en dos etapas para explicar las propiedades anticancerígenas de los β-glucanos. Una primera etapa estaría mediada por la activación de macrófagos y células dendríticas (DC), cuando los β-glucanos se unen a los receptores TLR de estos tipos celulares. Los β-glucanos son fragmentados en los endosomas celulares, para luego ser liberados en los nódulos linfáticos, la médula espinal y el bazo. La segunda estaría mediada por granulocitos y células NK que expresan el receptor CR3 en su superficie. Los fragmentos de β-glucanos liberados por los macrófagos son reconocidos por los receptores CR3, lo que activa las rutas intracelulares que conducen a la liberación de citoquinas estimuladoras de la respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto, la actividad antitumoral de los β-glucanos estaría generada por la cooperación coordinada entre la respuesta inmune innata y la adaptativa [341, 418]. En este sentido, el complejo proteico inflamasoma

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

es esencial en la activación de la inmunidad tanto innata como adaptativa. [82] En células THP-1 (una línea leucémica de monocitos humanos) el extracto PSK de *Trametes versicolor* es capaz de activar el complejo inflamasoma a través de mecanismos dependientes de la IL-1β. En ratones C57BL/6, el incremento en la IL-1β depende del receptor TLR2 y de la criopirina, uno de los componentes del complejo inflamasoma. [451]

Los efectos terapéuticos de los hongos se producen también a través de su capacidad para estimular la producción de citoquinas. De hecho, se ha demostrado que diferentes especies de hongos modulan la producción de citoquinas, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [consultar Guggenheim et al., 2014 para una revisión sobre los efectos moduladores sobre las citoquinas de distintas especies de hongos medicinales]. [109] Por ejemplo, extractos acuosos de *Agaricus blazei* Murrill indujeron la secreción de TNF-α, IL-8 y óxido nítrico (ON) en macrófagos de rata en cultivo. [366] Un extracto heteropolisacárido de *Lentinula edodes* estimuló la producción de ON, IL-6 y TNF-α en células RAW 264.7 (macrófagos de ratón) en cultivo. [446] Las citocinas son proteínas pequeñas y solubles que actúan como mediadores intracelulares en una respuesta inmune. [109, 253] Cada conjunto de citoquinas responde a diferentes situaciones. Las citoquinas involucradas en diferentes tipos de respuestas se definen como patrones de citoquinas. El patrón de citoquinas asociado a una estimulación de la respuesta inmune celular al cáncer tiene a IFN-γ, IL-12 y TNF-α como citoquinas dominantes. Por lo tanto, las terapias, que incluyan el uso de hongos que aumentan este patrón de citoquinas serán beneficiosas para los pacientes con cáncer. [109] Otras vías de citoquinas están asociadas con alergias y asma (que involucran a las citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 y algunas veces IL-10) o tienen propiedades proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α). Las diferentes vías de citoquinas se modulan entre sí, con lo que las citoquinas proinflamatorias pueden contribuir a los síntomas de inflamación asociados al cáncer. Muchos síntomas relacionados con la enfermedad (malestar, ansiedad y hostilidad) son el resultado de la activación de las rutas de estas citoquinas. Por ejemplo, se ha descrito que la radioterapia aumenta la IL-1, la IL-6 y el TNF-α. [109]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En definitiva, la principal acción antitumoral que ejercen los polisacáridos de los hongos medicinales sería indirecta, a través de la estimulación del sistema inmune. Sin embargo, los efectos directos sobre las células tumorales no deben ser excluidos. [398] Se ha descrito que el polisacárido K (PSK) de *Trametes versicolor* alcanza el tejido tumoral en su forma activa y muestra efecto antitumoral en un modelo de fibrosarcoma de ratón. [132] La melanoidina aislada del PSK mostró efectos inhibidores directos del crecimiento tumoral en células HCT-15, una línea de células de cáncer de colon humano. [170] La inducción de apoptosis por polisacáridos de hongos como *Agaricus blazei* Murrill, [434, 464] *Trametes versicolor*, [125, 404] *Ganoderma lucidum* [58] o *Grifola frondosa* [73] podría estar relacionada con los efectos positivos observados en pacientes con cáncer. [5, 83, 99, 184] Por ejemplo, se ha descrito que el extracto de *Trametes versicolor* induce la apoptosis *in vitro* a través de la modulación de la expresión de las proteínas p53 y Bcl-2 [127] y del incremento en la producción de citoquinas activadoras de células Th1. [128] El polisacárido PSP de *Trametes versicolor* es capaz de inhibir la angiogénesis tumoral *in vivo* en un modelo de ratón mediante la inhibición de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). [129] Similares efectos se han descrito para un extracto rico en polisacáridos de bajo peso molecular de *Agaricus blazei* Murrill [275] y de un extracto etílico de *Ganoderma lucidum*. [365] En modelos murinos de cáncer inducido (ratas Walker-256), el tratamiento con extractos *Agaricus blazei* Murrill durante 14 días redujo significativamente el tamaño de los tumores y mejoró los síntomas de caquexia (pérdida de peso corporal, masa muscular y debilidad, que se puede presentar en los pacientes con cáncer u otras enfermedades crónicas). Estos efectos beneficiosos podrían estar relacionados, al menos en parte, con la actividad antioxidante del hongo. [168] En cultivos celulares de células HT-29, una línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon, un extracto soluble en agua y rico en glucanos del cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* tuvo efectos antiproliferativos y proapoptóticos. [198] Los extractos etílicos de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma sinense* mostraron también efectos antiproliferativos y apoptóticos sobre distintas líneas celulares cancerígenas. [223] Varios estudios han asociado el efecto

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inhibidor del crecimiento de células tumorales humanas con una inhibición de la actividad de la telomerasa de estas células. Por ejemplo, el extracto de *Ganoderma lucidum* inhibe la actividad de la telomerasa en células MCF-7, una línea celular de cáncer de mama, [104] y en células HUC-PC, una línea premaligna de cáncer urotelial. [482] Extracto de *Hericium erinaceus* induce la apoptosis en células de hepatocarcinoma humano a través de mecanismos que implican la activación de la JNK y la inhibición del NF-κB. [202]

Es necesario tener en cuenta que, en la actualidad, la literatura es heterogénea y aún no permite afirmar con rotundidad generalizaciones estructura-función en los efectos terapéuticos de los hongos medicinales. [320]

Además de los polisacáridos, otras sustancias presentes en los hongos medicinales tienen también acciones terapéuticas. Así, los triterpenos retardan el ciclo celular e inducen la apoptosis y la autofagia mediante la inhibición de las vías de señalización de distintas proteínas quinasas: ciclina D1, quinona oxidorreductasa 1, glutatión S-transferasa P1, ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), AMPK (5´ AMP-*activated protein kinases*), FAK (*focal adhesion kinase*) y AKT (*serine/threonine-protein kinase*), así como mediante la activación de caspasas y proteínas Bax, p53 y p21. Además, la regulación a la baja del factor de transcripción NF-κB inhibe la migración y la invasión celular y suprime la inflamación. [66, 137, 435, 450] El ácido ganodérico de *Ganoderma lucidum* inhibe las rutas de señalización intracelular de las células tumorales, principalmente mediante la inhibición de la proteína de traslocación nuclear NF-κB y la activación de los procesos de apoptosis, adhesión celular, proliferación y migración. [103] El extracto metílico de *Trametes versicolor*, rico en terpeniodes y polifenoles, tiene efectos antiproliferativos y citotóxicos *in vitro* en células B16 de melanoma de ratón, así como efectos antitumorales in vivo en ratones gracias a la estimulación de macrófagos. [113] En 2004, Kimura y colaboradores describieron otro principio contenido en *Agaricus blazei* Murrill con significativas propiedades antiangiogénicas y antimetastásicas: el piroglutamato sódico. [179] La proteína recombinante (proteína fúngica inmunomoduladora, FIP)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

rLz-8 de *Ganoderma lucidum* disminuye la viabilidad de células de cáncer gástrico humano, [214] presumiblemente a través de un mecanismo dependiente de la IL-2. [19]

Aunque menos investigada que las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales, los hongos medicinales también han mostrado tener capacidades terapéuticas frente a los virus. [219] Los efectos antivirales directos de los hongos están probablemente causados por el bloqueo, por parte de pequeñas moléculas como los triterpenos, de la síntesis de ARN y ADN. [37, 219, 311] Por ejemplo, el ácido ganodérico, un triterpeno extraído de *Ganoderma lucidum*, es capaz de inhibir la replicación del virus de la hepatitis B [213] y del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) [85] *in vitro*. En un ensayo clínico aleatorizado se investigó la eficacia de tres hongos medicinales, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* y *Laetiporus sulphureus* en la desaparición de varias cepas del virus del papiloma humano (VPH). Los autores describieron una reducción del virus del 88 %. [80] Una lacasa (enzima oxidasa) aislada del hongo *Hericium coralloides* mostró actividad significativa contra la transcriptasa inversa del virus HIV-1. [494] A pesar de estos resultados prometedores, las propiedades antivirales de los hongos, así como sus mecanismos de acción, requieren de posteriores investigaciones que mejoren el conocimiento de dichos mecanismos y propiedades.

Diversos extractos de hongos medicinales han demostrado sus propiedades antiinflamatorias en modelos animales, con actividades comparables a la de los analgésicos comerciales, [219] por lo general gracias a la modulación de ciertas citoquinas e isoleucinas, entre otros factores. [164, 337] Por ejemplo, la fracción de ácidos grasos extraída del hongo *Grifola frondosa*, que contiene ergosterol entre otros compuestos, presenta capacidad inhibitoria de las enzimas COX-1 y COX-2 (ciclooxigenasa) así como actividad antioxidante. [478] Estas propiedades antioxidantes (incremento de la actividad y los niveles de expresión de la SOD) también se ha observado en macrófagos de ratón en cultivo tratados con el PSK de *Trametes versicolor*, [296] o con extractos polisacáridos de *Ganoderma lucidum*, [463] y en modelos murinos de cáncer *in vivo*. [421] El peróxido de ergosterol aislado de *Grifola frondosa* mostró efectos protectores frente a la toxicidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inducida por lipopolisacáridos en una línea celular leucémica mediante la inhibición de la producción de IL-1β, IL-6, TNF-α y NF-κB. [440] El elevado contenido en triterpenos le confiere a *Ganoderma lucidum* una acción antiinflamatoria comparable a la de la hidrocortisona, aunque sin efectos secundarios. [249] Triterpenos y esteroides aislados de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma tsugae* mostraron potentes capacidades antiinflamatorias al inhibir la secreción de mediadores químicos liberados por mastocitos, neutrófilos y macrófagos en cultivo. [182, 328] Diversos autores han demostrado que el extracto de *Ganoderma lucidum* inhibe la ruta de señalización intracelular del complejo proteico NF-κB, que es un factor fundamental en la inflamación crónica y el desarrollo del cáncer. [156, 158, 159, 337] El ácido ganodérico, un triterpeno aislado de *Ganoderma lucidum*, inhibió la producción de TNF-α y otras citoquinas proinflamatorias mediante el bloqueo de la ruta NF-κB, en células en cultivo de mucosa procedente de niños con enfermedad de Crohn. [220]

Los efectos terapéuticos de los principios activos encontrados en los hongos medicinales pueden incrementarse con la ingesta conjunta de sustancias potenciadoras. Así, diversos estudios experimentales in vitro han demostrado que la administración de determinadas sustancias como la vitamina K y la vitamina C, junto con preparados de hongos, parecen potenciar la actividad antitumoral de estos últimos. [105, 189] En un estudio realizado en China en una población de mujeres, una dieta rica en setas se asoció con una disminución de la incidencia de cáncer de mama. La ingesta combinada de setas con té verde produjo una disminución adicional. [474] En la MTC es común la combinación de preparados de setas con otras sustancias, como las decocciones de *Ganoderma lucidum* con raíz de astrágalo. [105] Algunas iniciativas privadas, como el producto Mico-Onco® de Hifas da Terra, están promoviendo la combinación de diferentes especies de hongos para potenciar las sinergias moleculares y, por tanto, los efectos terapéuticos. Los resultados positivos en este sentido que se tienen hasta la fecha proceden de estudios preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo* con modelos animales, [485] por lo que, hoy en día, se carece de ensayos clínicos publicados que demuestren la superioridad de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

combinación de varios hongos frente a la utilización de un solo hongo. [105] Este tipo de ensayos clínicos serían esenciales para conseguir una evidencia clínica clara sobre la eficacia de estos tratamientos combinados.

1.1.4.1 Efectos en la salud emocional

Debido a la gran variedad de principios activos que se encuentran en los hongos medicinales, estos pueden suponer una ayuda importante en el campo de la salud emocional, sobre todo en la gestión del paciente oncológico. El cáncer produce un fuerte impacto biológico, psicológico y social. [31, 130, 329] El elevado número de personas que sufren esta enfermedad ha hecho que se convierta en un gran problema de nuestra sociedad, ya que supone cambios importantes en la vida social, profesional, familiar y personal del enfermo. El diagnóstico de cáncer a menudo conlleva alteraciones psicológicas, sobre todo relacionadas con trastornos de ansiedad y depresión. [39] Algunos estudios señalan que el tratamiento efectivo de los factores psicológicos alterados produce una mejoría, no sólo en los aspectos psicológicos, sino también en la calidad de vida de las personas con cáncer, y muy probablemente, también en el propio estado patognomónico. [10, 18, 23, 238, 267] Según estos trabajos, la depresión puede afectar negativamente a la percepción global de la calidad de vida, ya que ésta no es más que la integración cognitiva del estatus funcional y sintomatológico de dichos pacientes en un momento determinado.

Por estas razones los hongos medicinales pueden desarrollar un papel principal en la integración a los tratamientos convencionales dado que son muy activos a nivel de la gestión de emociones. El apoyo que se puede observar en este campo con los hongos medicinales, específicamente el *reishi* (*Ganoderma lucidum*) es una acción hipnótica y sedativa. Los triterpenos presentes en el *reishi* son los responsables del efecto calmante sobre el sistema nervioso. El extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* presenta efectos hipnóticos y acciones sedantes sobre el sistema nervioso central en animales, aumentando en consecuencia el tiempo de sueño y disminuyendo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

marcadamente la actividad motora espontánea, sin producir ningún tipo de adicción. [465] De hecho, este hongo ha sido utilizado tradicionalmente como factor promotor del sueño, así como en el tratamiento de neurosis causadas por estrés ambiental. [166] En grupos experimentales de tratamiento de la fatiga relacionada con cáncer de mama se probó la eficacia de esporas de *Ganoderma lucidum*. Los resultados concluyeron que el grupo experimental mostraba una mejoría significativa en el bienestar y la fatiga tras la intervención, así como menos ansiedad, depresión y una mejoría en la calidad de vida. [479]

En definitiva, muchos estudios avalan el uso de hongos medicinales en medicina integrativa como tratamientos coadyuvantes para mejorar la calidad de vida y la salud emocional del paciente oncológico.

1.1.4.2 Efectos adversos y contraindicaciones

En cuanto a los efectos adversos (EA), efectos secundarios o contraindicaciones atribuibles al uso de hongos medicinales, no existen muchos estudios que profundicen en este aspecto. Por ejemplo, estudios en ratas no observaron ningún EA digno de mención, mortalidad o signos de toxicidad tras la ingesta de *Trametes versicolor*, tanto en ensayo de toxicidad aguda (una sola dosis) como de toxicidad crónica (ingesta diaria durante 28 días). [24, 131] La ingesta oral del PSP de *Trametes versicolor* no tuvo tampoco ningún efecto tóxico obvio en ratones. [193] La administración intraperitoneal del PSP en estos animales produce una inhibición transitoria de la enzima hepática glutatión reductasa sin mayores consecuencias. [456] En un modelo de dolor en ratones, la administración de PSP produce hiperalgesia a través de la estimulación de factores inflamatorios, como prostaglandina E2, TNF-α o IL-1β, si bien en otro modelo murino el efecto fue analgésico. [53]

Los efectos secundarios van a depender del hongo empleado y de la forma de administración, aunque en general los hongos medicinales son bien tolerados y sin que se reporten en los ensayos clínicos EA graves debidos a su ingesta. [105, 320] Por ejemplo, un metaanálisis de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ensayos clínicos sobre la eficacia de *Trametes versicolor* en pacientes oncológicos no halló diferencias significativas en la incidencia de EA entre el grupo control (quimioterapia) y el grupo experimental (quimioterapia más hongo). [83] Un ensayo clínico en fase I suplementó con diversas dosis de *Agaricus blazei* Murrill a 78 pacientes de varios tipos de cáncer en remisión durante 6 meses. No se registraron efectos adversos (EA) relacionados con la ingesta del hongo, demostrando que su consumo es en general seguro. [285] Como caso puntual, se ha reportado el caso de un paciente vietnamita, que consumía *Ophiocordyceps sinensis* diariamente como parte de su dieta tradicional, que presentó sangrado prolongado tras cirugía dental. [115]

En realidad, la única contraindicación importante para tener en cuenta durante la administración de hongos medicinales es el caso de reacción alérgica a las setas por parte del paciente. [105] Así, por ejemplo, se ha descrito la aparición de dermatitis como reacción al lentinano, un polisacárido componente de las paredes celulares del hongo *shiitake* (*Lentinula edodes*). Este efecto toxicodérmico del shiitake es muy raro y se resuelve simplemente con la interrupción de la ingesta del hongo durante aproximadamente 13 días. [271] Por precaución, tampoco se recomienda el uso de hongos medicinales en pacientes embarazadas o durante la lactancia, pues no existen estudios adecuados de seguridad en estos casos. Pacientes diabéticos deben extremar las precauciones por el posible efecto hipoglucemiante de algunos hongos. [112, 311] Tampoco se recomienda la administración de hongos medicinales en pacientes que toman inmunosupresores por enfermedades autoinmunes debido al efecto inmunoestimulante de estos hongos. [105, 311] La administración conjunta con quimioterapia o radioterapia tampoco parece dar lugar a EA o interacciones indeseadas. [105, 109]

1.1.5 Los hongos como prebióticos

La microbiota humana es el término aplicado al universo de microbios que viven en diferentes hábitats de nuestro cuerpo, principalmente el intestino, la piel, la vagina y la boca, pero también en la nariz, la conjuntiva, la faringe y la uretra, entre otros. [89, 337] El

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tracto digestivo contiene 10 veces más bacterias (10^{14}) que células constituyen todo el cuerpo humano. Esta flora intestinal contiene 100 veces más genes en conjunto que el genoma humano y comprende entre 1.000 y 1.500 especies bacterianas de las que un mismo individuo puede tener al menos 160. [89, 93, 303, 315, 337] Esta microbiota intestinal representa una compleja, dinámica y diversa colección de microorganismos que establecen con el huésped humano una relación simbiótica de beneficio mutuo a largo plazo. [89, 93, 107, 350]

Diversos estudios han demostrado que las alteraciones cualitativas y cuantitativas en la composición de la microbiota del tracto digestivo (un proceso conocido como disbiosis) contribuyen a la aparición del cáncer gastrointestinal, entre otras enfermedades. [337] Estos tipos de cáncer se consideran enfermedades multifactoriales, resultado de complejas relaciones entre factores genéticos, epigenéticos y medioambientales (lo que incluye el área geográfica y el estatus socioeconómico, la dieta, el estilo de vida, etc.). Estos factores, a su vez, interaccionan con la flora intestinal, alterando sus funciones, lo que influye en los procesos de génesis y crecimiento tumorales. [350, 476]
La relación entre cáncer y microorganismos está bien establecida. Se calcula que hasta un 20 % de los cánceres a nivel mundial están influenciados por microorganismos. [337] Existe una creciente evidencia de la importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo del cáncer, así como de la respuesta a los tratamientos de quimioterapia e inmunoterapia en enfermos oncológicos, mediante la modulación de la eficacia o la toxicidad de dichos tratamientos. [403] En este sentido, se ha documentado que la microbiota intestinal afecta a la carcinogénesis a través de la liberación de moléculas carcinogénicas, como las genotoxinas, y a través de la producción de metabolitos estimuladores de tumores, como aminas, fenoles y nitrosaminas. [337, 345] Por ejemplo, diversos estudios han sugerido que la exposición repetida a antibióticos de amplio espectro induce cambios en la microbiota intestinal, lo que a su vez afecta a los metabolismos de hormonas como los estrógenos, que juegan un papel esencial en el desarrollo del cáncer de mama. [337] Por lo tanto, la manipulación beneficiosa de la flora gastrointestinal puede tener efectos preventivos y terapéuticos para estos tipos de cáncer. Así, en un estudio con ratones, los autores

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

encontraron que la restauración de la microbiota intestinal promovía la protección del dolor inducido por la quimioterapia (una condición que afecta al 30 % de los pacientes que se someten a quimioterapia). [354]

Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que estimula de forma selectiva y beneficiosa el desarrollo o la actividad de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal. [141, 263] Los prebióticos pueden ser una manera adecuada de conseguir los efectos beneficiosos arriba descritos, pues su importancia en el desarrollo del cáncer colorrectal ha sido demostrada en diversos estudios, si bien los mecanismos de acción de estos prebióticos están todavía por dilucidar. [330, 350]

Aunque los hongos y las setas son alimentos perfectamente digeribles, con propiedades nutricionales y terapéuticas, también es importante tener en cuenta su posible función como prebióticos en la flora gastrointestinal. Los hongos, sobre todo los basidiomicetos, contienen un elevado número de sustancias bioactivas, tales como polisacáridos, glicoproteínas, triterpenos y antibióticos. [6, 417] Como se ha descrito previamente, los más estudiados han sido los polisacáridos (β-glucanos). Los enlaces β-glucosídicos de los polisacáridos fúngicos a menudo son resistentes a los enzimas pancreáticos, con los que se mantienen en buena medida como sustancias no digeribles dentro del tracto gastrointestinal humano. Este carácter indigestible de los polisacáridos les hace concordar con la definición de prebiótico. [6] Los cambios en el tipo y la cantidad de carbohidratos no digeribles en la dieta influyen en la formación de productos metabólicos y en la población bacteriana detectada en las heces. [93] Así, se ha descrito que extractos de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii* son capaces de estimular el crecimiento de bacterias probióticas, como *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. [374] Polisacáridos de *Hericium erinaceus* estimulan el crecimiento de *Lactobacillus plantarum in vitro*. [452] El extracto de *Trametes versicolor* es también capaz de modificar la composición de la microbiota fecal *in vitro*. [466] El extracto de *Hericium erinaceus* alivia los síntomas en ratas con enfermedad inflamatoria intestinal mediante la regulación de la microbiota intestinal. [79] En un modelo en ratones de enfermedad inflamatoria intestinal, una proteína aislada de *Hericium erinaceus* también ha

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mostrado capacidades prebióticas en ratones tratados con altas dosis de ciclofosfamida (un agente quimioterapéutico). [78] En un modelo xenográfico de cáncer colorrectal en ratones, la administración de un extracto proteico de *Hericium erinaceus* junto con 5-fluorouracilo (5-Fu; tratamiento quimioterápico) redujo el crecimiento tumoral y la expresión de marcadores inflamatorios, tales como IFN, IL y TNFα. Además, el extracto fúngico mejoró la disbiosis inducida por el 5-Fu, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas (*Parabacteroides*, *Flavobacteriaceae*, *Christensenellaceae*, *Anoxybacillus*, *Aggregatibacter*, *Comamonadaceae*, *Planococcaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Aerococcaceae* y *Bilophila*), mientras que estimuló el crecimiento de bacterias probióticas (*Bifidobacterium*, *Gemellales*, *Blautia*, *Sutterella*, *Anaerostipes*, *Roseburia*, *Lachnobacterium*, *Lactobacillus* y *Desulfovibrio*). [403] En este estudio, el extracto demostró, por lo tanto, un doble efecto beneficioso. Por un lado, aumentó la eficacia antitumoral del 5-Fu, mientras que, por otro, mejoró la microbiota intestinal, la respuesta inflamatoria inmune y la homeostasis. [403]

De hecho, la actividad prebiótica de los hongos podría explicar la plétora de efectos beneficiosos para la salud, así como el hecho de que en la MTC hayan sido utilizados para una amplia variedad de enfermedades. [466]

En definitiva, existen grandes ventajas en incorporar los hongos y sus extractos a la dieta normal, ya que además de las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de los polisacáridos fúngicos, tenemos que añadir su papel beneficioso como prebióticos. Se trata, por lo tanto, de una estrategia emergente de gestión dietética con extractos fúngicos de los enfermos oncológicos, con el fin de manipular la microbiota intestinal y así mejorar los resultados terapéuticos de los tratamientos anticancerígenos o, al menos, aumentar la calidad de vida del paciente durante dichos tratamientos. No obstante, los datos son todavía escasos y es necesario realizar investigaciones más exhaustivas para caracterizar el papel prebiótico de los hongos y las setas. Se requieren ensayos clínicos bien diseñados, aleatorizados, en doble ciego y controlados mediante placebo en el uso de prebióticos (y probióticos) para dilucidar por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

completo las interacciones de la flora intestinal con factores genéticos, epigenéticos, inmunológicos, dietéticos, etc. [350]

La empresa Hifas da Terra identificó estas necesidades y en 2015 activó una estrategia de investigación y desarrollo (I+D) orientada a la realización de ensayos clínicos en pacientes con cáncer tratados, como coadyuvante, con una nueva formulación específica basada en extractos de hongos medicinales: Mico-Digest®. Nacieron así los proyectos MicroMarker y CRC-Folfox, en los que se evaluará la relación existente entre la progresión del cáncer colorrectal, la modulación de la microbiota intestinal y el desarrollo de neuropatías periféricas.

1.2 LOS HONGOS EN ONCOLOGÍA INTEGRATIVA

El cáncer es la enfermedad mortal número uno en el mundo actual. Según la OMS, el cáncer es ya la segunda causa de muerte a nivel global, y se estima que fue responsable de la muerte de 9,6 millones en 2018, lo que supone que 1 de cada 6 muertes en el mundo es causada por algún tipo de cáncer. [38, 325, 351, 425, 427] En el año 2018 (últimos datos disponibles) se diagnosticaron 18,1 millones de nuevos casos de cáncer, y las estimaciones indican que el número aumentará hasta los casi 30 millones en 2040. [38, 351, 361, 427] En España, la predicción para 2020 estimó la incidencia en más de 277.000 casos anuales. [349]

Las principales modalidades de tratamiento del cáncer hasta la fecha son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia. [62, 91, 102] Sin embargo, muchos son los efectos secundarios que surgen de la quimioterapia o la radioterapia. Estos efectos secundarios pueden ser subjetivos, lo que incluye náusea, vómitos, llagas en la boca, diarrea, pérdida del apetito, pérdida de peso, del cabello, malestar, fatiga; o pueden ser efectos secundarios objetivos (medibles mediante pruebas de laboratorio), como anemia, trombocitopenia, leucopenia, hepatotoxicidad, supresión de la médula ósea e inmunodepresión en general. [83, 243] Además, estas terapias sólo tienen éxito cuando el cáncer se detecta en una etapa temprana o bien

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se limita a ciertos tipos de cáncer, como la leucemia. Debido a los medios de diagnóstico limitados para detectar estas etapas tempranas del cáncer, o incluso estados precarcinoma, la mayoría de los pacientes son diagnosticados cuando ya el cáncer está en una etapa avanzada o con una extensa infiltración local. Para los tumores avanzados, en particular aquellos desarrollados a partir de tejidos epiteliales como el pulmón, el colon, la mama, la próstata o el páncreas, las terapias convencionales tienen un éxito relativo. La quimioterapia puede fallar también debido a resistencia a los fármacos antitumorales o a la toxicidad de los mismo, lo que limita la dosis utilizada. [62, 400]

Estos hechos revelan la urgente necesidad de encontrar nuevos enfoques terapéuticos más eficaces y menos tóxicos. [299, 325] La búsqueda exhaustiva de nuevas formas de tratar y prevenir el cáncer ha llevado al descubrimiento de nuevos fármacos basados en productos naturales o análogos inspirados en ellos. Así, se han investigado algunas matrices naturales como fuentes de agentes contra el cáncer, con resultados alentadores. Los hongos son ejemplos de estas matrices naturales que parecen tener una amplia gama de beneficios potenciales para la salud, tanto como alimentos funcionales, como nutracéuticos, y como fuente de compuestos para el desarrollo de nuevos medicamentos. [176, 269, 289, 400] Además de moléculas de bajo peso molecular, diversas macromoléculas derivadas de hongos han demostrado su potencial como anticancerígenos, incluyendo polisacáridos, polisacáridos unidos a proteínas y ácidos grasos. [325] Aunque los hongos y sus extractos han mostrado tener una fuerte actividad citotóxica directa contra las células tumorales, [331, 325] su mayor efecto parece ser debido a sus propiedades inmunomoduladoras. [109, 236, 367] A la unión del tratamiento convencional con naturopatía en pacientes oncológicos se le denomina **oncología integrativa**. [368]

Muchos estudios han demostrado que los polisacáridos de hongos basidiomicetos (filo más evolucionado y conocido del reino Fungi, que incluye a los hongos productores de las clásicas setas) tienen efectos terapéuticos altamente beneficiosos que incluyen: 1) prevenir la oncogénesis, 2) actividad antitumoral directa en diversos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tipos de tumores, 3) actividad inmunosinérgica en combinación con quimioterapia, y 4) efectos preventivos frente a la metástasis tumoral. [57, 109, 183, 200, 268, 270, 293] Sin embargo, todavía no se entiende por completo si sus amplios efectos bioactivos son causados por un solo componente o si son el resultado de una acción aditiva o sinérgica de varios compuestos fúngicos. [47, 48, 62, 289, 473] De hecho, el uso de productos botánicos en oncología se basa en la hipótesis sinérgica: la combinación de diferentes compuestos activos bien seleccionados de una o más especies botánicas tendrá un efecto antineoplásico más acusado. [367] En este sentido, se ha reportado que la ingesta de cuatro o más agentes CAM, incluido *Ophiocordyceps sinensis*, prolonga la supervivencia de pacientes con carcinoma hepático. [276]

Diversas especies de hongos han mostrado tener actividades anticancerígenas. [269] Por ejemplo, pacientes con cáncer esofágico, gástrico y pulmonar que han sufrido radio o quimioterapia presentan una mejora de los síntomas y una mejor capacidad inmune tras la administración del PSP aislado de *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor*). [270] Diversos ensayos clínicos en Fase I, II y III han estudiado los compuestos bioactivos aislados a partir de hongos medicinales en el tratamiento de enfermos oncológicos. [353] Compuestos presentes en *Grifola frondosa* inhiben el crecimiento en múltiples líneas celulares de cáncer gástrico promoviendo la apoptosis [360] y además son capaces de reducir el número de nódulos metastásicos en pulmón de modelos animales. [243] Extractos de *Cordyceps sp.*, *Ganoderma sp.* y *Trametes versicolor*, además de otros hongos y plantas medicinales, han demostrado tener propiedades apoptóticas y anticancerígenas mediadas por mecanismos mitocondriales. [430] Igualmente, compuestos de *Ganoderma lucidum* inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer gástrico [289] y cáncer de colon, [149] e incluso inducen mejoras en el sistema inmune de pacientes de cáncer colorrectal, particularmente en los niveles de linfocitos CD3, CD4, CD8, CD56, actividad de células NK y concentraciones plasmáticas de IL-2, IL-6 e INF-γ. [62] El extracto hidroalcohólico de *Ganoderma lucidum* es capaz de inducir aumentos significativos en la actividad de las células NK, así como en las concentraciones plasmáticas de las citoquinas IL-2, IL-6 e IFN-γ en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pacientes de cáncer. [100] Extractos de este hongo inhiben el crecimiento de líneas celulares tumorales de leucemia, linfoma y mieloma múltiple, [227, 260] y además antagoniza los efectos negativos producidos sobre linfocitos en contacto con líneas celulares de melanoma. [372] Un extracto hídrico rico en polisacáridos de *Pleurotus ostreatus* presentó actividad citotóxica dependiente de la dosis en células HeLa *in vitro*. [384] En un ensayo clínico en fase II, la ingesta de 3 mg/kg dos veces al día durante 12 semanas de extracto de *maitake* (*Grifola frondosa*) provocó un incremento de la función de neutrófilos y monocitos en pacientes con síndrome mielodisplásico. [424]

Las células tumorales producen factores como la IL-10, el TGF-β1 y el VEGF que suprimen la función de las células inmunitarias o inducen la apoptosis de las mismas. [370] Uno de los objetivos más importantes de la inmunoterapia de tumores es antagonizar esta supresión en las células inmunitarias. El polisacárido P (PSP) aislado de *Trametes versicolor* aumenta la expresión de citoquinas y quimioquinas como el TNF-α, la IL-1β, la IL-6, histamina y prostaglandina E, además de incrementar la infiltración de células T en los tumores y mejorar los efectos secundarios de la quimioterapia. [57, 71, 307, 314] Los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* han mostrado esta capacidad supresora *in vitro*. [370] Los efectos terapéuticos de *Ganoderma lucidum* en el tratamiento de pacientes oncológicos y sus propiedades antiinflamatorias se han asociado con sus efectos inmunomoduladores y coadyuvantes. [54, 99, 100] Se ha descrito que el tratamiento de pacientes de cáncer colorrectal en estadio III con PSK como tratamiento coadyuvante a la quimioterapia con tegafur/uracilo incrementa la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes. [286] El mismo polisacárido también incrementó la supervivencia en pacientes con cáncer de estómago tratados con quimioterapia. [176] Los resultados hasta la fecha señalan los beneficios de los hongos medicinales debidos principalmente a su riqueza en polisacáridos (como los β-glucanos), que son los principales principios activos de las propiedades inmunoestimuladoras y antitumorales de los hongos. [47, 48, 62, 289, 299, 473]

Por lo tanto, los hongos medicinales surgen como una terapia novedosa que puede mejorar el tratamiento del cáncer y la supervivencia de los pacientes oncológicos. Los oncólogos y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

farmacólogos se han dado cuenta de que las propiedades antitumorales, citotóxicas e inmunomoduladoras de los hongos y sus principios activos, junto con su baja toxicidad, los convierten en unos excelentes candidatos para paliar los severos efectos adversos de la quimioterapia y la radioterapia convencionales. [218, 475] El alivio de los efectos secundarios como la leucopenia, trombocitopenia, vómito, etc., causados por la quimioterapia es probablemente uno de los mayores papeles que pueden jugar los hongos medicinales en su papel de coadyuvantes en los tratamientos oncológicos. Aunque algunos extractos de hongos muestran efectos citotóxicos sobre células tumorales *in vitro*, su principal función es como MRB (modificador de la respuesta biológica), principalmente a través de sus propiedades inmunoreguladoras. Por ejemplo, la desregulación de los linfocitos Th1 y Th2 se ha descrito como una de las causas importantes en el fracaso de la quimioterapia. Los proteoglicanos de los hongos, como el lentinano de *Lentinula edodes*, presentan un gran potencial para paliar este fracaso, gracias a sus propiedades inmunopotenciadoras, su baja toxicidad y su bajo coste. [475]

De hecho, ya existe un considerable número de estudios que avalan el uso de los hongos medicinales como suplemento para contrarrestar los efectos secundarios de los tratamientos oncológicos, [299] e incluso para incrementar la eficacia de estos. [109] Por ejemplo, en células de hepatocarcinoma humano en cultivo, la adición de un extracto de *Agaricus blazei* Murrill rico en β-glucanos incrementa la apoptosis inducida por doxorrubicina, [201] y la adición de ácido ganodérico extraído de *Ganoderma lucidum* incrementa la quimiosensibilidad de las células al cisplatino. [453] Muchos polisacáridos de hongos, como el lentinano, el esquizofilán, el PSK (krestin) o el PSP (coriolan), la lectina o el ácido ganodérico inhiben eficazmente el crecimiento de tumores trasplantados en modelos murinos y aumentar la tasa de supervivencia. [70, 162, 207, 211, 299, 475] La ingesta de 10 mg/kg al día de PSP retrasa la progresión de la metástasis en perros con hemangiosarcoma. [40] El PSP de *Trametes versicolor* incrementa la capacidad apoptótica y citotóxica de ciertas drogas antileucémicas en células HL-60 en cultivo. [142] Polisacáridos y proteoglicanos aislados de *Agaricus blazei* Murrill han demostrado en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diversos estudios ser principios activos muy útiles en el tratamiento y la prevención del cáncer. [434]

Los hongos afectan a las células madre hematopoyéticas, a los linfocitos, los macrófagos, las células T, las células dendríticas y las células NK. [109, 253] El PSK de *Trametes versicolor* ejerce sus efectos tumorales *in vivo* e *in vitro* a través de diversos mecanismos, incluyendo la activación de las células NK y células T. [422] GLIS, un proteoglicano aislado del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* ha demostrado tener efectos antitumorales en ratones gracias a la estimulación de la respuesta inmune tanto humoral como celular. [472] Estos efectos inmunoestimuladores sobre distintos tipos celulares del sistema inmune proporcionan efecto protector frente a la mielosupresión quimioterapéutica, uno de los efectos más graves de la quimioterapia. [109] Este efecto protector ha sido ya descrito en modelos murinos, en concreto a través de la acción ejercida por los β-glucanos del hongo *maitake* en ratones tratados con cisplatino, un agente quimioterapéutico. [242] El β-glucano aislado de *Ganoderma lucidum* tuvo un efecto protector, aumentando la supervivencia (hasta un 66 %) de ratones sometidos a radioterapia. [305]

En definitiva, los datos preclínicos y clínicos de las últimas dos décadas muestran un sólido efecto de los hongos medicinales y sus extractos en la mejora de la calidad de vida y de la eficacia de la quimio y radioterapia durante los tratamientos oncológicos.

Los hongos y sus extractos pueden utilizarse en oncología integrativa de varias maneras: [367]

- Para prevenir el cáncer y la metástasis en pacientes de alto riesgo.
- Para controlar los efectos secundarios de la terapia convencional contra el cáncer.
- Para mejorar la eficacia y seguridad de los agentes quimioterapéuticos.
- Para contrarrestar el efecto inmunodepresor y prevenir la recaída tras el tratamiento oncológico convencional.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La medicina basada en hechos o medicina basada en pruebas (EBM, del inglés *evidence-based medicine*) que avala la utilización de los hongos en oncología ha aumentado considerablemente en la última década. Muchos investigadores están trabajando para purificar y estudiar los componentes individuales de los hongos y comprender sus efectos sobre la apoptosis, la parada del ciclo celular y la modulación inmunológica. [109, 299] Todas estas investigaciones han permitido pasar de la poyata del laboratorio a la cama del hospital, y nos han ofrecido una visión de los hongos como coadyuvantes muy versátiles en oncología integrativa. Los ensayos clínicos con hongos medicinales como coadyuvantes están todavía en sus primeros pasos, pero los resultados implican posibilidades muy prometedoras.

Sin embargo, si bien los hallazgos inmunológicos son prometedores, en última instancia estos descubrimientos deben aplicarse a los pacientes y a los resultados clínicos, ya que el objetivo final al tratar cualquier paciente oncológico es mejorar su calidad de vida y su supervivencia. [109] Hasta la fecha se han realizado pocos estudios que examinen los resultados inmunológicos de la micoterapia dentro del marco del ensayo clínico, a lo que se añade la dificultad de comparar resultados con métodos de administración muy distintos (oral, inyección) y la gran variedad de extractos y especies de hongos utilizados. [109] Pero este marco es la clave para trasladar de forma efectiva el conocimiento sobre los efectos terapéuticos de los hongos fuera del laboratorio y de los modelos animales hasta las poblaciones humanas, tanto sanas como enfermas. [109]

Es evidente, por lo tanto, la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos integrativos para el tratamiento de pacientes con cáncer. La presente tesis doctoral se centra en determinar y confirmar los efectos antitumorales de los hongos medicinales y sus extractos en el cáncer colorrectal (CCR). Para ello se ensayará *in vitro* la fórmula Mico-Digest 2.0®, desarrollada por Hifas da Terra, tanto en líneas celulares de CCR como en un modelo murino de este tipo de cáncer. Además, se planteará un protocolo para el ensayo como coadyuvante de esta fórmula en el tratamiento oncológico integrativo de pacientes con CCR. **Mico-Digest 2.0®** es un complemento alimenticio que contiene la más alta concentración de sustancias bioactivas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

procedentes de los hongos medicinales ecológicos; *Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Polyporus umbellatus*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Inonotus obliquus y Agaricus blazei* Murrill.

Aunque ya se ha mencionado en cierta medida en las secciones anteriores de este trabajo, en los subepígrafes siguientes se realiza un resumen de los hallazgos hasta la fecha en relación con el uso de la micoterapia en los principales tipos de cáncer, conocidos como «Big Killers».

1.2.1 Cáncer de mama

A nivel global, el cáncer de mama fue el tumor diagnosticado con mayor frecuencia en mujeres en el año 2018 (2,1 millones, el 11,6 % del total de diagnósticos de cáncer), y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (627.000 muertes, el 11,6 % de todos los fallecimientos por cáncer). [38, 332, 427] Se calcula que una de cada 8 mujeres desarrollará cáncer de mama en algún momento de su vida. [337] En España, se diagnosticaron 32.953 pacientes con cáncer de mama en 2019 (un 16,8% del total de cánceres diagnosticados) con una mortalidad de 6.621 pacientes. [349]

Los tratamientos convencionales del cáncer de mama incluyen quimioterapia, radioterapia, terapias hormonales o inmunoterapia. Estos tratamientos están asociados a una amplia variedad de EA asociados, como son mielosupresión, problemas gastrointestinales, alopecia, fatiga, infecciones, toxicidad respiratoria, náusea, insomnio, etc. Todos estos efectos secundarios disminuyen la calidad de vida del paciente. [337] Una de las estrategias que posee la medicina integrativa para paliar estos efectos es la micoterapia. De hecho, diversos estudios apoyan el concepto de que una dieta rica en hongos ayuda a prevenir el cáncer de mama. [429]

Mediante la micoterapia, la manera de afrontar un carcinoma mamario reside, por un lado, en la inmunoterapia, es decir, la capacidad de los extractos de hongos para estimular diferentes tipos celulares del sistema inmune del propio organismo con el fin de dirigir

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer. Además, de manera indirecta diversos extractos de hongos pueden inhibir la angiogénesis o formación de vasos sanguíneos, lo que puede contribuir a comprometer el crecimiento de tumores, así como intervenir a nivel de receptores hormonales presentes en determinados tipos de tumores dificultando o bloqueando estas vías de señalización. Por otro lado, el interés de la micoterapia se extiende también a la actividad citotóxica directa que presentan algunos extractos de hongos sobre diferentes tipos de células tumorales.

Muchos extractos fúngicos han demostrado su capacidad inhibitoria sobre el cáncer de mama, tanto en cultivos celulares como en estudios animales y ensayos clínicos. [429] *Ganoderma lucidum* y *Grifola frondosa* son dos de los hongos medicinales, procedentes de la MTC, que más se han estudiado como producto CAM (medicina complementaria y alternativa) en las pacientes con cáncer de mama. [337] Diversos estudios celulares muestran la capacidad del extracto de *Ganoderma lucidum* de inhibir la expresión del receptor de estrógenos alfa (ERα), así como la activación del mismo por estrógenos en líneas células de cáncer de mama hormono-dependientes y hormono-independientes. [158] Esto es interesante ya que muchos cánceres de mama parecen progresar desde una fase inicial estrógeno-dependiente a otra fase más maligna estrógeno-independiente con potencial metastásico. [339] *Ganoderma lucidum* también inhibe la activación del receptor de estrógeno alfa (ERα) inducida por 17β-estradiol, inhibe la activación de NF-κB inducida por TNF-α, e inhibe la posible interacción entre NF-κB y ERα, resultando en una regulación a la baja de la expresión de c-myc y en la inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama humanas. Estos datos demuestran que *Ganoderma lucidum* contiene compuestos biológicamente activos contra el sistema de señalización mediado por estrógenos en células tumorales. [159] A nivel inmunoterapéutico es útil el extracto de *Trametes versicolor* en los casos en los que las células tumorales son hormono-dependientes, ya que existen estudios que indican que este extracto posee actividad citostática sobre células ER(+). [13] En ratones inoculados con células humanas de cáncer de mama, el tratamiento con extracto acuoso de *Trametes versicolor* como coadyuvante disminuye el crecimiento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tumoral, la proliferación celular y la metástasis. [181] Un suplemento dietético con extractos de *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* y *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*), entre otros componentes, es capaz de inhibir la proliferación celular y la metástasis *in vitro* y en modelos de cáncer de mama en ratón *in vivo*, [160] así como en células de cáncer de próstata *in vitro*. [156] El PSP de *Trametes versicolor* reduce de forma significativa la proliferación celular e incrementa la apoptosis en células de cáncer de mama en cultivo, con los primeros efectos detectables a las 24 horas de tratamiento de los cultivos. [66] El ácido ganodérico extraído de *Ganoderma lucidum* es capaz de inhibir la proliferación celular de células de cáncer de mama (células MCF-7) mediante la interrupción del ciclo celular y la estimulación de la apoptosis. [436] Un extracto de *maitake* (*Grifola frondosa*) induce apoptosis en una línea celular de cáncer de mama a través de la activación del gen BAK-1. [363] Distintos extractos de *Ganoderma lucidum* han sido capaces de inhibir la migración y adhesión celulares mediante la interrupción del ciclo celular y el incremento de la polimerización de actina en células en cultivo de cáncer de vejiga. [227] El PSP de *Trametes versicolor* presentó sinergia al aumentar la citotoxicidad de la doxorrubicina y el etopósido, dos fármacos quimioterapéuticos, en una línea celular de cáncer de mama en cultivo. [402] En un modelo murino de cáncer de mama, la administración oral de una mezcla de *Agaricus blazei* Murrill, *Ophiocordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* y *Lentinula edodes* redujo la metástasis pulmonar, así como los niveles de IL-6, NOS (óxido nítrico sintasa) y COX-2. [332]

En general, los efectos anticancerígenos de los β-glucanos observados en líneas celulares de cáncer de mama se deben a cinco mecanismos moleculares principales: inducción de la apoptosis, bloqueo de la proliferación neoplásica, bloqueo de la migración celular y la capacidad invasiva, inducción de la sensibilidad a los fármacos antitumorales, y reducción del estrés oxidativo (revisado en Rossi et al., 2018). [337]

Como ejemplos de micoterapia en cáncer de mama, en diversos ensayos clínicos, se observa que la combinación de quimioterapia y *Trametes versicolor* mejora la tasa de supervivencia a 5 años de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pacientes con cáncer de mama. [83] Una revisión detalló que *Trametes versicolor* se prescribió al 63 % de las pacientes con cáncer de mama como terapia de oncología integrativa. [368] El extracto del hongo *Agaricus blazei* Murrill ejerce su actividad antitumoral de manera indirecta, a través de la estimulación de células del sistema inmune [5] y de manera directa induciendo la apoptosis o muerte celular de células tumorales. [464] En pacientes ginecológicas sometidas a quimioterapia se ha observado que *Agaricus blazei* Murrill produce mejoras en el apetito, la alopecia, la estabilidad emocional y la debilidad general de los pacientes. [5] El extracto del hongo *Grifola frondosa* actúa de manera análoga al de *Agaricus blazei* Murrill [98] y además ha mostrado efectos positivos significativos en pacientes con cáncer de mama. [184] En un ensayo clínico en fase I/II supervivientes del tratamiento oncológico convencional (quimio o radioterapia) de cáncer de mama, la toma vía oral de extracto líquido de *Grifola frondosa* en diversas dosis durante 3 semanas se toleró sin evidencias de toxicidad. La ingesta del hongo se asoció con una mejora de la función inmunológica, medida en un aumento de la producción de IL-2, IL-10, TNF-α, IFN-γ y por un incremento del recuento de células T. [75] En un ensayo en fase I, la administración oral de *Trametes versicolor* a nueve mujeres con cáncer de mama tras ser sometidas a quimioterapia o radioterapia, hasta un máximo de 9 g/día durante 3 semanas, dio lugar a un incremento en el recuento de células NK , CD8 y CD19, pero no CD4. La dosis del hongo fue segura y bien tolerada, y su ingesta indicó que podía proporcionar mejoras en la respuesta inmune de pacientes con cáncer de mama. [385] En un estudio con 82 pacientes con cáncer de mama a los que se les suministró cápsulas diarias durante seis meses con extracto de cola de pavo *(Trametes versicolor*) y salvia roja (*Salvia miltiorrhiza*) se midió una elevación de los niveles de linfocitos B, mientras que disminuyeron los niveles de IL-2, lo que evidenció una acción inmunoestimuladora. [428]

En definitiva, y basándose en los datos publicados, se puede concluir que los hongos medicinales pueden ser considerados como un elemento importante en la gestión de los pacientes con cáncer de mama, tanto para disminuir los efectos adversos de las terapias convencionales como para incrementar la calidad de vida. [337]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más frecuente en el mundo, tanto en términos de incidencia (2,1 millones diagnosticados en 2018, el 11,6 % del total de casos de cáncer) como de mortalidad (1,8 millones de fallecidos en 2018). [38, 427] Para el año 2020 se estiman que habrá casi 30.000 casos en España. [349] Más del 50 % de los casos de cáncer de pulmón se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad, con un pronóstico desfavorable y una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 5 %. [153] Además, nos encontramos con personas más o menos debilitadas tras una intervención quirúrgica que suele afectar a su calidad de vida, sobre todo durante los primeros tres meses postoperatorios (que es cuando resulta más efectivo el tratamiento coadyuvante) y, por lo tanto, son más susceptibles a los efectos adversos de la quimioterapia durante este periodo. [105]

Como en los otros tipos de cánceres más virulentos, es crucial identificar nuevas estrategias de tratamiento adyuvante que puedan mejorar los resultados de esta enfermedad. En este sentido, los medicamentos naturales son utilizados por hasta un 54 % de los pacientes con cáncer de pulmón, y en algunos casos ofrecen buenas expectativas para mejorar los resultados terapéuticos y la calidad de vida del paciente. [96]

En el caso de los hongos medicinales, *Agaricus blazei* Murrill posee interés en el tratamiento del cáncer de pulmón al haber mostrado capacidades citotóxica y antiangiogénica en líneas celulares de carcinoma de pulmón y en modelos animales. Compuestos como la blazeína, aislada de este hongo, que es capaz de inducir apoptosis en células de carcinoma de pulmón *in vitro*. [145] La administración por vía oral de ergosterol (aislado de la fracción lipídica de este hongo) en modelos animales de carcinoma pulmonar redujo de manera significativa el crecimiento de tumores a través de una inhibición en la vascularización inducida por el propio tumor. [376] *Grifola frondosa* ha mostrado su capacidad antimetastásica, reduciendo en modelos animales el número de nódulos metastásicos en el pulmón. [243] El ácido ganodérico, un triterpeno aislado de *Ganoderma lucidum*, inhibió el crecimiento tumoral y la metástasis en un modelo murino de cáncer de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ratón (ratones C57BL/6). Este efecto fue ejercido, entre otros, por el incremento de la expresión de IL-2 e IFN-γ, y de la activación de las células NK. [405] Extractos de *Ophiocordyceps sinensis* también han demostrado su capacidad de inhibir la metástasis pulmonar, así como la estimulación de la respuesta inmune innata, a través de la activación de macrófagos y células NK, en ratones y en células cancerosas en cultivo. [462]

A nivel clínico, el polisacárido K del hongo *Trametes versicolor* se ha usado tradicionalmente en Japón como inmunoterapia adyuvante para una amplia variedad de tumores, incluido el cáncer de pulmón. [96] El extracto de este hongo, rico en β-glucanos con enlaces β-1,6 y β-1,3, en combinación con hongo completo en polvo, mostró efectos positivos en pacientes de cáncer de pulmón, siendo capaz de inducir regresión de los cánceres o mejora significativa de los síntomas en el 62,5 % de los pacientes. [184] En una revisión sistemática, se analizaron 15 ensayos clínicos (aunque sólo 7 fueron aleatorizados y controlados) que mostraron que el uso del PSK produjo una mejora en los porcentajes de supervivencia a 1, 2 y 5 años. Los ensayos controlados y aleatorizados mostraron además beneficios en una amplia variedad de criterios de valoración, incluidos parámetros inmunológicos, hematológicos, estado funcional, peso corporal, fatiga, anorexia, etc. Aunque algunos resultados resultaron poco concluyentes, la mayoría de los ensayos respaldaron un impacto positivo del PSK en los pacientes con cáncer de pulmón. Además, el PSK presentó altos índices de seguridad al ser administrado junto con quimioterapia o radioterapia. [96] Extractos polisacarídicos de *Trametes versicolor* han producido efectos positivos significativos en ensayos clínicos con pacientes de cáncer de pulmón no microcítico. En un estudio sobre 185 pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico tratados con radioterapia, la utilización concomitante de krestin (PSK) produjo un incremento en la supervivencia de los pacientes a los 5 años del 16 % al 39 % (para pacientes en estadio I y II), y del 5 % al 22 % (para pacientes en estadio III). [118] Un caso clínico de un paciente de 79 años con carcinoma pulmonar no microcítico en estadio IV mostró una reducción significativa de la masa tumoral tras el tratamiento únicamente con compuestos de la medicina tradicional coreana

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

durante 10 meses. Entre estos compuestos se encontraba el hongo *Ophiocordyceps sinensis*. [199] En otro estudio con 170 pacientes con carcinoma espinocelular tratados con radioterapia, se reportó que el tratamiento concomitante con extracto polisacarídico de *Trametes versicolor* aumentaba la supervivencia de los pacientes transcurridos 5 años, de un 17 a un 39 % (estadios I y II), o de un 8 a un 26 % (estadio III). [117] Un metaanálisis, con reunió datos de 12 ensayos clínicos y más de 450 pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico, concluyó que la inyección coadyuvante de lentinano (un 1,3 β-glucano aislado de *Lentinula edodes*) junto con la quimioterapia incrementó la respuesta al tratamiento y disminuyó la toxicidad gastrointestinal provocada por la quimioterapia. [461] Por otro lado, trabajos más recientes muestran que pacientes que habían superado el tratamiento convencional y que fueron tratados 28 días con extractos polisacarídico de *Trametes versicolor* presentaban mejoras significativas en el número de leucocitos, inmunoglobulinas séricas G y M, así como el porcentaje de grasa corporal en pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico avanzado. [389] En un estudio aleatorizado en doble ciego, realizado con 37 sujetos sanos de edad avanzada, la ingesta de extracto de *Ophiocordyceps sinensis* incrementó la capacidad aeróbica y la función respiratoria en los sujetos tratados con respecto al grupo control. [459]

Células tumorales humanas de pulmón y células HUVEC (células de endotelio humano) mostraron inhibición de la proliferación, así como inhibición de la secreción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) por las células tumorales de pulmón al ser tratadas con extracto rico en polisacáridos de *Ganoderma lucidum*, [46] lo que indica que los efectos antiangiogénicos del hongo se ejercen mediante la inhibición de la proliferación del epitelio vascular y mediante la inhibición de la expresión de factores de crecimiento. Otros estudios mostraron que el extracto polisacarídico de *Ganoderma lucidum* induce resultados positivos en pacientes de cáncer de pulmón a nivel inmunitario. Concretamente, estimulando en los linfocitos la producción de perforina y granzima B, factores implicados en la lisis celular y apoptosis de estas células como parte de la respuesta inmune. [371] De forma similar, extractos de *Hericium erinaceus* mostraron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

efectos antitumorales in vivo en ratones mediante la inhibición del VEGF y la enzima COX-2, así como mediante la estimulación de la actividad de los macrófagos y las células NK. [178]

Finalmente, en una revisión sistemática se analizaron 38 artículos sobre la eficacia de los preparados fúngicos como tratamiento coadyuvante del carcinoma no microcítico de pulmón. Los autores concluyeron que *Trametes versicolor* podría tener utilidad en estadios iniciales de este tipo de carcinoma como tratamiento coadyuvante tras cirugía o radioterapia radical. En estadios más avanzados (III-IV), los hongos con mayor evidencia de efectos significativos fueron *Trametes versicolor* y *Ganoderma lucidum*. Con menor grado de evidencia estarían *Lentinula edodes* y *Grifola frondosa*. [105]

1.2.3 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer diagnosticado con más frecuencia en varones, con una estimación de 1,3 millones de casos en todo el mundo en el año 2018, lo que supuso el 13,5 % de los diagnósticos de cáncer en hombres y un 6,7 % de las muertes por cáncer (360.000 fallecimientos). [38, 427] En España las previsiones para el 2020 daban un valor de 35.126 casos, siendo uno de los cinco cánceres más frecuentes en nuestro país. [349]

En cuanto a estudios enfocados en el uso de la micoterapia en este tipo de cáncer, se ha reportado que el ácido ganodérico extraído del hongo *Ganoderma lucidum* es capaz de inducir citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de próstata dependientes e independientes de andrógenos, e inhibe la actividad de la 5-α-reductasa, que convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT). [221, 222, 337] Este efecto inhibe la progresión del cáncer a formas independientes de andrógenos que convierten en ineficaces los bloqueos hormonales utilizados como tratamiento. [273] También se ha descrito que el extracto de *Ganoderma lucidum* presenta actividad inhibidora del crecimiento sobre células de cáncer de próstata *in vitro* que proliferan independientemente de andrógenos. [433] Los ácidos ganodéricos extraídos de este hongo inhiben también la osteoclastogénesis, que causa la reabsorción y mineralización del hueso que es invadido y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

colonizado en los casos de metástasis de cáncer de próstata. [165] Compuestos excretados por *Agaricus brasiliensis* inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata dependientes e independientes de andrógenos. Los mecanismos por los que el hongo induce estos efectos parecen implicar a la ruta apoptótica de la caspasa 3. [464] Extractos [313] y polisacáridos [98] de *Grifola frondosa* son capaces de inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata. Además, si se combina el β-glucano con vitamina C, se obtiene el mismo efecto sobre las células de cáncer de próstata en cultivo que con cantidades de polisacáridos 10 veces menores. Los autores sugieren que este efecto potenciador puede tener implicaciones clínicas, lo que ello refuerza el interés de combinar vitamina C y extracto polisacarídico de *Grifola frondosa* en el tratamiento del cáncer de próstata. Además, los polisacáridos de este hongo son capaces de inducir mortalidad celular elevada (>95 %) en cáncer de próstata independiente de andrógenos. [98] El PSP extraído del hongo *Trametes versicolor* es capaz de inhibir la capacidad tumoral de células de cáncer de próstata *in vitro*, así como en modelos en ratones de este tipo de cáncer. [229] Extractos etílicos de *Trametes versicolor* redujeron el crecimiento celular *in vitro* de cáncer de próstata dependiente de andrógenos. [134] *Ophiocordyceps sinensis* es capaz de estimular la producción de testosterona en células Leydig de ratón, tanto células normales como tumorales. [140]

No se han encontrado trabajos sobre ensayos clínicos en pacientes con cáncer de próstata sometidos a algún tipo de micoterapia coadyuvante. Sin embargo, un estudio de seguimiento en hombres mayores de 40 años en Japón estableció una relación inversa entre el consumo de hongos y la incidencia de cáncer de próstata. [477]

1.2.4 Cáncer gástrico

A nivel global, el cáncer de estómago sigue siendo uno de los más frecuentes, con más de un millón de casos diagnosticados en 2018 (5,7 % del total de cánceres), si bien en los países occidentales se ha registrado una tendencia al descenso en la incidencia de este tipo de cáncer. Aun así, este tipo de cáncer causó 783.000 muertes en 2018. [38,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[427] Este descenso está relacionado con la reducción de las infecciones por *Helicobacter pylori*, con las modificaciones dietéticas, una mejor preservación de los alimentos, y un descenso del consumo de tabaco y alcohol. No obstante, el número de nuevos casos de cáncer gástrico en España para el año 2020 se estimaban en 7.577, con una incidencia superior en varones. [349] Los cánceres gastrointestinales representan en la actualidad un problema de salud de gran importancia en lo relativo al número de nuevos casos anuales y al número de muertes anuales debido a la pobre supervivencia de estos pacientes. [427] Concretamente, los cánceres colorrectal y gástrico ocupan el tercer y cuarto lugar entre los cánceres más frecuentes. Además, cuatro de los seis tipos de cáncer que más muertes causan anualmente afectan al aparato digestivo, siendo estos el gástrico, de hígado, colorrectal, y de esófago. [38, 48349, 350, 358, 427]

A nivel preclínico, extractos acuosos de *Hericium erinaceus* protegen el estómago de ratas ante la ulceración inducida por etanol. [1, 431] Estos efectos parecen estar ejercidos, al menos en parte, a través del incremento de la proteína Hsp70 (una proteína de shock térmico con importantes funciones citoprotectoras) y la inhibición de la proteína Bax (implicada en rutas proapoptóticas). [431] Los extractos podrían además ser beneficiosos en cuanto a la reducción de efectos secundarios en pacientes con cáncer gástrico, actuando como regenerador del epitelio gastrointestinal. [431] Las especies de hongos *Ganoderma lucidum* y *Hericium erinaceus* son igualmente capaces de inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer gástrico, [204, 289] y por este motivo presentan interés en el tratamiento, especialmente *Hericium erinaceus*, cuyos beneficios a nivel gástrico se extienden a otras patologías. Ciertos estudios muestran que el extracto acuoso de *Agaricus blazei* Murrill es capaz de ejercer un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer gástrico, [145, 163] o sobre células de cáncer de próstata, [464] mediante apoptosis inducida a través de la caspasa 3. *Grifola frondosa* es igualmente un hongo de gran interés para el tratamiento del cáncer de estómago, ya que se ha demostrado que los extractos acuosos de esta especie son capaces de inhibir el crecimiento en múltiples líneas celulares de cáncer gástrico al promover la apoptosis por vías dependientes e independientes de la

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

caspasa 3. [360] Diversas mejoras, aunque en algunos casos no estadísticamente significativas, se han observado igualmente a nivel clínico en pacientes que presentaban cáncer gástrico. [184] El PSP de *Trametes versicolor* induce apoptosis en células leucémicas HL-60 en cultivo a través de la activación de las caspasas 3, 8 y 9. [450] La administración en la dieta de extracto de *Trametes versicolor* en ratones redujo la incidencia de tumores intestinales inducidos por la inyección subcutánea de dimetilhidrazina (DMH), aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. [69] Ratas con tumores en el tracto digestivo, así como pacientes con cáncer gastrointestinal, que sufrían de estrés oxidativo presentaron alivio sintomático con una única inyección intraperitoneal (en ratas) o una única administración oral (en pacientes) del PSK aislado de *Trametes versicolor*. [173]

En cuanto a estudios a nivel clínico en relación con el uso de hongos medicinales en pacientes con cáncer gástrico, múltiples trabajos muestran el interés de los extractos del hongo *Lentinula edodes* en el tratamiento de estos pacientes. Ya en el año 1969, la prestigiosa revista *Nature* publicó un estudio donde se mostraba la actividad antitumoral en modelos animales de los polisacáridos de *Lentinula edodes*. [64] Desde entonces numerosos estudios han sido realizados incluyendo algunos ensayos clínicos. Así, el lentinano, un 1,3 β-glucano aislado de *Lentinula edodes*, aumenta la supervivencia en pacientes de cáncer gástrico tratados con quimioterapia. [143, 280] Un estudio retrospectivo en 963 pacientes japoneses que sufrieron resección por cáncer gástrico, la supervivencia tras la cirugía fue mayor en aquellos pacientes que recibieron tratamiento coadyuvante con PSK junto con quimioterapia. [232] Un metaanálisis incluyó a 8009 pacientes de cáncer gástrico sometidos a resección curativa, procedentes de ocho ensayos clínicos aleatorizados y controlados. Los resultados del análisis concluyeron que el uso de PSK como inmunoterapia coadyuvante aumentó la supervivencia de los pacientes. [281] Una reciente revisión de 135 estudios independientes realizados en China con el lentinano durante los 12 últimos años, lo que incluye más de 9000 pacientes, recapituló una mejor respuesta a la quimioterapia en los pacientes que utilizaron este polisacárido como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

coadyuvante. Por ejemplo, la respuesta total a la quimioterapia más lentinano para pacientes con cáncer de pulmón, cáncer gástrico y cáncer hepático fue del 29-87 %, 11-88 % y 51-76 %, respectivamente, comparados con un 15-83 %, 61-71 % y 32-52% en los grupos con únicamente quimioterapia. Similares resultados fueron recopilados para pacientes con cáncer colorrectal. [475] En un estudio en Japón, 262 pacientes de cáncer de estómago fueron sometidos de forma aleatoria a tratamiento de quimioterapia (mitomicina + fluorouracilo) con o sin el PSK de *Trametes versicolor* como coadyuvante. La administración del PSK mejoró de forma estadísticamente significativa el porcentaje de ausencia de enfermedad a los 5 años (70,7 % en el grupo tratado con el hongo, frente a un 59,4 % en el grupo con sólo quimioterapia). [262] En un metaanálisis se evaluaron 13 ensayos clínicos aleatorizados sobre el tratamiento coadyuvante del hongo *Trametes versicolor* en pacientes de distintos tipos de cáncer. Los resultados mostraron que la adición del hongo al tratamiento oncológico convencional (radioterapia o quimioterapia) incrementaba en un 9 % la supervivencia a 5 años de los pacientes de cáncer de mama, colorrectal y cáncer gástrico. [83] Los efectos secundarios de la quimioterapia se redujeron en pacientes con cáncer gastrointestinal avanzado que tomaron extractos de *Lentinula edod*es vía oral. [288] Un estudio en doble ciego con pacientes afectados por la gastritis atrófica crónica mostró que *Hericium erinaceus* indujo alivio del dolor abdominal superior y displasia además de la reducción de la infiltración inflamatoria. [445] Un estudio con 349 pacientes con cáncer gástrico en estadio II/III recibieron tras la resección curativa quimioterapia oral con o sin PSK de *Trametes versicolor* como coadyuvante. El grupo que recibió el PSK mostró un porcentaje de supervivencia sin recidiva superior al grupo con sólo quimioterapia. [144]

Otra manera en que los hongos medicinales pueden ayudar al tratamiento de cáncer gástrico es mediante la erradicación de *Helicobacter pylori*. Esta bacteria es uno de los patógenos humanos más prevalentes, infecta al 50 % de la población global y está relacionada con el desarrollo de enfermedades gástricas, incluido el cáncer de estómago. [17, 174, 203] Los hongos son una fuente de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

compuestos anti-*Helicobacter pylori.* [114] Algunos basidiomicetos utilizados en la MTC presentan actividad inhibidora contra esta bacteria, sobre todo *Hericium erinaceus*. [352] *Lentinula edodes* posee actividad antibacteriana *in vitro* contra diferentes microorganismos potencialmente patógenos. [119, 192, 294, 399] Estos efectos podrían estar relacionados con la capacidad prebiótica descrita para este hongo. [63, 65] *Ganoderma lucidum* también posee actividad inhibidora del crecimiento de *Helicobacter pylori*. [8, 25, 177, 441] Los efectos positivos de *Ganoderma lucidum* sobre pacientes con infección bacteriana podrían estar mediados a través de las capacidades inmunoreguladoras y antiinflamatorias del hongo. [54]

Proyecciones iniciales, realizadas por Hifas da Terra mediante la prueba de difusión en agar en laboratorio, revelaron actividad antibacteriana para tres de los extractos comercializados: Mico-Leo® (*Hericium erinaceus*), Mico-Shii® (*Lentinula edodes*) y Mico-Rei® (*Ganoderma lucidum*) (datos no publicados, para más información consultar en: https://hifasdaterra.com/blog/patologias/gastritis/). De acuerdo con publicaciones de otros grupos de investigación, estos resultados refuerzan el interés de la combinación de extractos de estas tres especies de hongos para el tratamiento de *Helicobacter pylori* en individuos infectados.

1.2.5 Cáncer colorrectal

En el año 2018, el cáncer colorrectal (CCR) fue el tercer tipo de cáncer más diagnosticado (10.2 % del total), lo que supuso 1,8 millones de personas en todo el mundo. Se registraron 880.792 fallecimientos debidos a tumores colorrectales, es decir, un 9,2 % del total de muertes por cáncer. [38, 427] En ese mismo año, se diagnosticaron en Europa casi medio millón de casos de CCR, con 250.000 fallecimientos. [432] En España, este tipo de carcinoma es también uno de los más frecuentes, con una estimación del número de casos para el año 2020 de 44.231. La prevalencia en nuestro país en el año 2018 fue del 15,3 %, algo más de 65.000 casos para varones, mientras que se diagnosticaron 42.000 casos en mujeres (11,8 %). [349] El cáncer colorrectal es una de las enfermedades más comunes en los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

países desarrollados. [153, 361] Aunque el 70 % de los pacientes diagnosticados son tratables con cirugía, aproximadamente el 50 % desarrollan recurrencia, que es casi siempre incurable. [286] Por otra parte, alrededor del 90 % de las muertes relacionadas con cáncer colorrectal son debidas a metástasis. [483]

Además de sus elevadas prevalencia, incidencia y recurrencia, el cáncer colorrectal hace que las personas que lo sufren tengan a menudo una cualidad de vida y un índice de supervivencia limitados. [153, 361] En este sentido, el estilo de vida y la nutrición son factores que pueden jugar un papel esencial en la gestión de esta enfermedad. Como nutracéuticos, los hongos medicinales pueden jugar este papel.

A nivel preclínico, el extracto de *Agaricus blazei* Murrill retrasa el crecimiento tumoral de células de cáncer de colon humano (células HT-29) implantadas en ratones. [439] En ratas, el extracto hidrosoluble de *Ganoderma lucidum* es capaz de prevenir las lesiones en el intestino delgado causadas por quimioterápicos como el 5-fluorouracilo (5-FU) [419]. El ganodermanontriol, un triterpeno aislado de *Ganoderma lucidum*, inhibe la proliferación de células tumorales de colon *in vitro*, y en un modelo de ratones *in vivo*. [149] El extracto de *Lentinula edodes* es capaz de inhibir el crecimiento de tumores en ratones injertados con células de carcinoma de colon humano. [268] El PSK reduce la capacidad invasiva de varias líneas de células tumorales de colon, mediante la reducción de los niveles de ARNm de las metaloproteinasas de matriz extracelular MMP2 y MMP9. [395] Con efectos dependientes del tiempo de incubación y de la dosis utilizada, se ha descrito que un extracto rico en polisacáridos de *Ganoderma lucidum* inhibe la proliferación de células de cáncer de colon humano (LoVo), [215] y un extracto del hongo rico en triterpenoides inhibe la proliferación de células de cáncer colorrectal (células SW 480). [444] La administración oral de YM-2A, un α-glucano aislado de Grifola frondosa, inhibe el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia en un modelo murino de cáncer colorrectal. Según los autores, la capacidad anticancerígena es debida a la mejora de la respuesta inmune mediante el incremento de los niveles de IFN-γ en células CD4+ y CD8+ del bazo y de los nódulos linfáticos. [244]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A nivel de ensayos clínicos, los resultados de un metaanálisis (1.094 pacientes de 3 ensayos clínicos) sugieren que la inmunoquimioterapia adyuvante con el PSK obtenido de *Trametes versicolor* puede mejorar tanto la supervivencia como la supervivencia sin enfermedad de los pacientes con cáncer colorrectal con resección curativa. Esta mejora puede ser no solo estadísticamente sino también clínicamente significativa. Los autores postulan que la acción del PSK puede ser debida a su efecto inmunopotenciador no específico (producción de interleucinas e interferón) que estimularía a las células NK y las células LAK. [340]

En otro estudio con pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal en estadios II y III, la ingesta del PSK como coadyuvante a la quimioterapia con tegafur/uracilo produjo una reducción de la recurrencia (43,6 %) y de la mortalidad (40,2 %), mientras que incrementaba la supervivencia a 5 años de un 72,1 % a un 81,8 %. En los pacientes tratados con PSK se observó además un aumento porcentual de las células NK. [286] El PSK fue ensayado de manera combinada con quimioterapia (5-fluorouracilo) en pacientes de cáncer colorrectal en estadios II y III, observándose un aumento en la supervivencia de estos a 5 años. [83, 286] En un estudio con 7 pacientes de cáncer colorrectal (más 1 pacientes con cáncer gástrico) en estadio avanzado, la ingesta de extractos de micelio de *Lentinula edodes* administrados oralmente disminuyó la incidencia de efectos adversos provocados por la quimioterapia. Además, la producción de IFN-γ por células CD4+, CD8+ y CD56+ presentó una tendencia al aumento en los pacientes tratados con el extracto. [288]

En 47 pacientes con cáncer colorrectal avanzado, el tratamiento con extracto rico en polisacáridos de *Ganoderma lucidum* vía oral durante 12 semanas dio lugar a una disminución de los niveles de TNF-α e IL-1 en el 73,2 % de los pacientes del estudio, mientras que se elevaron los niveles de IL-2, IL-6 e IFN-γ. También si midieron diferencias en los recuentos celulares de diversas células del sistema inmunitario (CD3, CD4, CD8, CD56 y NK). Aunque los cambios entre pacientes tratados y no tratados con el hongo no fueron estadísticamente significativos, los resultados apuntan a la capacidad inmunomoduladora de *Ganoderma lucidum* en pacientes con cáncer

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

colorrectal avanzado. [62]. En este sentido, se ha descrito que el aumento de ciertas citoquinas durante el proceso cancerígeno (TNF-α, IL-1, entre otras), contribuye a la caquexia que se manifiesta en como pérdida de peso, náuseas crónicas, fatiga, insomnio y sudoración profusa en estos pacientes. La disminución de esta citoquina podría mejorar los síntomas de la caquexia. [62] Por lo tanto, este hongo medicinal puede suponer un enfoque útil como terapia coadyuvante para mejorar el estado de salud y la calidad de vida del paciente. También el lentinano, un β-glucano derivado de *Lentinula edodes*, es conocido por su efecto positivo contra la caquexia en pacientes con tumores malignos. [377]

En una revisión sistemática, se evaluaron 13 ensayos clínicos aleatorizados, controlados con placebo y en doble ciego, para determinar la eficacia de este *Trametes versicolor* en la supervivencia de pacientes con cáncer. [83] Los resultados del metaanálisis mostraron que este hongo supone una ventaja en cuanto a la supervivencia en comparación con el tratamiento convencional sin el hongo. Los pacientes a los que se les administró el extracto presentaron una reducción absoluta de la mortalidad a 5 años del 9 %, lo que resultó en un paciente vivo adicional por cada 11 pacientes tratados. En pacientes con cáncer de mama, cáncer gástrico o cáncer colorrectal tratados con quimioterapia, los efectos de la combinación con preparados de *Trametes versicolor* en la tasa de supervivencia fueron más evidentes, pero no así en los casos de cáncer de esófago y carcinoma nasofaríngeo, donde las diferencias no fueron significativas. [83]

Por último, podemos considerar las capacidades protectoras del epitelio gastrointestinal mostradas por el extracto de *Hericium erinaceus* en modelos murinos *in vivo*. [431] Aunque sería necesario un ensayo clínico en humanos, estos datos preclínicos apoyan la idea de usar este hongo como terapia coadyuvante en los enfermos con cáncer gastrointestinal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA MICOTERAPIA

En las culturas orientales, los hongos han sido usados como alimento y como fármacos desde hace milenios, pues los hongos medicinales son un componente esencial de la MTC. Por el contrario, en la cultura occidental, los hongos fueron vistos a menudo y desde tiempos antiguos con un cierto miedo y desconfianza, dada la dificultad que entrañaba a veces el reconocimiento de especies distintas y la peligrosidad que entrañaba una desafortunada equivocación. A los ojos del neófito, dos especies completamente distintas parecen iguales, mientras que una es un manjar la otra puede ser un veneno mortal a dosis tan bajas como 20 gramos de setas para una persona de 70 kg. De ahí que, desde antiguo, por la prueba de ensayo y error, se recomendaba gran precaución y cuidado con las setas. Pero aquel que las conocía bien, podía disfrutar de este gran manjar sin recato.

Los hongos y su uso han sufrido también los avatares de la Historia. Existen evidencias de que en Occidente la iglesia (lugar de formación y de concienciación comunal durante siglos) desaconsejaba con insistencia su aprovechamiento por el riesgo de envenenamiento, a pesar de las hambrunas recurrentes que sufría la población. Arrastrando esta complicación de aprovechamiento, la micología fue relegada a científicos, naturalistas o gente de alta alcurnia que tenía buenos asesores. A nivel de pueblo llano, existen zonas de Occidente en las que las setas han sido más aprovechadas que en otras, un uso por lo general unido al aprovechamiento forestal o bien a un uso terapéutico en botica. Estos pueblos que han mantenido su sabiduría popular son hoy los que más disfrutan de la recolección silvestre de setas para disfrute propio, no para la venta. Galicia, pese a ser un lugar rico en biodiversidad y producción, no gozaba de esta sabiduría popular más allá de una especie que es hoy la más reconocida y aprovechada a nivel de pueblo: la *Macrolepiota procera*. Si bien es cierto que Galicia ha sido un lugar prolífico en investigadores y micólogos (Carlos Valencia, Antonio Odriozola, Luis Freire, Marisa Castro, Francisco Fernández de Ana Magán, Antonio Rigueiro, etc.) que en este último siglo han realizado una enorme labor de enseñanza tanto teórica como práctica, en el aula, el monte y la cocina, para acercar a la población al conocimiento y disfrute de la micología.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Esta labor de investigación ha hecho que, por fortuna, los tiempos del miedo y la ignorancia hayan quedado atrás. Hoy día la micología es una ciencia y como tal de ser utilizada, aplicando el método científico a la mejora y perfeccionamiento de esta rama de la biología.

Paralelamente al desarrollo del conocimiento de la micología y la naturaleza en general, es a partir de los años 70-80 del siglo pasado cuando se desarrolla de forma masiva el interés por los remedios llamados «naturales», tanto por parte de los profesionales de la salud como de la sociedad en general. Esta última, quizá cansada de la fuerte medicación social y en la búsqueda de nuevos remedios que pudiesen ofrecer una forma de prevención y de minoración de los síntomas en patologías crónicas o degenerativas. Algunos autores consideran que es a partir de 1990 cuando se desarrolla el interés científico por las setas como remedios naturales. [251] Pero es fundamentalmente con el año 2000 y el cambio de siglo cuando surge el interés generalizado por las terapias naturales, entre las que se incluye la micoterapia. [396]

Las terapias disponibles en la actualidad contra el cáncer son mayormente eficaces en fases tempranas de la enfermedad. Pero en fases avanzadas, especialmente a partir de tumores desarrollados en tejidos epiteliales como el cáncer colorrectal, la eficacia se reduce considerablemente. Esta limitada eficacia y los importantes efectos secundarios de las mismas han favorecido en los últimos años el uso creciente de productos medicinales complementarios y alternativos (CAM, *complementary and alternative medicine*) por parte de los pacientes. En algunos países industrializados, los estudios sugieren que al menos el 20 % de los pacientes oncológicos han utilizado algún tipo de estos productos, [299, 337, 375] mientras que otros autores dan cifras de entre el 45 y el 60 %. [341] Se estima que el 38 % del público general en los EE.UU. utiliza productos CAM. [264] En este país, la venta de suplementos herbológicos (lo que incluye a los hongos medicinales) se ha incrementado de forma sostenida desde el 2004. En el año 2018, estos suplementos supusieron un gasto para los consumidores estadounidenses de casi nueve mil millones de dólares. [362] En Australia, se calcula que el 69 % de la población utiliza productos CAM. [447] En Italia, un estudio reciente estima que un 49 % de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pacientes oncológicos utilizan productos CAM durante el transcurso de la enfermedad. [27] La micoterapia derivada de la MTC constituye uno de los tipos de medicina complementaria y alternativa más prometedores. [212, 337] De hecho, hace algo más de 15 años que algunos autores empezaron a señalar las posibilidades terapéuticas de los hongos medicinales en oncología, gracias a sus propiedades inmunomoduladoras. [252]

Según datos de la Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP, hasta 1998, Asociación Nacional de Especialidades Farmacéuticas Publicitarias), las ventas de complementos alimenticios supusieron en España en el año 2017 más de 621 millones de euros. El mercado del autocuidado alcanzó en 2017 un mercado de 5.795 millones de euros, lo que supuso un 1,1 % de crecimiento con respecto al año anterior. En 2017 el mercado de «consumer health», lo que incluye productos para el cuidado personal, productos para el cuidado del paciente y productos OTC (*over the counter*, medicamentos no financiados y sin receta, y productos de similar posicionamiento), superó los 5.100 millones de euros (un crecimiento del 1,4 % con respecto al 2016). [11] Estos valores ponen en evidencia la importancia social y económica de las terapias integrativas.

Por todo esto, en los últimos veinte años la formación en micología ha sido adaptada, diseñada y dirigida a otro público, el de los profesionales sanitarios, para poder enseñarles a utilizar los remedios naturales preparados a partir de las setas consideradas tradicionalmente como «medicinales». Hoy ya es un hecho el gran interés de los grandes profesionales de la salud hacia las nuevas técnicas naturales. Técnicas que pueden integrarse con las terapias hospitalarias convencionales para intentar mejorar las respuestas a los tratamientos, sensibilizar el organismo ante el fármaco convencional o ayudar a la eliminación fisiológica del mismo, evitando así daños celulares mayores derivados de la retención del fármaco.

Dado este interés por los remedios o medicinas naturales, y la tendencia social generalizada de la automedicación, el médico se ve obligado a conocer y entender qué complementos nutricionales está tomando su paciente, ya sea con o sin su consentimiento. Por lo tanto,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

nace la demanda por parte de la clase médica y paramédica de ampliar sus conocimientos sobre esta temática y su parte práctica de aplicación. En el III congreso internacional de oncología integrada celebrado en Roma en el 2012, el doctor Massimo Bonucci, oncólogo y presidente de la Asociación de la Investigación de Terapias Oncológicas Integrativas (ARTOI), decía que: «Hoy en día, tanto si el oncólogo lo permite como si no, la realidad es que el paciente está tomando una cóctel de productos naturales que en uno u otro grado interfiere con la medicación hospitalaria. De modo que está en su obligación como oncólogo responsable el entender y conocer, sino todos, al menos los principales productos naturales reconocidos como "activos", para así poder coordinar las posibles interacciones con los fármacos a nivel de metabolismo hepático, ajuste de las dosis y de los tiempos de tratamiento».

Los productos CAM, como es el caso de los hongos medicinales, presentan propiedades inmunoreguladoras y antitumorales, como han revelado un elevado número de estudios, aunque la mayoría son *in vitro* o con modelos animales. Estas propiedades pueden reducir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales, además de reducir el riesgo de recidiva de los pacientes oncológicos. [299]

Los fundamentos y principios de la oncología botánica son sólidos, pero la ciencia está muy por detrás de los usos teóricos de los medicamentos de plantas en pacientes con cáncer. La evidencia de muchos de los medicamentos herbológicos o naturales más populares utilizados por los pacientes con cáncer ha sido en muchos casos incompleta desde el punto de vista de la ciencia moderna. La justificación de la oncología botánica en el siglo XXI es un proceso que en la actualidad se encuentra en pleno desarrollo. [367]

No se puede olvidar que, a pesar de los largos usos tradicionales de los productos naturales, muchos de los cuales están disponibles sin receta médica, algunos pueden ser relativamente inofensivos, o incluso inocuos, mientras que otros pueden ser perjudiciales al ser utilizados como coadyuvantes en medicina integrativa, sobre todo en medicina oncológica. Aunque otros muchos sí que pueden tener verdaderas propiedades medicinales que, al ser utilizado como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

coadyuvantes, ofrezcan nuevas ventanas terapéuticas. En los últimos 60 años, los investigadores han aplicado los métodos de la ciencia moderna a fórmulas medicinales autóctonas de la tradición centenaria de muchas culturas. Muchos de estos estudios han sorprendido por la capacidad terapéutica de estos productos naturales, como los hongos. Por ejemplo, como ya se ha mencionado anteriormente en esta tesis, en la actualidad se sabe que los polisacáridos de los hongos estimulan tanto los sistemas inmunitarios innatos como los adaptativos, además de activar las células NK, las células T, las células B y las respuestas del sistema inmunitario dependientes de los macrófagos. [341, 417] En definitiva, se ha demostrado que la acción inmunomoduladora de los polisacáridos de los hongos medicinales es especialmente valiosa como medio de profilaxis, prevención y tratamiento adyuvante en quimioterapia.

Los resultados clínicos obtenidos hasta la fecha son muy prometedores. Algunos ensayos en pacientes oncológicos han permitido ya evaluar los efectos beneficiosos de los hongos medicinales a nivel inmunitario. Como ejemplo, un estudio con pacientes de cánceres ginecológicos tratados con extracto de *Agaricus blazei* Murrill junto con quimioterapia indujo un aumento significativo de la actividad de las células NK. [5] En pacientes con cáncer colorrectal en estadios II y III, el extracto de polisacárido K de *Trametes versicolor* como coadyuvante aumentó el número de células NK y redujo los niveles de proteína inmunosupresora, además de reducir el riesgo de recidiva. [286] En un estudio con niños y adolescentes con leucemia y tumores sólidos evidenció que el tratamiento con *Ganoderma lucidum* inducía beneficios en la respuesta linfoproliferativa de los pacientes. [357]

La popularidad de los hongos medicinales y sus aplicaciones crece sin cesar en la medicina moderna. Sin embargo, el conocimiento de los beneficios en la salud de estos hongos y su eficacia clínica aún no está lo suficientemente divulgado. Al contrario que los medicamentos sintéticos, los hongos medicinales aún no han sido sometidos a una evaluación rigurosa basada en las reglas y protocolos de la medicina basada en hechos (EBM). [418] Resulta por lo tanto evidente que se necesitan más ensayos clínicos, aleatorizados y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

controlados con placebo, en doble ciego, con sede en Occidente, y con poblaciones lo suficientemente grandes para obtener un poder estadístico suficiente. De esta forma se podrán establecer los parámetros de eficacia y seguridad adecuados, así como identificar qué extractos de hongos son más efectivos contra tumores específicos. [109, 418] De especial interés es la cuestión de evaluar diferentes combinaciones de hongos, cuyos efectos combinados han sido evaluados en un número muy reducido de estudios. Por ejemplo, el uso de extractos de *Trametes versicolor* junto con salvia roja (*Salvia miltiorrhiza*) y *Schisandra chinensis*, una fórmula utilizada en la MTC, demostró tener efectos hepatoprotectores en modelos murinos. [208] En este sentido, el campo en desarrollo de la oncomicología se está moviendo hacia la inmunoterapia combinatoria individualizada con extracto de hongos para pacientes con cáncer. [367]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2 HIPÓTESIS

Tras todo lo expuesto en la Introducción de esta tesis doctoral, resulta evidente el uso potencial que presentan los hongos medicinales para la prevención y el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. La micoterapia aplicada es un campo en expansión para la investigación y el desarrollo de la medicina moderna. Las terapias disponibles en la actualidad contra el cáncer tienen serias deficiencias, como su falta de eficacia en las fases avanzadas de la enfermedad, la recidiva o la aparición de efectos secundarios.

Dado el rico historial que poseen los hongos medicinales en cuanto a sus beneficios para la salud, así como el creciente interés en la investigación sobre extractos de hongos, parece factible que la micoterapia juegue un papel cada vez más importante en la prevención de enfermedades en general, y como inmunoterapia adyuvante en oncología, en particular.

Por lo tanto, es evidente que el uso de los hongos como nutracéuticos, sobre todo en oncología integrativa, responde a una demanda social, clínica y económica de incuestionable envergadura. La presente tesis doctoral pretende ayudar en la respuesta de la ciencia actual a esa demanda, investigando la respuesta inmune, analizando la capacidad prebiótica de diferentes extractos de hongos *in vitro* e *in vivo* y diseñando el protocolo para un ensayo clínico aleatorizado, en doble ciego, prospectivo y multicéntrico con dos brazos: grupo control (placebo) y grupo experimental.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3 OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene los siguientes objetivos:

Objetivo principal:

Determinar las capacidades anticancerígenas y prebióticas de los extractos de los hongos medicinales: *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei* Murrill, *Lentinula edodes*, *Polyporus umbellatus* y *Ophiocordyceps sinensis*.

Objetivos secundarios.

a. Realizar una revisión exhaustiva del conocimiento generado hasta la fecha en el campo de la micoterapia oncológica.
b. Determinar *in vitro* la actividad prebiótica de los extractos de hongos medicinales.
c. Determinación de la posible toxicidad farmacológica de los extractos fúngicos (inhibición CYP450).
d. Determinar las capacidades anticancerígenas *in vivo* de los extractos fúngicos en un modelo murino de colitis ulcerosa y CCR.
e. Determinar las capacidades prebióticas *in vivo* de los extractos fúngicos en un modelo murino de colitis ulcerosa y CCR

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

f. Delinear un protocolo de ensayo clínico en Fase II para el tratamiento con micoterapia coadyuvante en pacientes oncológicos de CCR sometidos a cirugía curativa.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4 METODOLOGÍA

4.1 CULTIVOS Y EXTRACTOS DE HONGOS

El cultivo de las distintas cepas de hongos y la preparación de los extractos se realizó según las metodologías (*know-how*) desarrolladas por Hifas da Terra. Algunas de estas metodologías han sido publicadas en detalle con anterioridad (ver Anexos). [297, 335]

En cuanto a la preparación de los extractos de hongos, se han elegido dos métodos principales que ya han sido descritos anteriormente en detalle (ver Anexos):

- Extracción hídrica en agua caliente, descrito en Rodríguez-Seoane *et al*., 2019. [335]
- Extracción mixta hidroalcohólica, descrito en Parada *et al*., 2015. [297]

El proceso de extracción mixto se utilizó con el hongo *reishi* (*Ganoderma lucidum*) a fin de obtener la fracción de triterpenoides de este hongo. Para el resto de los hongos se utilizó el proceso de extracción acuoso.

Ambos procesos de extracción suponen tecnologías ecológicas y respetuosas con el medio ambiente, sin las limitaciones de la producción de solventes tóxicos, y sin disminuir las propiedades farmacológicas de los extractos de hongos medicinales. Los métodos ecológicos (*green methods*) de extracción que se han desarrollado en Hifas da Terra suponen una serie secuencial en diferentes etapas, que incluyen extracción en agua, extracción por hidrodifusión con microondas y gravedad (MHG, *microwave hydrodiffusion and gravity*), autohidrólisis y extracción supercrítica con dióxido de carbono. [297, 335]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez obtenidos los extractos secos, estos se encapsularon en cápsulas vegetales con sulfato cálcico (SO_4Ca) como excipiente al 1 % para evitar el apelmazamiento y facilitar el movimiento en la máquina encapsuladora. Las cápsulas se conservaron en frascos de 62 unidades cerradas con sello interior de seguridad y brida externa de protección a violación del envase. Este envase se introdujo a su vez en una caja de cartón para proteger las cápsulas de la acción de la luz y aislarlas del efecto del calor. Una vez producidas las cajas fueron guardadas en frío, en cámara de 2 a 4ºC.

Todos los procesos realizados en este estudio tienen el certificado de buenas prácticas de fabricación (GMP, *good manufacturing practice*).

4.2 ENSAYO *IN VITRO* SOBRE ACTIVIDAD PREBIÓTICA

El objetivo principal de estos experimentos es determinar *in vitro* la posible actividad prebiótica de los extractos de origen fúngico, en concreto, del extracto del hongo *Hericium erinaceus*, sobre distintas especies bacterianas. Los extractos liofilizados de *Hericium erinaceus* se resuspendieron en medio de cultivo MRS o M9, según el ensayo, a una concentración de 100 mg/ml. Tras mantenerlos en agitación a temperatura ambiente durante una hora, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se esterilizó a través de un filtro de 0,22 μm para ser utilizado como suplemento de los medios de cultivo en los que posteriormente se cultivaron las bacterias.

El ensayo se basó en los cambios en la biomasa (crecimiento bacteriano), tras un tiempo establecido de cultivo, de determinadas bacterias probióticas en presencia de un 1 % del extracto fúngico (prebiótico a analizar) o en presencia de un 1 % de glucosa (prebiótico estándar), y en relación con el crecimiento de bacterias entéricas cultivadas en las mismas condiciones. Como bacterias probióticas se utilizaron cepas de *Bifidobacterium adolescentis* (CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 5781), *Lactobacillus plantarum* (CECT 9567) y un probiótico comercial, *Lactobacillus rhamnosus* GG

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(ATCC (*American Type Culture Collection*) 53103), comercializado bajo la marca Kaelidon 6 por TC Pharma. Como bacterias entéricas se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* (CECT 516 y CECT 343).

Las bacterias se reactivaron en medio de cultivo líquido MRS (bacterias lácticas y probióticas) o medio M9 (bacterias entéricas). Para el ensayo de actividad prebiótica se utilizaron cultivos de 18 h de edad ajustados a una turbidez de 0,5 MacFarland. El proceso de ajuste de turbidez se realizó mediante la fórmula: $Vi = \frac{Cf\ x\ Vf}{Ci}$; donde Ci es la turbidez inicial, Cf es la turbidez deseada (0,5), Vf es el volumen final de medio necesario para inocular todos los tratamientos y Vi es el volumen de cultivo que hay que añadir para obtener 0,5 MacFarland en el Vf. Los medios utilizados para ajustar la turbidez fueron medio M9 para las bacterias entéricas o medio MRS sin glucosa para las bacterias lácticas.

Los diferentes suplementos (glucosa, insulina y extracto fúngico) se diluyeron en agua destilada a una concentración de 100 mg/ml y se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 μm STERIFLIP® antes de añadirlos al medio de cultivo al 1 %. El grupo control se suplementó con un 1 % de agua destilada estéril para mantener la misma proporción de nutrientes en todos los tratamientos.

Los tubos de tratamiento con sus correspondientes suplementos fueron inoculados con cultivos bacterianos al 1 % (100 μl de bacterias en 9,9 ml de medio líquido). Los cultivos bacterianos estaban previamente ajustados a una turbidez de 0,5 MacFarland. Los tiempos y temperaturas de incubación se detallan en la Tabla 1. Cada tratamiento se ensayó por triplicado. Dos tubos de cada tratamiento se incubaron sin inocular para controlar posibles contaminaciones de los medios de cultivo o los suplementos. En el caso de *Bifidobacterium adolescentis*, se prepararon 3 réplicas por cada tiempo de muestreo y los tubos se sellaron con parafina justo después de añadir el inóculo para cultivar en anaerobiosis.

Las condiciones de los cultivos de las distintas especies de bacterias, así como los grupos experimentales ensayados, se resumen en la Tabla 1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1. Condiciones de cultivo y grupos de tratamiento de las bacterias entéricas y probióticas. Tiempos, temperatura y medio de cultivo de las distintas cepas de bacterias ensayadas.

	Lactobacillus sp.	*Bifidobacterium adolescentis*	*Escherichia coli*
Temperatura de cultivo	37 ºC	37 ºC	37 ºC
Tiempo de cultivo	24-48 h	48-72 h	24-48 h
Medio de cultivo	MRS	MRS	M9
Grupos de tratamiento	• MRS o M9 sin glucosa (control) • MRS o M9 + 1 % glucosa • MRS o M9 + 1 % extracto fúngico		

M9, medio de cultivo mínimo, suplementado con Ca_2CL 1 M (0,1 ml/l) y con $MgSO_4$ 1 M (2 ml/l). MRS, medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe.

A los diferentes tiempos de muestreo (0, 24 y 48 h) se retiró una alícuota de 250 µl de cada tubo y se midió la absorbancia a 600 nm en placa de 96 pocillos. En el caso de *Bifidobacterium adolescentis*, para no romper la anaerobiosis, se midió la absorbancia en diferentes tubos a cada tiempo de muestreo tras retirar la parafina. No se detectó crecimiento medible de esta bacteria hasta las 48 h, por lo que se prologó el tiempo de cultivo hasta las 72 h.

El índice de actividad prebiótica se calculó según la fórmula desarrollada por Huebner et al., 2007: [141]

$$Índice\ de\ actividad\ prebiótica = A - B$$

Donde:

$$A = \frac{(Abs\ bp\ medio\ control\ 24\ h - Abs\ bp\ medio\ control\ 0\ h)}{(Abs\ bp\ glucosa\ 24\ h - Abs\ bp\ glucosa\ 0\ h)}$$

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$B = \frac{(Abs\ be\ control\ 24\ h - Abs\ be\ control\ 0\ h)}{(Abs\ be\ glucosa\ 24\ h - Abs\ be\ glucosa\ 0\ h)}$$

$$Abs, absorbancia$$

$$bp, bacterias\ probióticas$$

$$be, bacterias\ entéricas$$

4.3 ENSAYO DE TOXICOLOGÍA FARMACOLÓGICA (CYP450)

Las isoenzimas de la familia CYP450 son esenciales en las fases iniciales del metabolismo de xenobióticos, lo que incluye a los fármacos de la medicina convencional y los compuestos complementarios. [120] La manera más común de determinar posibles interacciones entre nuevos fármacos o substancias bioactivas es mediante la medición de la acción del nuevo compuesto sobre distintas enzimas de la familia CYP450. [120, 282, 301]

En el presente estudio, se evaluó el potencial inhibitorio de los extractos fúngicos incluidos en la formulación de Mico-Digest 2.0® sobre las principales isoformas del CYP450 (CYP3A4, CYPP2D6 y CYP2CP), responsables de la mayoría de los procesos metabólicos conocidos. [426]

Los extractos fúngicos en su forma comercial (píldora o cápsula) se molieron y disolvieron en agua y DMSO (dimetilsulfóxido) en proporción 80/20. La dosis diaria recomendada de cada hongo se tomó como base para el tratamiento. Consultar Hellum *et al*., 2007 para más detalles. [120] Las soluciones madre de los extractos de hongos se mantuvieron a 4 ºC y en la oscuridad. Las concentraciones ensayadas *in vitro* se supone que cubren el rango de concentraciones que puedan ocurrir *in vivo* en el intestino delgado y en el torrente sanguíneo.

Para el ensayo enzimático propiamente dicho, microsomas de hígado humano (0,25 mg/ml) fueron incubados en placas de 96 pocillos durante 15 minutos a 37 ºC con el sustrato de prueba

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

específico para cada enzima disuelto en tampón salino 0,1 mM (pH 7,4). Estos sustratos específicos fueron: testosterona 50 µM para la CYP3A4, dextrometorfano 10 µM para la CYP2D6 y diclofenaco 20 µM para la CYP2C9. Además, la solución contiene un sistema de regeneración de NADPH (1,25 mM $NADP^+$, 3,3 mM glucosa-6-fosfato, 3,3 mM $MgCl_2$ y 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). Los extractos de hongos se disolvieron en DMSO/agua (20/80) en la concentración adecuada y se agregaron en volúmenes de 2 µl. Como controles positivos se utilizaron inhibidores específicos para cada enzima: ketoconazol para la CYP3A4, quinidina para la CYP2D6 y sulfafenazol para la CYP2C9, también disueltos en DMSO/agua y añadidos en volúmenes de 2 µl. Todas las incubaciones se realizaron en DMSO al 0,2 %, en un volumen total de 200 µl. La reacción se terminó mediante la adición de 90 µl de acetonitrilo. La formación de productos de reacción específicos (6-beta-hidroxi-testosterona, dextrorfano y 4´-hidroxi-diclofenaco) se cuantificó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, tal y como se ha descrito previamente. [301]

4.4 ENSAYOS PRECLÍNICOS *IN VIVO*

El objetivo principal de estos experimentos es estudiar los efectos de los extractos de origen fúngico con capacidad prebiótica sobre los marcadores de inflamación y la microbiota intestinal, en un modelo murino (ratones) de colitis ulcerosa y cáncer colorrectal (CCR).

Para ello se realizó la selección de los extractos con mayor potencial prebiótico de Hifas da Terra. Como modelo animal se indujo en los ratones un estado de inflamación intestinal crónica que derivó en cáncer colorrectal mediante la suministración de azoximetano (AOM) y sodio sulfato de dextrano (DSS). El tratamiento con AOM/DSS genera en ratones tumores de colon de forma rápida y consistente, con similitudes morfológicas y moleculares a las que se observan en la colitis humana y el cáncer colorrectal. Este modelo murino ha sido previamente caracterizado y es utilizado con frecuencia en estudios *in*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vivo de carcinogénesis e intervención mediante quimioterapia. [287, 373] La combinación del carcinógeno AOM con el DSS, un polisacárido sulfato extremadamente tóxico, provoca una inflamación crónica de la mucosa del colon, lo que favorece la aparición de colitis severa y la producción de tumores inducidos por el AOM. [373]

La empresa cuenta con los permisos correspondientes, incluidos los del comité ético, para el cuidado y uso de animales destinados a la investigación biológica.

A pesar de que los datos preclínicos *in vitro* se realizaron con extractos de hongos individuales, en este modelo murino de CCR se ha ensayado la fórmula Mico-Digest 2.0®, desarrollada en Hifas da Terra, basándose en la bibliografía existente y la propia experiencia de la empresa. Los efectos de los extractos fúngicos se evaluaron mediante la monitorización de los cambios en biomarcadores relacionados con la inflamación y la microbiota intestinal.

En la Tabla 2 se detalla la composición cualitativa de la fórmula Mico-Digest 2.0® administrada a animales del grupo experimental.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Composición de la fórmula Mico-Digest 2.0® para tratamientos preclínicos *in vivo*. Composición por cada 10 ml de preparado.

Nombre científico (especie)	gramos	µl
Trametes versicolor (PSK)	0,6	--
Ganoderma lucidum	0,5	--
Grifola frondosa	0,3	--
***Agaricus blazei* Murrill**	0,3	--
Hericium erinaceus	0,5	--
Pleurotus ostreatus	0,3	--
Polyporus umbellatus	0,3	--
Lentinula edodes (lentinano)	0,015	--
Ophiocordyceps sinensis	0,3	--
Agave (*Agave sp.*)	0,8	--
Fructooligosacáridos	0,5	--
Glicina	0,3	--
Xilitol	0,2	--
Acerola (*Malpighia emarginata*)	0,2	--
Ácido cítrico	--	20
Aroma vainilla	--	20
Aroma fresa	--	20
Sorbato potásico	0,02	--
Agua		6.000
TOTAL	5,935	10.000

PSK, Polisacárido K (krestin).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.4.1 Animales y procedimiento experimental

Se emplearon 41 ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 que se repartieron en un total de 10 jaulas, a razón de 4 animales por jaula, salvo la jaula 10 que contenía 5 animales y que fueron asignados como grupo control de animales sanos. A los restantes 36 animales se les indujo un estado de colitis y cáncer colorrectal mediante una única administración por vía intraperitoneal (IP) de AOM (Sigma-Aldrich, A2853) a una dosis de 12,5 mg/kg. Los animales del grupo control recibieron en su lugar el mismo volumen IP de suero salino al 0,9 %.

Tras este tratamiento, en los grupos tratados con AOM se suplementó el agua de bebida con DSS (Sigma-Aldrich, D8906) al 3% durante una semana, tras la cual siguieron 2 semanas con agua normal. Estaba programado aplicar una segunda fase de DSS durante otra semana seguida de 2 semanas de agua. Sin embargo, y aunque las dosis de azoximetano y DSS se habían seleccionado en base a bibliografía previa, [287, 373] se tuvo que modificar el protocolo inicialmente establecido puesto que tras la primera semana con DSS por vía oral se observó una pérdida de peso excesiva en algunos animales, llegando en algún caso al máximo establecido en el permiso ético, por lo que a algunos de los ratones hubo que aplicarles un final humanitario. Por lo tanto, en lugar del tratamiento con DSS se permitió que los animales continuaran con agua normal. Tras este período de inducción de la colitis/cáncer colorrectal, los ratones del grupo experimental recibieron en el agua de bebida el compuesto prebiótico (Mico-Digest 2.0®) durante 3 meses, disuelto a una concentración estimada de 100 mg/ml.

Los grupos experimentales se resumen en la Tabla 3.

Se monitorizó 1 vez a la semana el peso corporal de cada animal, así como la ingesta de alimentos y bebida. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, los animales fueron sacrificados para la extracción de sangre y muestras de tejidos de interés, como intestino, bazo, hígado o cerebro, que fueron preservados en formaldehído o glutaraldehído al 10 % y luego almacenados por congelación a -80 ºC para posteriores análisis. El intestino en formaldehído se mantuvo a 4°C para posteriormente teñirlo con hematoxilina-eosina con el fin de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

determinar posibles cambios estructurales en su estructura debido al proceso carcinogénico y al posterior tratamiento con el prebiótico. Se determinó el promedio del peso del bazo como indicador indirecto del estado inflamatorio. Las muestras de sangre recogidas se utilizaron para la determinación de marcadores de inflamación (IL-6 y TNF-α), marcadores del perfil lipídico (colesterol y triglicéridos) y marcadores de estrés (corticosterona). Se realizó también un análisis microbiológico que permitió determinar las comunidades microbianas presentes en el intestino mediante análisis molecular del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S).

Tabla 3. Grupos experimentales en los ensayos preclínicos *in vivo*.

Grupo experimental	Procedimiento (1 semana)	Tratamiento (3 meses)	N.º animales
Animales sanos (grupo control)	Suero salino IP Agua	Agua	5
Animales con CCR (control positivo)	AOM IP DSS en agua	Agua	12
Animales con CCR (grupo experimental)	AOM IP DSS en agua	Agua + Prebiótico	12

AOM, azoximetano; CCR, cáncer colorrectal; DSS, sodio sulfato de dextrano; IP, intraperitoneal

4.4.2 Análisis de los marcadores inflamatorios

Las muestras de sangre recogidas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 horas y posteriormente se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 20 minutos para obtener el suero que fue congelado y almacenado a -20 ºC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como marcadores de inflamación principales se eligió la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). Cuando se activan los macrófagos, inician una respuesta inflamatoria al producir una amplia gama de mediadores inflamatorios y citocinas proinflamatorias. Los mediadores inflamatorios comunes y las citocinas proinflamatorias secretadas por los macrófagos incluyen el nítrico (NO), la interleucina 1 (IL - 1), la interleucina 6 (IL - 6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα). [22] La IL-6 es una proteína multifuncional que está directamente implicada en las respuestas fisiológicas tras una infección o un daño celular. Juega un papel esencial en la fase aguda de la respuesta inmune. Se produce mayoritariamente en monocitos o macrófagos y células T, aunque también es producida por las células endoteliales. La IL-6 promueve el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, y está implicada en una amplia variedad de trastornos asociados a estados inflamatorios crónicos, como por ejemplo la diabetes mellitus o el cáncer. [392] Por su parte, el TNF-α es también una citoquina inflamatoria producida por monocitos y macrófagos asociada a alteraciones producidas por procesos de inflamación crónica. El TNF-α circula a través del torrente sanguíneo en respuesta a estímulos como agentes infecciosos o daño tisular, activando a los neutrófilos y alterando las propiedades de las células endoteliales vasculares. También regula la actividad metabólica de otros tejidos. Así mismo, el TNF-α induce, en el sitio de la inflamación, la expresión de otras citoquinas (como el interferón gamma, IFN-γ), de moléculas de adhesión celular, factores antigénicos, mediadores lipídicos y la forma inducible de la enzima óxido sintetasa inducible. [266]

La cuantificación de los niveles de TNF-α e IL-6 en suero se realizó mediante el empleo de kits de ELISA comerciales: Mouse Tumor Necrosis Factor Alpha BMS607-3 (Invitrogen) e IL-6 Mouse ELISA KMC0061 (Invitrogen), respectivamente. En el empleo de estos kits se seguirán las instrucciones especificadas por el fabricante.

El ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida altamente sensible. Consiste en una placa de análisis de 96 pocillos cuya superficie ha sido previamente cubierta con un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

anticuerpo (anti TNF-α o anti IL-6, en nuestro caso). En dichos pocillos se añaden patrones específicos proporcionados por el propio kit o las muestras de suero a medir. El TNF-α o la IL-6 presente en las muestras de suero se une a los anticuerpos adheridos a la superficie de la placa. A continuación, se añade un segundo anticuerpo (anti TNF-α o anti IL-6 de ratón) conjugado con una partícula de biotina, formándose así una especie de sándwich molecular con la citoquina diana. Tras un periodo de incubación, el anticuerpo conjugado con biotina que no se ha conseguido unir a su diana se elimina de la placa a través de lavados. Finalmente, se añade un sustrato que contiene estreptavidina, la cual reacciona con la biotina originado un compuesto coloreado que se puede cuantificar por espectrometría (absorbancia a 450 nm). La intensidad del color en cada pocilla es proporcional a la cantidad de TNF-α e IL-6 presentes en la muestra de suero.

4.4.3 Marcadores de perfil lipídico y de estrés.

Otro factor indicativo del estado de salud de los ratones es la determinación de colesterol y corticosterona en el suero.

La determinación de colesterol se realizó en las muestras de suero extraídas de la sangre como se describe anteriormente para los factores de inflamación. La determinación se realizó mediante el kit *Total Cholesterol Colorimetric Assay* (Elabscience, E-BC-K109-S). Este método se basa en la cuantificación de colesterol libre y ésteres de colesterol. El éster de colesterol puede ser hidrolizado por la colesterol esterasa para producir colesterol y ácidos grasos libres. El colesterol es oxidado por la colesterol oxidasa para producir delta-4-colestenona y peróxido de hidrógeno. En presencia de 4-aminoamilpiridina y fenol, el peróxido de hidrógeno cataliza la peroxidasa para formar compuestos de quinona roja de benzoquinona imina fenizona. La intensidad de color de la quinona generada es directamente proporcional al contenido de colesterol. Midiendo los valores de absorbancia del estándar y de las muestras se calcula el contenido de colesterol en cada muestra.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El cortisol es el glucocorticoide primario producido y secretado por la corteza suprarrenal. A menudo se la conoce como la «hormona del estrés» ya que participa en la respuesta al estrés y afecta la presión arterial, los niveles de azúcar en sangre y otras acciones de adaptación al estrés. [97] Inmunológicamente, el cortisol funciona como un antiinflamatorio importante y juega un papel en la hipersensibilidad, inmunosupresión y resistencia a enfermedades. La determinación de cortisol se realizó en las muestras de suero extraídas de la sangre como se describe anteriormente para los factores de inflamación. La determinación se realizó mediante inmunoensayo, utilizando el kit *DetectX® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit* (Arbor Assays, K003-H1). Este método utiliza estándares de cortisol que, junto con las muestras, se añaden en una placa de microtitulación transparente recubierta con un anticuerpo específico para capturar anticuerpos de ratón. La reacción inmunológica se produce entre la cantidad limitante de anticuerpo monoclonal anticortisol añadido, el antígeno cortisol en la muestra o patrón y la cantidad limitante de conjugado cortisol-peroxidasa añadido. A medida que aumenta la concentración de cortisol en la muestra, la cantidad de conjugado de cortisol-peroxidasa unido disminuye, lo que provoca una disminución en la señal y viceversa. La señal se genera a partir de la cortisol-peroxidasa unida al anticuerpo anticortisol que a su vez está unido a las placas recubiertas con IgG antiratón. El exceso de cortisol-peroxidasa no se une a las placas y se elimina por lavado del pocillo antes de la adición del sustrato. La intensidad del color generado se detecta en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.

4.4.4 Caracterización de la microbiota intestinal

Se realizó un análisis para comparar las comunidades microbianas presentes en el intestino de los ratones pertenecientes a cada uno de los grupos de estudio. Para ello se empleó la metodología de secuenciación masiva mediante análisis molecular del gen 16S. El gen 16S se ha utilizado desde hace varios lustros en estudios filogenéticos, ya que su secuencia está altamente conservada entre las distintas especies de bacterias. En microbiología clínica, la identificación

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

molecular basada en el ARNr 16S permite la identificación de bacterias de una forma rápida y eficaz. [333]

Se empleó la plataforma Ion Torrent. Inicialmente se realizó la extracción del ADN y la preparación de librerías de metagenómica empleando el *16S Metagenomics kit* (Thermofisher Ref. A26216), siguiendo en todo momento las indicaciones del fabricante. Este kit amplifica 7 de las 9 regiones hipervariables del gen 16S que luego serán secuenciadas. Finalmente, los datos obtenidos se comparan con una base de datos que permite determinar el grado de similitud de las secuencias obtenidas con un amplio rango de genomas bacterianos.

Para el análisis de los resultados se ha usado el paquete de programas de Qiime2. Se realizó un análisis en conjunto de todos los amplicones (secuencias de ADN amplificadas en el proceso de preparación de las librerías genómicas) que se secuenciaron en cada uno de los ratones. A través de una sucesión de pasos con Qiime2 se obtuvieron las llamadas *amplicon sequence variant* (ASVs), antes denominados como OTUs (*Operational Taxonomic Units*), con las que finalmente se han podido realizar análisis tales como los de diversidad alfa y beta, así como perfiles taxonómicos. Para la asignación taxonómica de esas ASVs, se probaron tres estrategias todas ellas integradas en el programa de Qiime2. La que mejor funcionó fue la que usa el algoritmo de Vsearch, y con estos resultados se continuó el análisis.

Para el análisis estadístico de abundancias de taxones, se han empleado cuatro tipos de estadísticos (ANCOM, gneiss, songbird y STAMP) y los resultados obtenidos en cada uno de ellos fueron muy similares. Todos ellos excepto STAMP, se han analizado con Qiime2.

4.4.5 Análisis estadístico

La significación estadística de los valores obtenidos en los grupos (unidad de análisis) control y el grupos experimental se calculó con el *software* GraphPad Prism aplicando los test ANOVA o Kruskal-Wallis. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (SD). La significación estadística ($p<0,05$, $p<0,01$ o $p<0,001$) se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

determinó mediante el test de la distribución t de Student para comparar dos grupos de tratamiento o el test de Dunnett para comparar ambos grupos de tratamiento con el grupo control.

4.5 ENSAYO CLÍNICO – ESTUDIO PILOTO

A pesar de todos los estudios mencionados en la Introducción de esta tesis doctoral, la acción prebiótica de los constituyentes de los hongos basidiomicetos no se ha estudiado en individuos sanos ni enfermos. Si bien algunos estudios han demostrado que los extractos fúngicos pueden tener, entre otras, acciones antiinflamatorias mediante la acción sobre citoquinas en pacientes con cáncer colorrectal (CCR) avanzado, los ensayos presentan importantes limitaciones. [62] Tampoco se ha establecido la relación entre el tratamiento coadyuvante con hongos medicinales y los cambios en la estructura de la microbiota intestinal, la progresión de la enfermedad o la calidad de vida de los pacientes.

Aunque ciertos estudios han realizado la evaluación clínica de extractos fúngicos utilizados como coadyuvantes en pacientes con cáncer colorrectal (véase Introducción), en la mayor parte de estudios se ensayó un único hongo (o el componente biológico de un hongo, como es el caso de los polisacáridos PSK y PSP obtenidos de *Trametes versicolor*). [57, 367, 438] Preparaciones más complejas, como la fórmula Mico-Digest 2.0® desarrollada por Hifas da Terra necesitan todavía ser mejor evaluadas a nivel clínico.

Para suplir esta deficiencia nace el proyecto MicroMarker, un proyecto colaborativo de I+D, liderado por Hifas da Terra, en el que se evaluará la relación existente entre la modulación de la microbiota intestinal (acción prebiótica) de extractos de hongos medicinales y la progresión del cáncer colorrectal, así como los posibles efectos en la calidad de vida de estos enfermos oncológicos.

Una vez realizados los estudios *in vitro* en líneas celulares y los estudios en modelos animales de cáncer colorrectal, se realizará un ensayo clínico en Fase II para evaluar el efecto de la administración del nutracéutico Mico-Digest 2.0® (*Ganoderma lucidum, Agaricus*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

blazei Murrill, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* y *Myrciaria dubia*) previo a la intervención en las complicaciones asociadas a la cirugía colorrectal del CCR tratado con intención curativa (estudio COGOMELO 1.0). El estudio se realizará en el Hospital Universitario de Ourense (CHUO), bajo la dirección del doctor Joaquín Cubiella Fernández como investigador principal.

Dada la probada no toxicidad de los extractos fúngicos utilizados, se obvia la necesidad de realizar la Fase I previa típica de un ensayo clínico. Se tratará de un ensayo clínico aleatorizado, en doble ciego, prospectivo y multicéntrico con dos brazos: grupo control (placebo) y grupo experimental (fórmula Mico-Digest 2.0®). El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos de Galicia.

Se incluirán en este estudio un grupo relativamente homogéneo de pacientes con diagnóstico reciente de CCR en el CHUO candidatos a tratamiento quirúrgico con intención curativa (estadios I-III). Como variable principal del estudio se considerarán las complicaciones globales durante el ingreso hospitalario. Como variables secundarias se considerarán los posibles efectos adversos (EA) asociados al tratamiento, las modificaciones en la microbiota intestinal, el perfil inflamatorio y nutricional, así como la calidad de vida durante la administración del tratamiento.

4.6 FINANCIACIÓN Y COLABORACIONES

Para el presente proyecto se ha solicitado ante organismos nacionales financiación para la realización del mismo, en el marco de convocatorias competitivas como el Programa Interconecta del Centro para el Desarrollo Tecnológico e Industrial (CDTI). También se cuenta con la financiación privada de la empresa Hifas da Terra.

Para la ejecución de la Fase II del ensayo clínico se cuenta con la colaboración del Hospital Universitario de Ourense (CHUO).

La investigación clínica es promovida por Hifas da Terra con fondos aportados por el Centro para el Desarrollo Tecnológico e

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Industrial (https://hifasdaterra.com/blog/micromarker-proyecto-id-rol-modulador-hongos-microbiota-y-cancer-colorrectal/).

4.7 CONFLICTO DE INTERESES

La doctoranda forma parte del cuadro de personal de la empresa Hifas da Terra. Este trabajo ha sido financiado según se detalla en el epígrafe anterior.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5 RESULTADOS

5.1 CAPACIDAD PREBIÓTICA *IN VITRO*

Los sustratos con un índice alto de actividad prebiótica estimulan el crecimiento de las bacterias probióticas, obteniendo absorbancias similares a las obtenidas cuando dichas bacterias son cultivadas en presencia de glucosa. Por el contrario, el crecimiento de las bacterias entéricas debería ser, en teoría, mucho más bajo en presencia del sustrato a analizar que en presencia de glucosa. Usando la ecuación descrita en el epígrafe 4.3, [141] la actividad de un determinado extracto se calcula específicamente para una bacteria probiótica determinada.

En la Figura 11 se muestran gráficamente los resultados obtenidos en el ensayo de capacidades prebióticas del extracto de *Hericium erinaceus*. Tanto para *Lactobacillus plantarum* (Figura 11A) como para *Lactobacillus rhamnosus* (Figura 11B), la suplementación del medio de cultivo con glucosa (suplemento prebiótico) produjo un aumento significativo del crecimiento bacteriano con respecto al medio control no suplementado. Este crecimiento se mantiene estable a partir de las 24 h de incubación. En el caso de *Bifidobacterium adolescentis*, el crecimiento no fue apreciable hasta las 48 h de cultivo (Figura 11 C). Similar incremento, aunque en menor medida, se observó en el cultivo de *Escherichia coli* suplementado con glucosa (Figura 11D).

La adición del extracto fúngico en el cultivo de *Lactobacillus plantarum* produjo un incremento del crecimiento bacteriano con valores cercanos a los obtenidos con la adición de glucosa, y muy por encima de los valores del grupo control con medio no suplementado (Figura 11A). Similares efectos, aunque no tan

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

acusados, se observaron con la adición del extracto fúngico al cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* (Figura 11B), donde el efecto prebiótico del extracto de *Hericium erinaceus* fue sólo visible a las 48 h de incubación. El extracto del hongo también indujo un aumento del crecimiento de *Bifidobacterium adolescentis*, aunque el efecto prebiótico del extracto no fue apreciable hasta las 48 h de cultivo y se mantuvo muy por debajo del crecimiento inducido por glucosa (Figura 11C). El extracto de hongo también produjo un incremento del crecimiento de las bacterias entéricas (*Escherichia coli*), pero apenas llegó al 50 % de la estimulación causada por glucosa (Figura 11D).

En la Tabla 4 se muestran los índices de actividad prebiótica del extracto de *Hericium erinaceus* en las bacterias ensayadas. Estos valores se calcularon para cada especie de bacteria probiótica respecto a cada una de las bacterias entéricas por separado.

Tabla 4. Índice de actividad prebiótica. Actividad prebiótica del extracto de *Hericium erinaceus* en dos especies de bacterias probióticas con respecto a dos cepas de bacterias entéricas a las 24 y 48 h de cultivo.

Bacteria probiótica	Bacteria entérica	24 h	48 h	72 h*
Lactobacillus plantarum	*Escherichia coli* 343	0,379	0,157	--
	Escherichia coli 516	0,4244	0,310	--
Lactobacillus rhamnosus	*Escherichia coli* 343	0,059	0,278	--
	Escherichia coli 516	0,006	0,432	--
Bifidobacterium adolescentis	*Escherichia coli* 343	--	0,238	0,219
	Escherichia coli 516	--	0,188	0,169

*, El índice de actividad prebiótica de *Bifidobacterium adolescentis* se calculó a las 72 h respecto al crecimiento de las bacterias entéricas a las 48 h.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

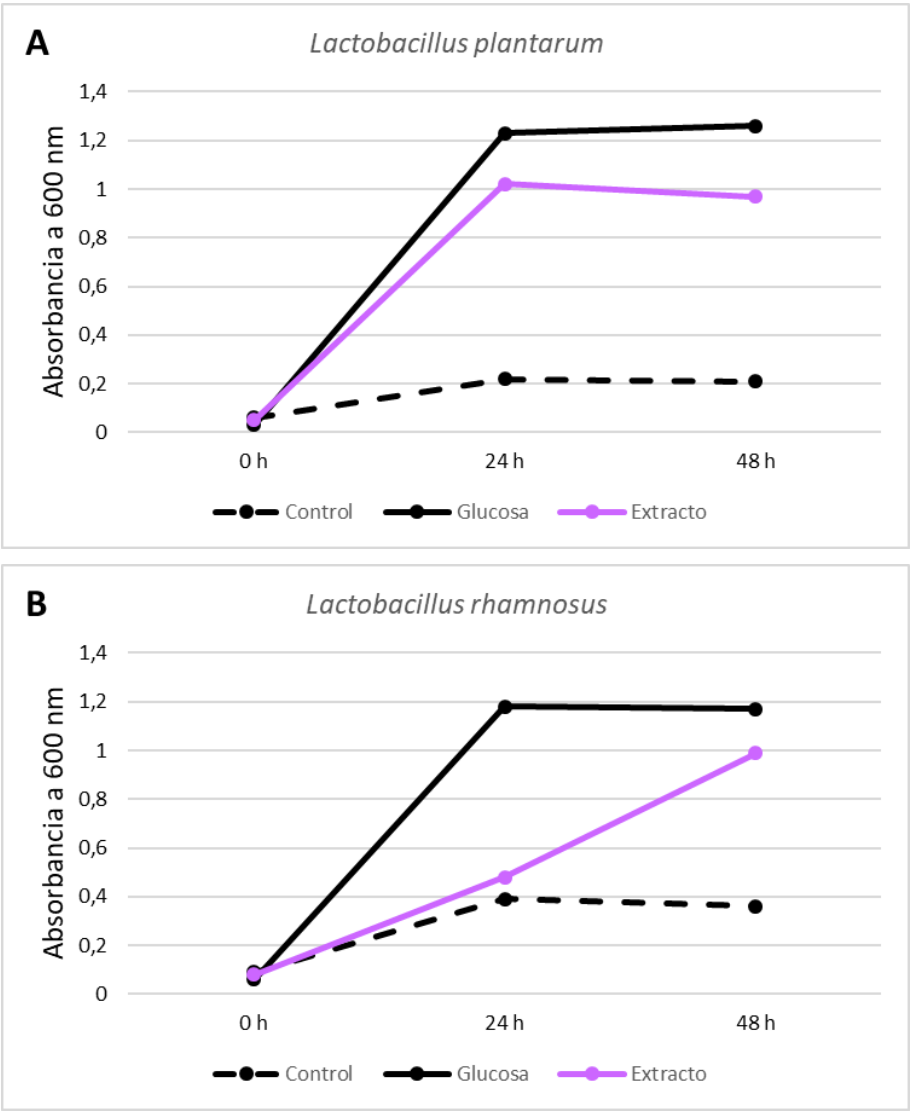
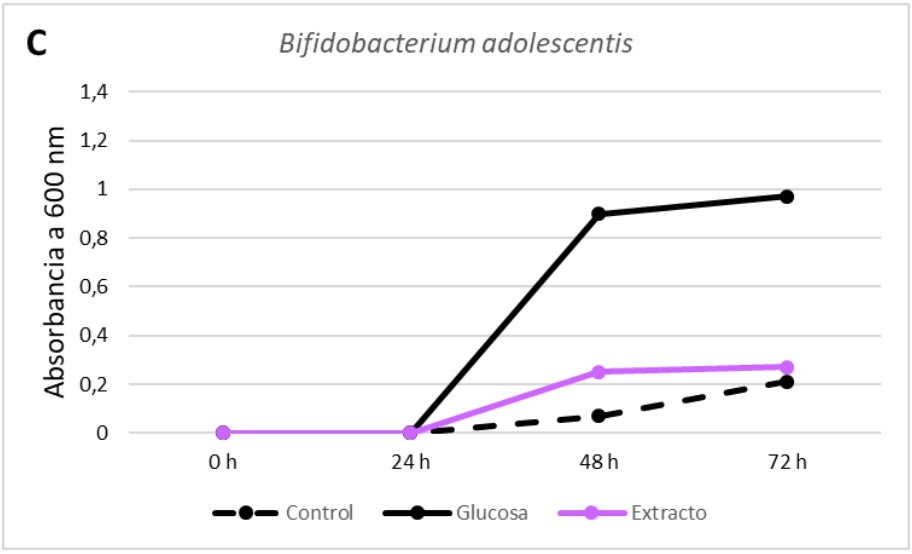


Figura 1. Actividad prebiótica *in vitro* del extracto de *Hericium erinaceus* en cultivos de las bacterias probióticas *Lactobacillus plantarum* (panel A) y *Lactobacillus rhamnosus* (panel B). Las bacterias fueron cultivadas hasta 48 horas en medio de cultivo sin suplementar (Control) o suplementado con glucosa (suplemento probiótico) o con extracto fúngico. El crecimiento bacteriano se cuantificó mediante absorbancia a 600 nm de alícuotas de los cultivos a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



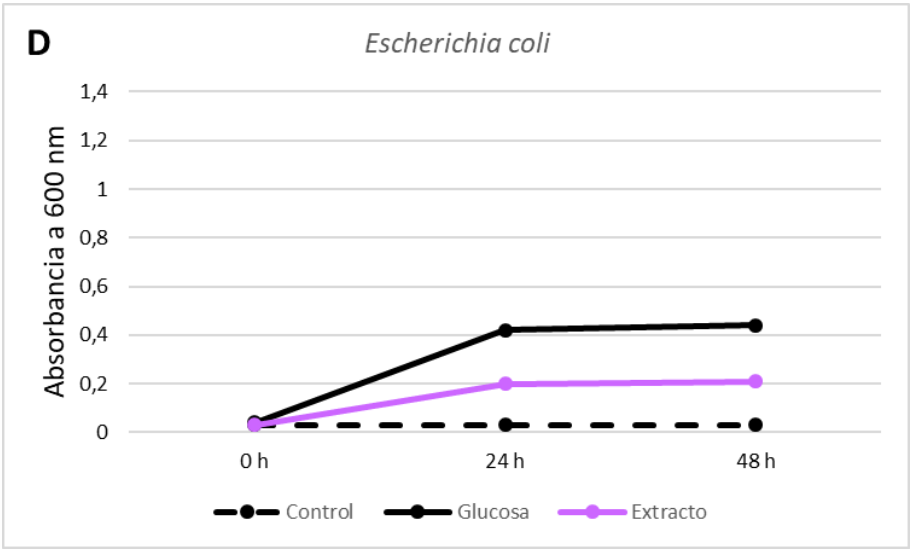


Figura 1. (Continuación) Actividad prebiótica *in vitro* del extracto de *Hericium erinaceus* en cultivos de las bacterias probióticas *Bifidobacterium adolescentis* (panel C), así como sobre la bacteria entérica *Escherichia coli* (panel D). Las bacterias fueron cultivadas hasta 48 horas en medio de cultivo sin suplementar (Control) o suplementado con glucosa (suplemento prebiótico) o con extracto fúngico. El crecimiento bacteriano se cuantificó mediante absorbancia a 600 nm de alícuotas de los cultivos a las 0 h, 24 h, 48 h y 72 h.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En general, los valores de actividad prebiótica fueron relativamente bajos para el extracto de *Hericium erinaceus*. Un valor bajo o negativo del índice de actividad probiótica indica que la cepa bacteriana crece peor en el extracto fúngico que en el prebiótico estándar (glucosa), o que crece menos que las bacterias entéricas en el mismo extracto.

Similares valores, tanto de crecimiento bacteriano como de índice de actividad prebiótica, se obtuvieron con otros cinco extractos distintos del hongo, extraídos con la misma metodología en Hifas da Terra.

Estos datos nos permiten concluir que los extractos del hongo *Hericium erinaceus* promueven en mayor medida el crecimiento de bacterias lácticas (probióticas) frente a enterobacterias.

5.2 RESULTADOS CON EL CITOCROMO P450

Los resultados, expresados en valores de la concentración inhibitoria media (IC_{50}), se detallan en la Tabla 5.

Los resultados de este estudio demostraron una baja posibilidad de interacciones medicamentosas *in vivo* entre los fármacos convencionales y los extractos fúngicos por inhibición de las enzimas CYP450.

Estos resultados están en concordancia con la ausencia de notificaciones relacionadas con reacciones alérgicas, efectos adversos de gravedad o interacciones medicamentosas asociadas a la ingesta de los diversos productos lanzados al mercado por Hifas da Terra, entre los que se encuentran productos elaborados a partir de extractos de uno o varios de los hongos analizados en este ensayo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5. Inhibición del citocromo P450. Resumen de las concentraciones inhibitorias medias de los extractos fúngicos suplementarios sobre las principales isoenzimas de la familia CYP450.

Extracto fúngico o compuesto control	IC_{50} CYP3A4 (µg/ml)	IC_{50} CYP2D6 (µg/ml)	IC_{50} CYP2C9 (µg/ml)
Trametes versicolor	> 1072	> 1072	> 1072
Grifola frondosa	> 884	> 884	> 884
Ganoderma lucidum	> 1004	> 1004	> 1004
Hericium erinaceus	> 1032	> 1032	> 1032
***Agaricus blazei* Murrill**	> 1132	> 1132	> 1132
Lentinula edodes	> 2336	> 2336	> 2336
Polyporus umbellatus	> 848	> 848	> 848
Ketoconazol (CYP3A4 control)	0,078 µM	N.A.	N.A.
Quinidina (CYP2D6 control)	N.A.	0,1 µM	N.A.
Sulfafenazol (CYP2C9 control)	N.A.	N.A.	0,48 µM

CYP450, citocromo P450; IC_{50}, concentración inhibitoria media; N.A., no aplicable.

5.3 RESULTADOS PRECLÍNICOS *IN VIVO*

5.3.1 Análisis de los marcadores inflamatorios

Durante el transcurso del procedimiento *in vivo* se indujo de forma química cáncer colorrectal en ratones (inyección de AOM intraperitoneal más DSS en el agua de bebida) y posteriormente se trataron los animales con el compuesto prebiótico seleccionado por Hifas da Terra (Mico-Digest 2.0®).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tras la inducción química del cáncer colorrectal y el posterior tratamiento oral con el compuesto con actividad prebiótica durante un periodo de 3 meses, los animales fueron sacrificados y se procedió a su sangrado y necropsia. Durante el periodo experimental algunos animales sufrieron un descenso de peso excesivo (> 20 % con respecto a su peso inicial), por lo que fue necesario sacrificarlos siguiendo el punto final humanitario establecido por el comité ético. Los animales presentaron en ocasiones hemorragias rectales y procesos diarreicos. Durante la disección de los tejidos de los animales con cáncer colorrectal, se detectó la presencia de zonas tumorales localizadas en el intestino grueso, presencia de sangre en el interior del intestino y en ocasiones pérdida de la estructura del tejido y coloración anormal.

Semanalmente se tomaron datos relativos al peso de cada ratón y la ingesta promedio por jaula tanto de bebida como de comida o bebida, con el fin de comprobar si por algún motivo se producía un rechazo del prebiótico. No se observaron alteraciones significativas de la ingesta de bebida debidas a la administración del compuesto prebiótico en el agua de bebida.

La Figura 2 representa el peso promedio por jaula de los ratones y su evolución a lo largo de las semanas de tratamiento. En el grupo control de animales sanos se observó un incremento progresivo en el peso hasta el final del ensayo. Sin embargo, en los animales en los que se indujo el cáncer se observó una caída inmediata en el peso tras el tratamiento con los químicos. Este descenso se mantuvo durante 2 semanas tras las cuales los animales que sobrevivieron consiguieron recuperar nuevamente su peso inicial e incrementaron su peso a medida que transcurrió el ensayo, independientemente de que fueran tratados con el compuesto prebiótico o no (no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos). Como era de esperar, los pesos encontrados en los animales control sanos fueron superiores a los encontrados en los animales que desarrollaron cáncer. Estas diferencias se mantuvieron incluso en los animales con cáncer tratados con el compuesto prebiótico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

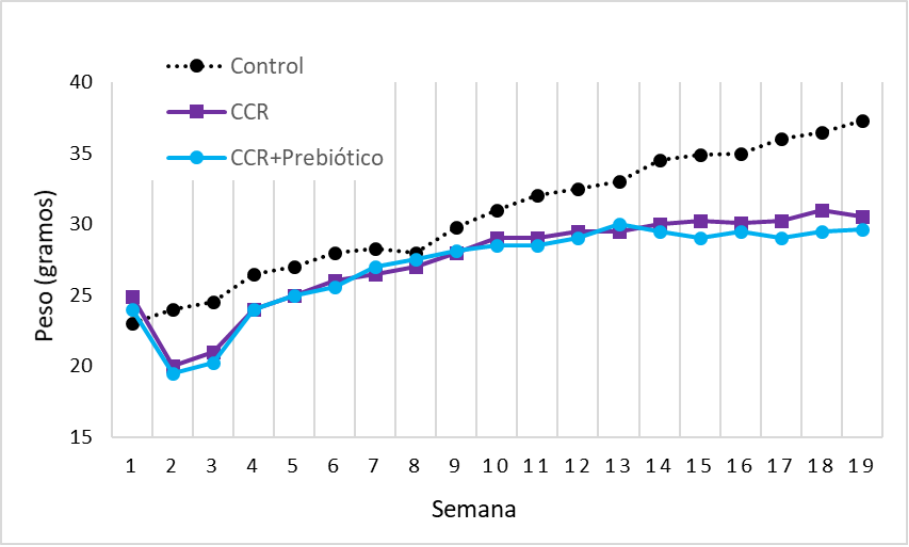


Figura 2. Evolución del peso promedio por grupo experimental en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. Los datos se expresan como la media de todos los animales en el mismo grupo experimental. N = 5 para control. N = 12 para CCR y CCR + prebiótico.

En cuanto al peso de los bazos extraídos, se observó un incremento significativo, con respecto al grupo control, en el peso de los grupos experimentales en los que se había inducido de manera química un estado de colitis ulcerosa ($p = 0.0005$ para los ratones CCR y $p = 0.0432$ para los ratones tratados con el prebiótico). Aunque la adición del prebiótico produjo una ligera disminución del estado de inflamación del bazo con respecto a los animales con cáncer sin prebiótico, las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 3.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

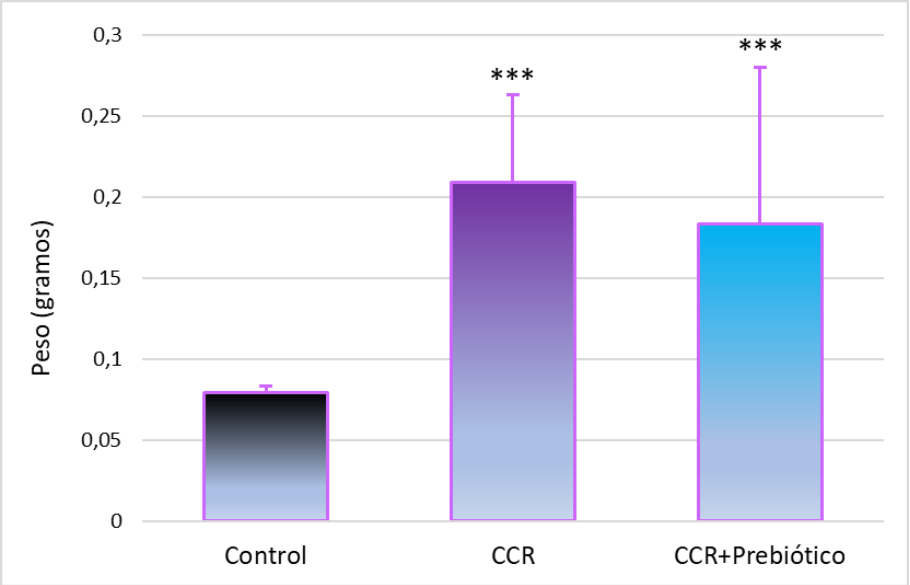


Figura 3. Promedio del peso del bazo en cada grupo experimental. Ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. Los datos se expresan como media ± SD de todos los animales en cada grupo experimental. N = 5 para control. N = 12 para CCR y CCR + prebiótico. ***, p<0,001 vs. grupo control.

Tras el sacrificio de los animales se obtuvieron muestras de suero y tejidos para los análisis de los marcadores inflamatorios.

Los resultados de la medición de IL-6 en el suero de los ratones se representa en la Figura 4. Se observó una gran variabilidad en las mediciones de los diferentes animales dentro de cada grupo de tratamiento, por lo que se aplicó el test de Grubb (α = 0,01 %) para detectar valores atípicos (*outliers*), que fueron eliminados del cálculo estadístico. Los datos seleccionados se analizaron mediante un test ANOVA de un factor y el test de Dunnett para comparar las medias de los dos grupos de ratones con CCR respecto al grupo control de ratones sanos. Las diferencias entre los ratones con cáncer tratados con prebiótico y los no tratados no fueron estadísticamente significativas (test de Dunnett), pero sí que los valores de IL-6 en

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

suero fueron estadísticamente más altos en los ratones a los que se les indujo el CCR respecto a los ratones sanos.

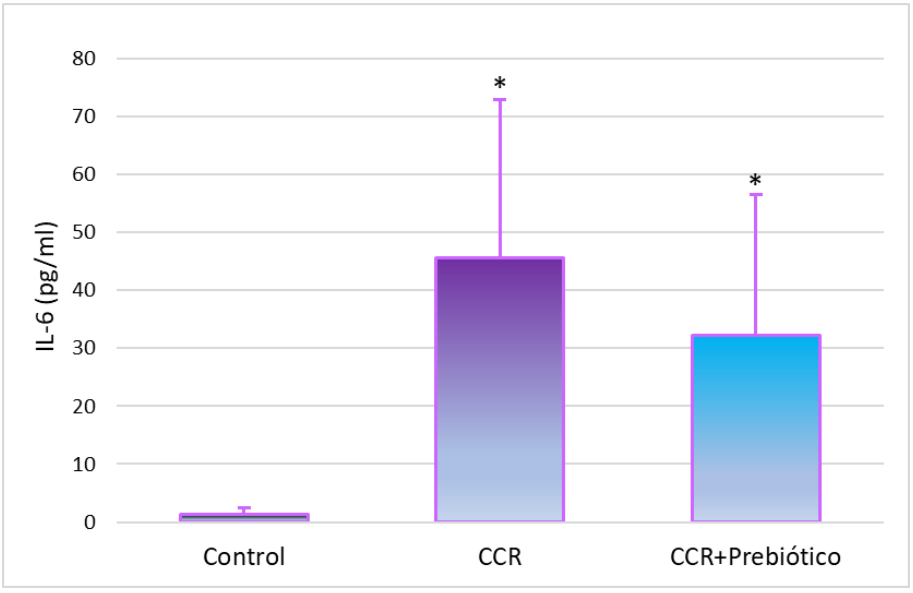


Figura 4. Valores en suero de IL-6 en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. Los datos se expresan como media ± SD de todos los animales en cada grupo experimental (dos medidas replicadas para cada animal). N = 4 para control. N = 11 para CCR y CCR + prebiótico. *, p<0,05 vs. grupo control.

De forma similar, la cuantificación de los niveles de TNF-α en suero evidencia que la presencia del prebiótico en la dieta de los ratones con cáncer produjo una ligera disminución en los niveles de este marcador inflamatorio. Sin embargo, la gran variabilidad de los datos obtenidos dentro de cada grupo experimental (en varias medidas los niveles de TNF-α en ratones sanos fueron virtualmente indetectables) no permitió establecer diferencias estadísticamente significativas (t de Student) ni entre los grupos de animales con cáncer ni entre estos y el grupo control (Figura 5).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

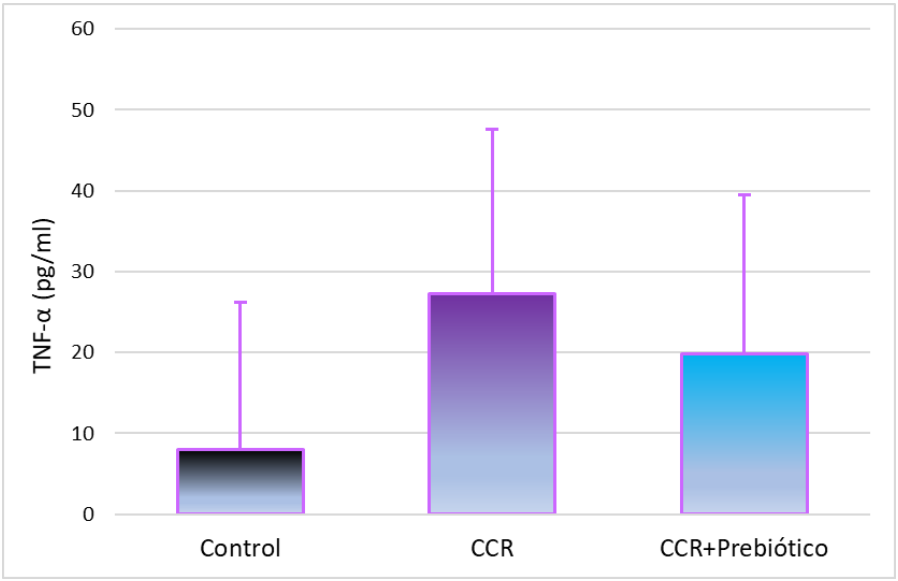


Figura 5. Valores en suero de TNF-α en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. Los datos se expresan como media ± SD de todos los animales en cada grupo experimental (dos medidas replicadas para cada animal). N = 5 para control. N = 9 para CCR. N = 10 para CCR + prebiótico.

5.3.2 Marcadores lipídicos y de estrés

En cuanto a los niveles de colesterol en el suero de los ratones, se observaron diferencias significativas entre los animales sanos del grupo control y aquellos a los que se les indujo CCR (p=0,01). Los animales con cáncer presentaron unos niveles circulantes de colesterol inferiores a los de los animales sanos, mientras que el tratamiento con el prebiótico indujo un ligero incremento en los niveles de colesterol en sangre, si bien no llegó a ser estadísticamente significativo con respecto a los animales con cáncer.

Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 6.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

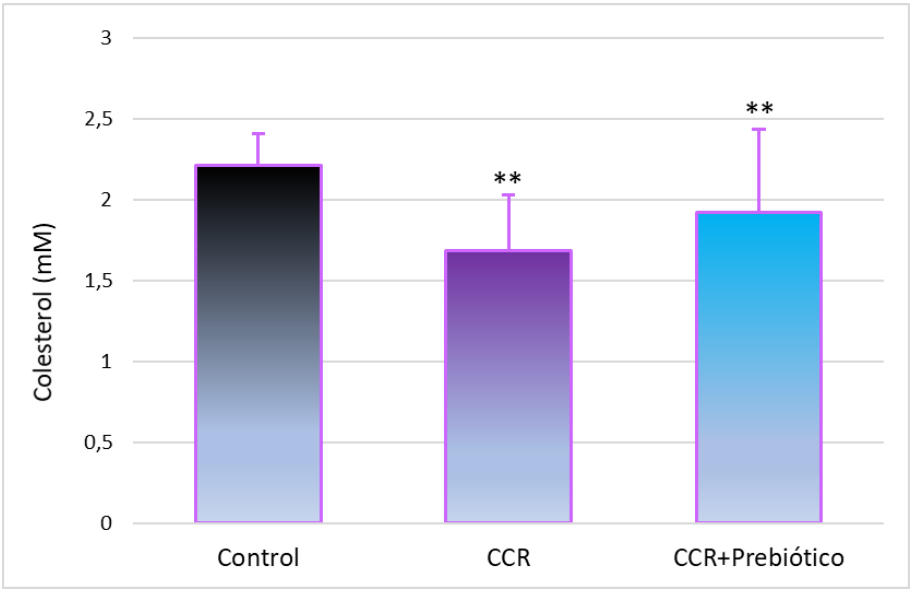


Figura 6. Valores de colesterol en suero en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. Los datos se expresan como media ± SD de todos los animales en cada grupo experimental (dos medidas replicadas para cada animal). N = 4 para control. N = 11 para CCR y CCR + prebiótico. **, p<0,01 vs. grupo control.

Los niveles de corticosterona detectados en el suero de los ratones fueron, por lo general, muy variables, incluso entre los individuos de un mismo grupo experimental. Aunque se pueda apreciar una ligera disminución en los niveles de corticosterona en los animales con CCR inducido (Figura 7), y similares entre el grupo control de animales sanos y el grupo de animales con cáncer tratados con prebiótico, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (cáncer vs. sanos, p = 0,23; cáncer vs. cáncer + prebiótico, p = 0,15; t de Student).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

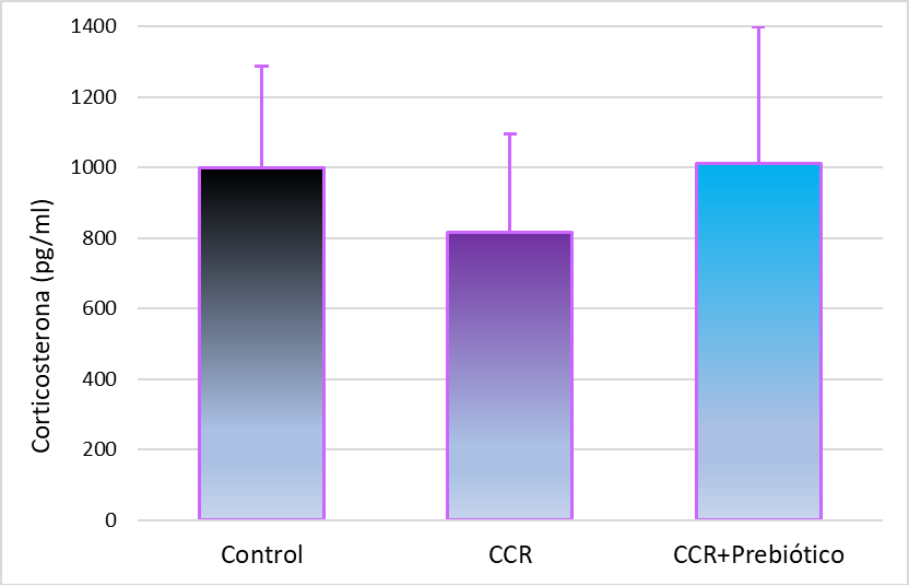


Figura 7. Valores de corticosterona en suero en ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. Los datos se expresan como media ± SD de todos los animales en cada grupo experimental (dos medidas replicadas para cada animal). N = 5 para control. N = 12 para CCR. N = 11 para CCR + prebiótico.

5.3.3 Análisis de la microbiota intestinal

Tras el análisis por secuenciación masiva de las muestras de intestino se obtuvieron las secuencias en formato FASTQ. Inicialmente se confirmó que la calidad de las lecturas (*reads*) obtenidas era la adecuada. Para ello se utilizó el software FastQC2 (Babraham Bioinformatics). Los resultados del análisis demostraron que las secuencias eran de alta calidad y se mantenían estables hasta las 280 bases. A partir de ahí se observó una ligera disminución en la calidad de los *reads*, aunque dentro de la normalidad en este tipo de análisis.

A continuación, se procedió a cortar las secuencias terminales o repetidas que podrían corresponder con los *primers* o cebadores necesarios para poder secuenciar las muestras, para evitar

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

interferencias. Concretamente fue necesario recortar las secuencias de adaptadores que flanquean ambos extremos de las secuencias FASTQ. Para eso, se usó el algoritmo BBDuk del paquete bioinformático (*suite*) BBTools 3 (DOE Joint Genome Institute) que combina las operaciones de recorte, filtrado y enmascaramiento más comunes relacionadas con la calidad de los datos en una única herramienta de alto rendimiento. Para este análisis, el algoritmo BBDuk recortó las 21 bases más a la izquierda y las 24 bases en el extremo derecho de cada secuencia (*trimming process*). Se recuperó aproximadamente el 90 % de las lecturas de cada muestra. Estas secuencias recortadas se migraron al software para el análisis metagenómico.

Para este análisis de metagenómica se utilizó el software Qiime26, que es un paquete bioinformático que permite realizar análisis de microbiomas a partir de datos de secuenciación de ADN sin procesar. [32] Qiime2 está inicialmente diseñado para procesar datos de secuenciación generados en Illumina u otras plataformas mediante la publicación de gráficos y estadísticas de calidad. En nuestro caso, dado que los datos de secuenciación provienen de bibliotecas preparadas con el kit *IonTorrent 16S Metagenomics* y luego secuenciadas con la plataforma IonTorrent, los desarrolladores de Qiime2 sugieren una *pipeline* particular que ha sido la seguida para conseguir obtener la información relevante a partir de los amplicones secuenciados. A mayores, se empleó el algoritmo DADA27 [44] para eliminar ruido, des-replicar secuencias y filtrar quimeras, como paso de control de calidad. Las secuencias no quiméricas fueron las que se emplearon finalmente para el análisis con Qiime 2.

Dicho análisis, con las 29 muestras de intestino, permitió obtener un total de 6397 ASV (*amplicon sequence variant*).

Con el fin de poder obtener medidas de diversidad filogenética, se construyó con los fragmentos de las secuencias 16S obtenidas un árbol filogenético. Dicho árbol permite tener una idea de las distancias filogenéticas entre las diferentes muestras analizadas. Este árbol se utilizó para los análisis posteriores, como el análisis de diversidad alfa y beta. La diversidad alfa permite analizar la distribución o proximidad dentro del propio grupo experimental, mientras que la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

diversidad beta estudia la distribución o proximidad entre los diferentes grupos experimentales.

Tras los análisis de diversidad alfa (Figura 8), se aplicó el estadístico H de Kruskal-Vallis. Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 6.

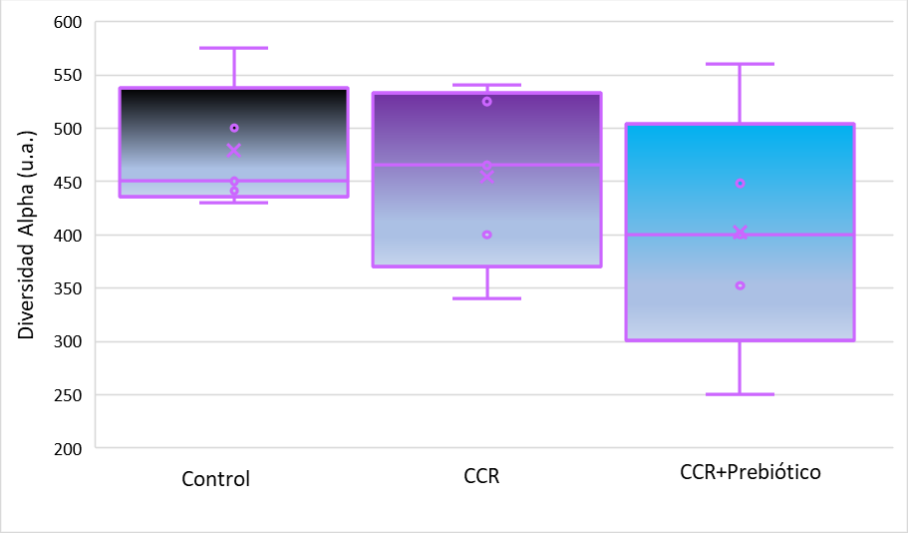


Figura 8. Diversidad alfa filogenética en la microbiota intestinal de ratones sanos (control), ratones a los que se les indujo cáncer colorrectal (CCR) y ratones tratados con prebiótico. N = 5 para control. N = 12 para CCR y CCR + prebiótico. u.a., unidades arbitrarias según métricas de *Faith Phylogenetic Diversity*.

El análisis de la Diversidad Alpha de Kruskal Wallis H estableció que no había diferencias significativas en la distribución de la diversidad filogenética entre los distintos grupos de tratamiento (p=0,319). Estos resultados indican que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos correspondientes al mismo grupo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 6. Estadísticos del análisis de la diversidad alfa.
El análisis se realizó entre cada 2 grupos mediante el test de Kruskal-Wallis H.

Grupos experimentales (número de animales)		H	p-value	q-value
CCR + Prebiótico (n = 12)	Control sanos (n = 5)	1,600	0,206	0,309
CCR + Prebiótico (n = 12)	CCR (n = 12)	1,613	0,204	0,309
Control sanos (n = 5)	CCR (n = 12)	0,000	1,000	1,000

CCR, cáncer colorrectal.

A continuación, se construyeron las curvas de rarefacción alfa, en las que se representa la diversidad alfa en función de la profundidad de muestreo. Esto permite comprobar si el muestreo realizado a la profundidad de secuencias indicada fue el idóneo para registrar toda la diversidad filogenética de las muestras analizadas. Para ello se utilizó *Qiime2 Alpha-rarefaction visualizer*, que permite calcular una o más métricas de diversidad alfa a múltiples profundidades de muestreo y determinar así la riqueza de las muestras secuenciadas. En este caso, la profundidad de muestreo se estableció en 222000 secuencias por muestra. Todas las muestras llegaron al nivel de saturación a las 40000 secuencias, lo que indicó que se trató de un muestreo adecuado para estimar correctamente la riqueza taxonómica total presente en las muestras. Es decir, aunque se incrementara el número de lecturas de las muestras no se obtendría una mayor diversidad porque se ha alcanzado el máximo de variabilidad. Se observó que el número de ASVs u OTUs para el grupo experimental CCR + Prebiótico era ligeramente inferior que el observado en los grupos CCR y control sanos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A diferencia de la diversidad alfa, el parámetro diversidad beta permite conocer la diversidad filogenética entre grupos de tratamiento. Para calcular este parámetro se analizó la composición de la muestra en el contexto de metadatos categóricos utilizando el *Permutational analysis of variance* (PERMANOVA). Esta metodología permite determinar si las distancias entre las muestras dentro de un grupo son más similares entre sí que las muestras de los otros grupos. Para calcular este parámetro, se utilizaron medidas filogenéticas de distancias UniFrac ponderadas (*Weighted UniFrac Distances*) y no ponderadas (*Unweighted UniFrac Distances*). La métrica UniFrac incorpora información filogenética calculando las longitudes totales de las ramas «no compartidas» entre dos muestras divididas por la longitud total de las ramas. La distancia UniFrac no ponderada es una medida cualitativa, que utiliza la presencia/ausencia de datos para comparar la composición de la comunidad, mientras que la distancia UniFrac ponderada es una medida cuantitativa, que también tiene en cuenta la abundancia relativa de cada tipo de organismo. El PERMANOVA se basa en permutaciones y repite cada análisis unas 999 veces.

El PERMANOVA realiza un análisis similar a test Fisher's F-ratio (pseudo-F), que se emplea en los análisis ANOVA. El análisis de las secuencias de los 3 grupos de tratamiento (ratones sanos, ratones con CCR y ratones con CCR tratados con prebiótico) rindió un valor de p=0,002 Estos resultados indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales estudiados.

Cuando estos 3 grupos se analizaron de forma pareada se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CCR + Prebiótico y Sanos (p=0,005); así como entre los grupos CCR + Prebiótico y CCCR (p=0,016); pero no entre los grupos CCR y Sanos. Además, el PERMANOVA proporciona un valor «q» adicional (valor p ajustado para pruebas múltiples) que nos indica la probabilidad de obtener un falso positivo, siendo baja para la comparativa entre CCR + Prebiótico y Sanos (q=0,015) y CCR + Prebiótico y CCCR (q=0,024); y un poco más alta para la comparativa entre CCR y Sanos (q=0,091). Los estadísticos de este análisis se resumen en la Tabla 7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Estadísticos del análisis de la diversidad beta. El análisis se realizó entre cada 2 grupos mediante el análisis PERMANOVA (999 permutaciones).

Grupos experimentales		N	pseudo-F	p-value	q-value
CCR + Prebiótico	Control sanos	17	1,891	0,005	0,015
CCR + Prebiótico	CCR	24	1,527	0,016	0,024
Control sanos	CCR	17	1,324	0,091	0,091

CCR, cáncer colorrectal; N, tamaño de la muestra (número de animales incluidos en el análisis por parejas de grupos).

En definitiva, la prueba PERMANOVA confirmó que las comunidades microbianas en el intestino de los ratones del grupo CCR + Prebiótico son estadísticamente diferentes de las comunidades microbianas de los otros dos grupos, en cuanto a la diversidad beta representada por distancias UniFrac no ponderadas.

A continuación, se realizó el llamado Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), también conocido como *Multidimensional Scaling* (MDS), generado en el *Core-Metrics-Phylogenetic*, para comparar la estructura de las comunidades de microbiomas utilizando diversidad beta. Al examinar las distancias de diversidad beta entre las veintinueve muestras a través de los gráficos de PCoA, se observó una tendencia general a que las muestras de CCR + Prebiótico se separen de las muestras pertenecientes a los otros dos grupos experimentales, lo que sugiere que la composición microbiana del grupo CCR + Prebiótico está filogenéticamente más relacionada con la de los ratones pertenecientes a su propio grupo.

Finalmente se realizó un análisis taxonómico, comparando las secuencias obtenidas en nuestro análisis con la versión más reciente de la base de datos Greengenes [248] (versión 13_8). Una vez identificados los distintos taxones, en el nivel de género, en cada grupo de ratones, se realizó una prueba de abundancia diferencial mediante el uso de 4

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estadísticos distintos: ANCOM (*Analysis of Composition of Microbiomes*), [233] GNEISS, SONGBIRD y STAMP. Todos ellos buscan diferencias entre muestras y tratan de identificar aquellos taxones cuya abundancia difiere significativamente entre los grupos.

Tabla 8. Variación de la composición de microbiota tras la suplementación con Mico-Digest 2.0 ® durante 3 meses.

Grupos experimentales	Proteobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes	Otras
CCR	21,7%	38,5%	38,6%	1,3%
CCR+Prebiótico	18,3%	39,1%	42,2%	0,4%

CCR, cáncer colorrectal

A modo de **conclusión** sobre el ensayo de secuenciación de la microbiota, se puede afirmar que los resultados obtenidos tras una serie de análisis y estadísticos para el estudio de abundancias taxonómicas diferenciales muestran que el grupo de ratones con cáncer que han sido tratados con el compuesto prebiótico difiere de forma estadísticamente significativa de los otros dos grupos (Sanos y CCR). Las familias que se expresan de forma diferencial parecen ser Bifidobacteriaceae, Erysipelotrichaceae y Clostridiaceae (concretamente el género *Candidatus* Arthromitus). Tras 3 meses de suplementación con prebióticos fúngicos observamos una reducción en proteobacterias de un 3%. Los pacientes de CCR presentan un incremento de la abundancia relativa de Proteobacteria de hasta un 22,3% (Liu, 2020), por lo que una reducción en la misma supone un inicio hacia una normalización de la microbiota del indivíduo.

Un análisis más detallado de los resultados obtenidos podría ser útil para caracterizar en más profundidad el efecto del compuesto prebiótico sobre la composición microbiana intestinal de los animales con cáncer.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4 RESULTADOS CLÍNICOS

Basados en previos estudios *in vitro*, se demostró la actividad antitumoral de los extractos de hongos medicinales fabricados por la empresa en diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal [331] (ver resultados, epígrafe 5.1). Las propiedades beneficiosas, en micología aplicada a la oncología integrativa, de los extractos de hongos desarrollados por Hifas da Terra también se han evaluado en un modelo animal de cáncer colorrectal (ver resultados, epígrafe 5.4). El siguiente paso obvio sería trasladar estos resultados preclínicos al entorno clínico para determinar los efectos de los extractos de hongos como terapia coadyuvante en enfermos oncológicos.

Con la colaboración del Hospital Universitario de Ourense (CHUO), se realizará un estudio piloto con un grupo relativamente homogéneo de pacientes de CCR. Se trata de un ensayo clínico aleatorizado, en doble ciego, con un grupo control, prospectivo y multicéntrico. Dentro del proyecto MicroMarker, se estudiará la estructura de la microbiota intestinal presente en el colon de estos pacientes, así como la modulación de esta, como consecuencia de una dieta coadyuvante con el prebiótico desarrollado por Hifas da Terra (Mico-Digest 2.0®). También se monitorizarán biomarcadores de inflamación, calidad de vida del paciente, progresión de la enfermedad oncológica y complicaciones tras la cirugía colorrectal curativa.

En la Tabla 9 se ofrece una sinopsis del protocolo del ensayo clínico. El reclutamiento de los pacientes para este ensayo clínico comenzará en abril de 2021. A continuación. se desarrolla una breve descripción del protocolo propuesto para dicho ensayo.

5.4.1 Protocolo del ensayo clínico

5.4.1.1 Hipótesis

La administración del nutracéutico Mico-Digest 2.0® a través de su efecto modulador en la microbiota y de la reducción de la inflamación sistémica puede reducir el riesgo de complicaciones de la cirugía durante el ingreso en pacientes con CCR candidatos a resección quirúrgica con intención curativa de primera intención.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1.2 Objetivos

- Objetivo principal:
  - Evaluar la tasa de complicaciones tras la cirugía del CCR tratado con intención curativa durante el ingreso hospitalario.
- Objetivos secundarios:
  - Determinar el perfil de seguridad de la administración de Mico-Digest 2.0® en los pacientes
  - Evaluar los efectos que la administración del nutracéutico tiene en la microbiota intestinal antes del ingreso.
  - Determinar el efecto que tiene Mico-Digest 2.0® en el patrón inflamatorio sistémico
  - Analizar el impacto de Mico-Digest 2.0® en el perfil nutricional y en la calidad de vida
  - Analizar el impacto de la microbiota, el patrón inflamatorio sistémico y el perfil nutricional sobre las complicaciones asociadas a la intervención quirúrgica.

5.4.1.3 Diseño del estudio

Se realizará un estudio piloto multicéntrico, aleatorizado, en doble ciego, prospectivo y en paralelo con 144 pacientes. El estudio constará de 2 brazos:

- Brazo A: Grupo control. Se le instruirá en la dieta previa a la intervención quirúrgica más el placebo.
- Brazo B: Grupo experimental. Se le instruirá en la dieta previa a la intervención quirúrgica más Mico-Digest 2.0®. La dosis será de 10 ml por cada 70 kg de peso corporal. La Tabla 9 detalla los componentes del nutracéutico utilizado en el ensayo.

A cada participante se le asignará secuencialmente un número según entre en el ensayo. Los participantes serán asignados al grupo control o experimental usando un método de aleatorización por bloques balanceada (para asegurar que los dos grupos tienen el mismo número de participantes) y estratificada (para asegurar que los dos grupos tienen pacientes de las mismas características) asistida por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ordenador. Los pacientes se estratificarán por ubicación del tumor (proximal/distal) con relación al ángulo esplénico.

Tabla 9. Formulación del nutracéutico Mico-Digest 2.0® para el ensayo clínico.

Ingredientes	mg/dosis (10,5 ml/70 kg)	Aporte
Agua	5775,00	
Jarabe de agave	840,00	
Fructooligosacáridos 90 % insulina	525,00	
Hericium erinaceus	525,00	
Lentinula edodes	420,00	
Ganoderma lucidum	420,00	
L-Glicina	315,00	
Pleurotus ostreatus	315,00	
Grifola frondosa	315,00	
Polyporus umbellatus	315,00	
Ophiocordyceps sinensis	315,00	
Inonotus obliquus	210,00	
Acerola spray jugo concentrado ECO	210,00	
Xilitol (abedul)	210,00	
Agaricus blazei Murrill	105,00	
Ácido cítrico anhidro E-330	59,53	
Vitamina C, ácido L-ascórbico	40,00	40 mg 50% VRN
Aroma fresa	28,00	
Aroma vainilla	28,00	
Sucralosa E-955	1,26	50% dosis máxima
Sorbato potásico	10,50	
Benzoato sódico	10,50	
Vitamina B3, nicotinamida	8,00	8 mg 50 % VRN
Vit. A, acetato de retinilo (325000 UI/g)	2,05	200 µg (667 UI)
Vitamina B5, pantotenato cálcico	3,26	3 mg 50% VRM
Vit. D2, ergocalciferol (40000000 UI/g)	0,01	10 µg 200 % VRM
Vit. D3, colecalciferol (100000 UI/g)	4,00	10 µg 200 % VRM
Vitamina B6, piridoxina clorhidrato	0,85	0,7 mg 50 % VRN
Vitamina B1, tiamina clorhidrato	0,70	0,55 mg 50% VRN
Vitamina B2, riboflavina	0,70	0,7 mg 50% VRN
Vitamina B9, ácido fólico, folato	0,10	100 µ 50 % VRN
Vitamina B7, biotina	0,025	25 µg 50 % VRN
Vitamina B12, cianocobalamina	0,0013	1,25 µg 50% VRN
Selenio metionina (0,5 % Se)	4,50	0,0225 mg 41 % VRN
Selenito sódico (> 45 % Se)	0,05	0,0225 mg 41 % VRN
TOTAL	12172,00	

VRN, valores de referencia de nutrientes; UI, unidades internacionales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Al ser un ensayo a doble-ciego, tanto los participantes como sus médicos y el personal que evalúa los resultados desconocerán el tratamiento recibido. Los dos tratamientos serán indistinguibles (tanto el envase como su contenido).

5.4.1.4 Población

Los pacientes seleccionados habrán sido recientemente diagnosticados de CCR y serán candidatos al tratamiento quirúrgico con intención curativa.

Los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

1. Criterios de inclusión:
   - Pacientes con CCR candidatos a tratamiento quirúrgico con intención curativa (estadios I-III II de riesgo/III).
   - Riesgo quirúrgico evaluado mediante la escala de la *American Society of Anesthesiologists' Physical Status Classification* (ASA) <3
   - Individuos mayores de 18 años y menores de 85 años.
   - ECOG 0-2.
   - Función cognitiva conservada.
   - Autorización tras lectura de hoja de información del estudio.
2. Criterios de exclusión:
   - Paciente candidato a tratamiento neoadyuvante.
   - Paciente con patología tumoral concomitante.
   - Paciente con alergia al producto suministrado o síndrome malabsortivo.
   - Pacientes con enfermedad mental.
   - Paciente con infección activa o tratamiento con antibióticos.
   - Cirugía colorrectal previa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1.5 Intervención

El tratamiento Mico-Digest 2.0® se presenta en una caja con una botella de cristal de 300ml y 30 cápsulas. La toma líquida compuesta por 2,9 g totales por toma de 10,5ml de extractos ecológicos de las especies *Hericium erinaceus, Ganoderma lucidum, Grifola frondosa, Lentinula edodes, Ophiocordyceps sinensis, Pleurotus ostreatus, Inonotus obliquus, Agaricus blazei Murrill, Polyporus umbellatus* junto con *Myrciaria dubia* ecológica, gamma ciclodextrina, fructooligosacáridos, fosfatidilserina, L-Glicina, agua purificada, jugo de agave crudo y aroma natural. La cápsula está compuesta por 100 mg de cápsula vegetal transparente, 10 billones de UFC (unidades formadoras de colonia) de *Lactobacillus brevis* y 10 billones de UFC (unidades formadoras de colonia) de *Lactobacillus plantarum*, en cápsula vegetal. Mico-Digest® está disponible en el mercado desde el año 2016 y no se han documentado efectos adversos asociados a este complemento nutricional.

El placebo se presenta en una caja con una botella idéntica a la del producto, con 300ml de líquido y 30 cápsulas. La toma líquida compuesta por agua purificada, aroma natural y néctar de agave. Gelificantes: peptina y goma guar. Conservante: Sorbato de Potasio. La cápsula contiene como gelificante, celulosa microcristalina en cápsula vegetal formada por hidroxipropilmetilcelulosa con Dióxido de Silicio como antiaglomerante.

Cada paciente tomará la primera semana 1 toma de 10,5ml y 1 cápsula (de Mico-Digest 2.0® o placebo) al día antes del desayuno o la comida. Las siguientes semanas tomará 2 tomas de 10,5ml y 2 cápsulas al día (1 toma líquida y 1 cápsula antes del desayuno y otra toma líquida y otra cápsula antes de la cena). El tratamiento se prolongará hasta el ingreso para la intervención (4-6 semanas).

La dieta previa a la intervención, según los protocolos asistenciales, se realizará con base en el riesgo de desnutrición, de forma independiente al protocolo de investigación. Para identificar a los pacientes en riesgo de desnutrición se utilizará la valoración subjetiva generada por el paciente (PG-SGA, *Patient-Generated Subjective Global Assessment*). [318] Se derivarán a la consulta de nutrición aquellos pacientes con desnutrición moderada o severa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1.6 Tamaño muestral y análisis estadístico

Para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula H_0:p1=p2 mediante una prueba Chi cuadrado unilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5 %, y asumiendo que la proporción en el grupo control es del 40 %, que se considera relevante una reducción del 50 % en el riesgo de complicaciones (20 %) en el grupo experimental, y que la proporción de unidades experimentales en el grupo de referencia respecto el total es del 50 %, será necesario incluir 64 unidades experimentales en el grupo control y 64 unidades en el grupo experimental, totalizando 128 unidades experimentales en el estudio. Estimando una tasa de abandonos es del 10 % sería necesario reclutar 72 pacientes en el grupo control y 72 pacientes en el grupo experimental, totalizando 144 unidades experimentales en el estudio. El cálculo estadístico se ha realizado mediante el software Ene 3.0.

Tanto el diseño del estudio como el plan de análisis estadístico se incluirá en el repositorio de ensayos clínicos ClinicalTrials.gov. Los cálculos estadísticos se realizarán utilizando el software SPSS 24.0. El primer paso será describir los pacientes evaluados, incluidos, adherentes al tratamiento y en los que la variable independiente (complicaciones de la cirugía) es evaluable según los criterios de la guía CONSORT. [344] Inicialmente, se realizará un análisis descriptivo de las variables incluidas en el estudio: tanto las independientes como las referidas al resultado del estudio. En las variables cualitativas los valores vacíos se clasificarán como *missing* y se expresarán como número absoluto y porcentaje sobre el total de los valores válidos. En cuanto a las variables cuantitativas, se analizarán mediante medidas de posición (medianas, rangos) para comprobar valores extremos y después se comprobará si cumplen condiciones de normalidad.

Se realizará un análisis inferencial para comprobar si existen diferencias entre los dos grupos (control, tratamiento) en las variables independientes basales incluidas en el estudio. Dicho análisis se realizará mediante análisis univariante: test de Chi-cuadrado para las variables cualitativas (o ANOVA si tienen más de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

dos categorías) y prueba de t de Student para variables cuantitativas si cumplen criterios de normalidad (en caso negativo, se utilizará la U de Mann-Whitney).

A continuación, se describe el análisis estadístico que se realizará para cada uno de los objetivos establecidos en el protocolo del estudio.

1. Tasa de complicaciones tras la cirugía. Se describirán la tasa de complicaciones en cada grupo tanto de forma global como por nivel de gravedad y por tipo de complicación, con especial referencia a los fallos de anastomosis y a las infecciones del sitio quirúrgico. Para determinar si existen diferencias entre los dos grupos se utilizará el test de Chi-cuadrado estratificando por la ubicación del tumor. Las diferencias se expresarán como razón de riesgos (RR) y su intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %) y la diferencia absoluta de riesgos con su IC 95 %. Se considerará que la diferencia es estadísticamente significativa si $p<0.05$.
2. Perfil de seguridad. Se describirán los acontecimientos adversos (cualquiera, leves, graves) en cada grupo. Para determinar si existen diferencias entre los dos grupos se utilizará el test de Chi-cuadrado estratificando por la ubicación del tumor. Las diferencias se expresarán como razón de riesgos (RR) y su intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %) y la diferencia absoluta de riesgos con su IC 95 %. Se considerará que la diferencia es estadísticamente significativa si $p<0.05$.
3. Modificación de la microbiota intestinal. Dentro del análisis bioinformático de la microbiota se evaluará las modificaciones que la intervención realiza en los índices de diversidad, la abundancia relativa y los componentes principales utilizando la prueba de McNemar en las variables cualitativas y la t de Student para pruebas relacionadas.
4. Modificación del patrón inflamatorio sistémico. Para analizar las modificaciones que produce la intervención en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el patrón inflamatorio, se utilizará la t de Student si las variables tienen distribución normal y la T de Wilcoxon si las variables no son paramétricas.

5. Modificación del perfil nutricional y la calidad de vida. De forma similar, determinaremos las modificaciones que la administración de Mico-Digest 2.0® produce en el perfil nutricional y la calidad de vida mediante test que evalúen el cambio intrasujeto: McNemar para las cualitativas y t de Student para las cuantitativas.
6. Analizar el impacto de la microbiota, el patrón inflamatorio sistémico y el perfil nutricional sobre las complicaciones asociadas a la intervención quirúrgica.

Finalmente, determinaremos qué variables se asocian de forma significativa con la aparición de complicaciones tras la cirugía (global, leves, graves, fallo de la anastomosis, infección del sitio quirúrgico). Se realizará inicialmente un análisis univariante para determinar las variables con relación estadísticamente significativa. Introduciremos aquellas variables con una relación estadísticamente significativa ($p<0.05$) y las clínicamente relevantes en un modelo de regresión logística multivariante. Se escogerá el modelo predictivo final en función del grado de verosimilitud (*likelihood ratio*), el área debajo de la curva y los estadísticos informativos: *Akaike y Bayesian Information Criterion*. Finalmente se realizará una validación interna mediante técnicas de remuestreo (*bootstrapping*).

5.4.1.7 Esquema del estudio

El esquema de seguimiento del estudio se muestra gráficamente en la Figura 9.

El régimen de visitas será el siguiente:

- Visita 0 o de reclutamiento. Esta primera visita coincidirá con la cita en la Consulta de Alto Riesgo y Oncología Digestiva para informarle del diagnóstico y estadificación del tumor antes de la presentación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en comisión de tumores. A los pacientes que cumplan los criterios de inclusión se les informará respecto a la realización del estudio clínico, así como de las características de este. Se revisarán los criterios de inclusión y exclusión, se le dará una hoja de información al paciente, un formulario de consentimiento informado y un dispositivo para recoger una muestra de heces a nivel domiciliario.

- Visita 1 o de inicio del tratamiento. Esta consulta se realizará a la semana de la visita 0 coincidiendo con la cita en la Consulta de Cirugía Colorrectal tras la evaluación y la decisión tomada en la comisión de tumores. Si el paciente acepta participar en el estudio, se recogerá la historia clínica previa, se realizará la evaluación nutricional, la calidad de vida, se tomará una muestra sanguínea para la determinación del perfil nutricional e inflamatorio y se recogerá la muestra fecal que el paciente habrá traído. Se procederá a la aleatorización del paciente a uno de los dos brazos del estudio (placebo o experimental).
- Visitas de seguimiento. Las visitas de seguimiento tendrán periodicidad semanal y se realizarán de modo no presencial. En dichas visitas se revisará el cumplimiento del tratamiento, así como los efectos adversos que hayan aparecido.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

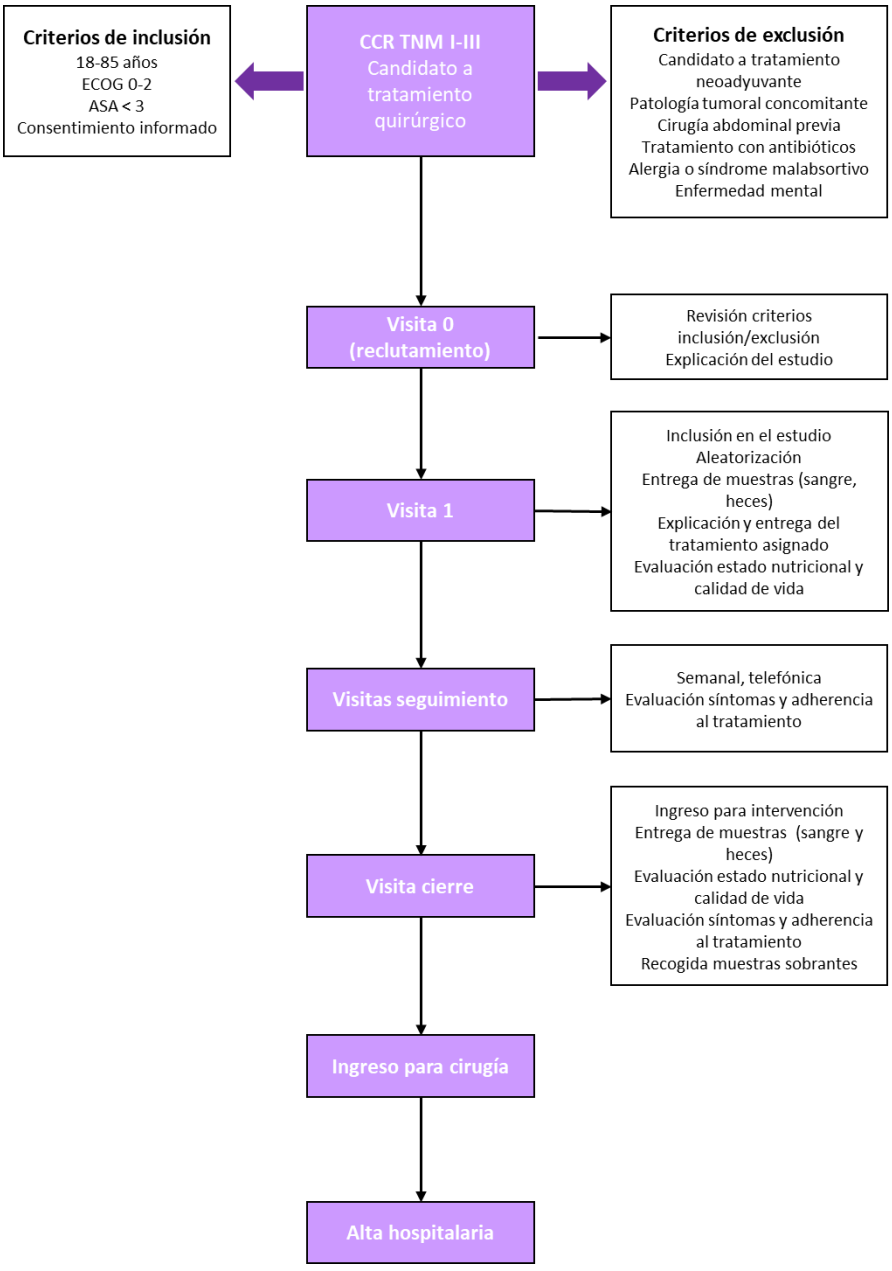


Figura 9. Esquema de seguimiento del estudio clínico. ASA, American Society of Anesthesiologists' Physical Status Classification; CCR, cáncer colorrectal; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; TNM, estadio Tumor-Node-Metastases.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Visita de cierre. La visita de cierre coincidirá con el ingreso hospitalario. En esta visita, se realizará una analítica sanguínea, se recogerá la muestra fecal, el tratamiento restante no utilizado, se realizará una nueva evaluación nutricional y se determinará la presencia de efectos adversos. En este momento se cerrará la intervención.
- Alta hospitalaria. En el momento del alta, se recogerá el tiempo de ingreso, el status vital al alta (vivo/muerto), el tipo de cirugía realizada, las complicaciones desarrolladas (tipo, fecha) y clasificadas mediante la clasificación Clavien-Dindo [68] y, finalmente, el estadio TNM final (histología para la invasión mural y adenopática y por pruebas de imagen/histología para la enfermedad metastásica)

5.4.1.8 Actividades y determinaciones

Durante las distintas etapas del estudio se realizarán las siguientes actividades y determinaciones:

- Historia clínica. En el momento de la valoración inicial se recogerán los datos referidos a los criterios de inclusión/exclusión, las variables demográficas, el motivo de diagnóstico, el tipo y duración de los síntomas y la ubicación y estadio previo a la intervención del tumor. En el momento del alta hospitalaria se recogerá el tipo de intervención, tiempo de ingreso, aparición de complicaciones, tipo de clasificaciones (fallo de anastomosis, infección quirúrgica, íleo prolongado, complicaciones sistémicas y otras), clasificación de la gravedad de las mismas usando la clasificación Clavien-Dindo [68] (leves, I-II; graves, III-V) y la situación del paciente en el momento del alta hospitalaria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Examen físico. Se realizarán valoraciones antropométricas para evaluar el grado de nutrición: peso, talla, índice de masa corporal y porcentaje de masa grasa.
- Evaluación nutricional. La evaluación nutricional se realizará en base a la PG-SGA, la evaluación antropométrica y la determinación sérica de albúmina, prealbúmina, linfocitos totales y hemoglobina.
- Encuesta de calidad de vida. Utilizaremos para evaluar la calidad de vida el cuestionario SF-36® validado en nuestro medio y utilizado para evaluar la calidad de vida de pacientes con CCR. [308]
- Evaluación del cumplimiento del tratamiento. En el momento de la inclusión se entregarán tres cajas del tratamiento asignado con una duración estimada de tratamiento de 48 días. En las visitas de seguimiento, se interrogará al paciente sobre el cumplimiento y el número de tomas y cápsulas restantes. En la visita de cierre, el paciente deberá devolver los envases suministrados no utilizados, procediéndose al registro en el cuaderno de recogida de datos.
- Eventos adversos (EA). Se registrará cualquier circunstancia que pudiera ser considerada como evento adverso, así como sus características (inicio, fin, etc.). Se recogerán los eventos adversos, así como su gravedad utilizando las indicaciones de la *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) versión 5.0. [265]
- Análisis de sangre. Se procederá a la extracción de la muestra sanguínea, manipulación, alicuotación y conservación a -20 ºC hasta su análisis. Se determinarán factores asociados a la respuesta inmune: hemograma y citoquinas para establecer indicadores

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de respuesta inflamatoria sistémica: proteína C reactiva, índice Neutrófilo/Linfocito, TNF-alfa e IL-6.

- Microbiota en heces. Con el objetivo de preservar la microbiota anaerobia, utilizaremos el kit de recogida GutAlive® diseñado para preservar la flora anaerobia. Esta muestra se recogerá y se almacenará a -20ºC hasta su análisis. Para cada una de las muestras se realizará una extracción de ADN total, y se secuenciará la región 16S del ARNr bacteriano, mediante la plataforma MiSeq de Illumina. El análisis bioinformático posterior permitirá identificar y clasificar las secuencias y extraer las OTUs (*operational taxonomic units*), antes de determinar los índices de diversidad, la abundancia relativa, y realizar un análisis de componentes principales.

5.4.1.9 Consideraciones éticas y confidencialidad

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con las normativas internacionales sobre estudios clínicos: la declaración de Helsinki en su última versión revisada y normas de buena práctica clínica. El estudio sólo comenzará tras haber obtenido por escrito la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente antes del comienzo del estudio. Con la excepción de aquellas situaciones de emergencia, no se permitirán cambios o desviaciones del protocolo sin la aprobación documentada. El Comité Ético de Investigación Clínica deberá ser informado de los posibles cambios y enmiendas y aprobará por escrito cualquier cambio o desviación que pueda aumentar los riesgos del sujeto y/o pueda afectar adversamente los derechos del paciente o la validez de la investigación.

Toda la información relativa a los datos de los pacientes incluidos en el estudio será estrictamente confidencial conforme con al reglamento general de protección de datos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.1.10 Cronograma

El ensayo clínico empezó en 2021, de acuerdo con el siguiente cronograma:

- Periodo de inclusión: abril de 2021 a septiembre de 2022.

Tabla 10. Sinopsis del protocolo del ensayo clínico.

Descripción del estudio	Ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, en doble ciego para evaluar el efecto de la administración del nutracéutico Mico-Digest 2.0® previo a la intervención en las complicaciones asociadas a la cirugía colorrectal del cáncer colorrectal tratado con intención curativa.		
Código	COGOMELO 1.0		
Promotor	**Hifas da Terra**		
Nombre del producto:	Mico-Digest 2.0®		
Principio activo:	Extractos ecológicos certificados de hongos medicinales (*Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Polyporus umbellatus*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Inonotus obliquus*, *Agaricus blazei Murrill*) y *Myrciaria dubia*.		
Centros	Complejo Hospital Universitario de Orense (CHUO)		
Investigador principal	Dr. Joaquín Cubiella Fernández		
CEIC	Comité de Ética de Investigación con Medicamentos de Galicia		
Duración del estudio	6 meses		
Fecha de inicio	04/2021	Fecha de finalización	09/2021
Fase	fase II		
Objetivos	Principal: • Evaluar la tasa de complicaciones tras la cirugía del CCR tratado con intención curativa durante el ingreso. Secundarios: • Evaluar los efectos que la administración del nutracéutico tiene en la microbiota intestinal antes del ingreso. • Determinar el efecto que tiene Mico-Digest 2.0® en el patrón inflamatorio sistémico.		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	• Analizar el impacto de Mico-Digest 2.0® en el perfil nutricional y en la calidad de vida. • Analizar el impacto de la microbiota, el patrón inflamatorio sistémico y el perfil nutricional sobre las complicaciones asociadas a la intervención quirúrgica.
Diseño	Ensayo clínico aleatorizado doble ciego con aleatorización por bloques y estratificada (CCR proximal/distal al ángulo esplénico).
Patología en estudio	Cáncer colorrectal (CCR) candidato al tratamiento quirúrgico de primera intervención con intención curativa.
Población a estudio	Pacientes con diagnostico reciente en el CHUO
Número de sujetos	72 pacientes en cada grupo
Criterios de inclusión	• Pacientes con CCR (estadios I-III) candidatos a tratamiento quirúrgico con intención curativa. • Riesgo quirúrgico evaluado mediante la escala de la *American Society of Anesthesiologists' Physical Status Classification* (ASA) <3. • Individuos mayores de 18 años y menores de 85 años. • ECOG 0-2. • Función cognitiva conservada. • Autorización tras lectura de hoja de información del estudio.
Criterios de exclusión	• Paciente candidato a tratamiento neoadyuvante. • Paciente con patología tumoral concomitante. • Paciente con alergia al producto suministrado o síndrome malabsortivo. • Pacientes con enfermedad mental. • Paciente con infección activa o tratamiento con antibióticos. • Cirugía colorrectal previa.
Tratamiento	El grupo de tratamiento recibirá el nutracéutico Mico-Digest 2.0® y el grupo control recibirá un placebo.
Dosis y posología	10,5 ml de nutracéutico por cada 70 kg de peso corporal. Cada paciente tomará la primera semana 1 toma de 10,5ml y 1 cápsula (de Mico-Digest 2.0® o placebo) al día antes del desayuno o la comida, las siguientes semanas tomará 2 tomas de 10,5ml y 2 cápsulas al día (1 toma de 10,5ml y 1 cápsula antes del desayuno y otra toma de 10,5ml y otra cápsula antes de la cena). El tratamiento se prolongará hasta el ingreso para la intervención (4-6 semanas).
Régimen de visita:	1. Visita de reclutamiento. 2. Visita de inicio del tratamiento.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	3. Visitas de seguimiento. 4. Visita de cierre. 5. Alta hospitalaria
Tratamiento de rescate	No se contempla
Variables del estudio	Variable principal: • Complicaciones globales durante el ingreso hospitalario. Variables secundarias: • Complicaciones (graves/leves, fallo anastomosis/ infección del sitio quirúrgico). • Efectos adversos asociados al tratamiento. • Modificaciones en la microbiota intestinal, perfil inflamatorio, perfil nutricional y calidad de vida durante la administración del tratamiento.
Seguridad:	Registro de eventos adversos (EA)
Control de calidad:	Según la normativa interna del promotor y el centro del estudio.
Tratamiento estadístico:	Análisis descriptivo de los pacientes incluidos/excluidos/ tratamiento realizado y de las variables de los pacientes incluidos. Análisis inferencial según la intención de tratar y por tratamiento realizado. Principal: • Tasa de complicaciones: Chi-cuadrado, RR y RAR. Secundarios: • Perfil de seguridad: Chi cuadrado, RR y RAR. • Microbiota intestinal: Medidas de cambio intrasujeto. • Patrón inflamatorio sistémico: ídem. • Perfil nutricional y calidad de vida: ídem. • Factores asociados a las complicaciones quirúrgicas: regresión logística.
Aspectos éticos y legales:	El estudio se realizará de acuerdo con las normativas internacionales sobre estudios clínicos: declaración de Helsinki, normas de Buena Práctica Clínica y autorización del CEIC correspondiente. Se seguirán las guías de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).

CCR, cáncer colorrectal; CEIC, comité ético de investigación clínica; RAR, reducción absoluta del riesgo; RR, riesgo relativo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6 DISCUSIÓN

6.1 PRÓLOGO

Cada año, más de 10 millones de personas son diagnosticadas de cáncer. El pronóstico para el año 2020 calculó 6 millones de defunciones anuales debidas al cáncer, lo que supone el 12 % de las muertes en todo el mundo. El cáncer se ha convertido en la enfermedad mortal más importante de la actualidad. Dentro del total de muertes por cáncer, el cáncer colorrectal (CCR) supone el 9,2 %. [83, 176, 299, 349, 350, 361, 418, 425] De hecho, el CCR es una de las enfermedades más comunes en los países desarrollados y una de las principales causas de mortalidad, [154, 331, 361] un fenómeno asociado entre otros factores a la ingesta excesiva de calorías y al incremento de la obesidad en las sociedades occidentales. [172] Además de la quimioterapia y la radioterapia, la mayoría de los pacientes con CCR son sometidos a cirugía. Pero aproximadamente el 50 % desarrollan recurrencia [286] y alrededor del 90 % de las muertes relacionadas con cáncer colorrectal son debidas a metástasis. [483] Por lo tanto, resulta evidente que se requieren nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad. Una de estas nuevas estrategias es la que ofrece la micoterapia aplicada a la oncología integrativa.

Desde sus albores, la humanidad ha utilizado los hongos como nutrientes, como agentes de fermentación y como medicinas. [109, 216, 251, 253, 367, 418] Pero en las últimas décadas los hongos han demostrado su capacidad de actuar como nutracéuticos, como complementos nutricionales y farmacológicos que proporcionan beneficios médicos para la salud, actuando como coadyuvantes a la terapia convencional. [169, 249, 362] Los hongos se han convertido gracias a las investigaciones más recientes en una maravillosa fuente de compuestos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bioterapéuticos: antioxidantes, anticancerígenos, prebióticos, diuréticos, inmuno-moduladores, antiinflamatorios, antimicrobianos, etc. [48, 56, 105, 109, 180, 219, 236, 249, 253, 269, 277, 291, 292, 299, 311, 320, 324, 341, 353, 364, 394, 415, 416, 418, 435, 443, 482, 488, 492] Por lo tanto, el valor terapéutico de los hongos no reside sólo en sus constituyentes nutricionales, sino en todas estas moléculas bioactivas, como los β-glucanos, que cumplen funciones terapéuticas específicas. [105, 249, 277] Diversas especies de hongos, sobre todo basidiomicetos, han mostrado generar en sus cuerpos fructíferos o en sus micelios compuestos anticancerígenos capaces de inhibir la proliferación celular y la angiogénesis, además de promover la apoptosis. A lo que tenemos que añadir sus efectos en la salud emocional, un factor muy importante en la gestión del paciente oncológico. Por otra parte, los hongos también han mostrado una amplia gama de propiedades inmunoestimuladoras e inmunoreguladoras, los que puede resultar de vital importancia para la salud pública en una época caracterizada por el aumento de las afecciones autoinmunes. [57, 109, 183, 200, 253, 268, 269, 270, 299] Además, los hongos pueden ser agregados fácilmente a la dieta diaria al ingerirse por vía oral. Esto, junto con su baja toxicidad y la ausencia de EA graves, supone un enfoque seguro y útil para el tratamiento de muchas enfermedades. [253]

Como se ha recogido en la Introducción de esta tesis doctoral, existe un considerable número de estudios que avalan el uso de los hongos medicinales y sus extractos para mejorar los resultados de los tratamientos oncológicos. [109, 299] Además de aumentar la efectividad del tratamiento convencional, pueden mejorar el estado de salud del paciente, su supervivencia, su calidad de vida, así como paliar los efectos adversos de la quimioterapia, de la radioterapia y de la cirugía de resección curativa. Además, la micoterapia paliativa contribuye a la detoxificación farmacológica y a la disminución de la inflamación y las sensaciones dolorosas. [489]

6.2 ENSAYOS PRECLÍNICOS *IN VITRO*

Los resultados de los ensayos preclínicos in vitro realizados con estos mismos extractos en el INHIBIC, Roca-Lema D, (2016) demuestran un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

efecto antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de colon humano de los extractos ricos en polisacáridos obtenidos a partir de los hongos *Trametes versicolor, Grifola frondosa, Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum.*[331] Los extractos ensayados afectaron a la viabilidad celular, la proliferación celular, la migración celular y la capacidad invasiva de las células, además de presentar efectos citotóxicos. Los resultados permitieron establecer valores de IC_{50} de estos compuestos y confirmaron los resultados obtenidos por otros grupos de investigación.

En el presente estudio, el extracto de *Trametes versicolor* mostró un efecto citotóxico *in vitro* en células LoVo (carcinoma humano) con un valor de IC_{50} de 224 μg/ml. De forma similar a nuestros resultados, el extracto alcohólico del cuerpo fructífero de *Trametes versicolor* exhibió una citotoxicidad dependiente de la concentración en líneas celulares tumorales MCF-7 (cáncer de mama) y HepG2 (carcinoma hepático) con valores de IC_{50} de 123,5 μg/ml y 134,3 μg/ml, respectivamente, sin actividad citotóxica evidente en células normales MRC-5 (fibroblastos pulmonares). [148] También inhibió la proliferación celular de células de cáncer hepático humano in vitro con un IC_{50} de 4,25 μg/ml. [43] Se ha descrito que el extracto rico en polisacáridos del cuerpo fructífero de *Trametes versicolor* inhibió la proliferación celular de líneas celulares de cáncer de hígado (células 7703) y cáncer de mama (células T-47D) humanos con unos valores de IC_{50} de 18,4 μg/ml y 9,29 μg/ml, respectivamente. [493] Un extracto hidroalcohólico de este hongo inhibió la proliferación celular en cultivos de células HL-60 con un IC_{50} de 150,6 μg/ml. [126]

En la sección de Resultados hemos visto que la incubación con extractos de *Trametes versicolor* produjo en células LoVo en cultivo hasta un 45 % de inhibición de la proliferación celular, mientras que el extracto de *Grifola frondosa* alcanzó un 80 % de inhibición a la máxima concentración ensayada (100 μg/ml). No se observó efecto inhibidor o citotóxico en células epiteliales no tumorales (células MDCK). Otros autores han reportado resultados muy similares. Así, en un ensayo de citotoxicidad con MTT, el extracto de *Trametes versicolor* inhibió la proliferación de células HeLa en un 71,5 %, mientras que el extracto de *Trametes trogii* (*Funalia trogii*) lo hizo en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

un 45 %. [393] El extracto hidroalcohólico de *Trametes versicolor* también mostró tener efectos citotóxicos en un ensayo similar (con MTT) en células HL-60 (leucemia), IC_{50} de 147,3 μg/ml; en células Raji (linfoma B), IC_{50} de 253,8 μg/ml; y en células NB-4 (leucémicas), IC_{50} de 269,3 μg/ml. El extracto no tuvo ningún efecto significativo en células WRL, células normales de hígado, con un IC_{50} > 800 μg/ml. [197] El extracto metílico de *Trametes versicolor* inhibió la proliferación de varias líneas celulares de tumores sólidos a concentraciones por debajo de los 45 μg/ml. [359] Estos valores de inhibición celular están dentro de rangos similares a los obtenidos en nuestros resultados.

Nuestro estudio demostró unos efectos citotóxicos del extracto de *Ganoderma lucidum* sobre células LoVo con unos valores de IC_{50} de 817,13 μg/ml y 6,9 μg/ml a las 24 y 72 horas de incubación, respectivamente. De forma similar, un estudio también con *Ganoderma lucidum* y células LoVo reportó un efecto citotóxico con valores de IC_{50} de 6.940 μg/ml y 630 μg/ml a las 24 y 72 horas. Los autores también reportaron inhibición de la migración celular e inducción de la apoptosis a través de mecanismos dependientes de caspasas. [215]

La incubación de células LoVo con extracto de *Pleurotus ostreatus* inhibió la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis. Las capacidades antiproliferativas de este género de hongos han sido mostradas en otros estudios. Por ejemplo, un extracto proteico del cuerpo fructífero de *Pleurotus eryngii* inhibió la proliferación tumoral y mostró actividad citotóxica significativa en diversas líneas tumorales humanas *in vitro*, sin que se observasen efectos tóxicos en una línea de células hepáticos no tumorales. Además, el extracto de *Pleurotus eryngii* estimuló la actividad lisosomal y pinocítica de estas células, así como la producción de NO (óxido nítrico) y peróxido de hidrógeno en células RAW 264.7 (una línea de macrófagos murinos). [235]

La invasión tumoral y la metástasis está asociada, entre otras rutas intracelulares, a la activación de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP). Se trata de una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que intervienen en la degradación proteolítica de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la matriz extracelular y de los receptores de membrana. [81, 101] En nuestro estudio, la incubación de células LoVo con extractos de *Trametes versicolor* y *Grifola frondosa* durante 72 horas produjo una disminución estadísticamente significativa de la actividad de la proteína MMP-2. De forma similar, el extracto de *Agaricus blazei* Murrill ha demostrado ser capaz de reducir los niveles de MMP-9 en una línea de células de carcinoma hepático y en un modelo murino *in vivo*. [274] Esta actividad inhibitoria sobre las metaloproteinasas sería uno de los muchos mecanismos activados por los hongos medicinales para ejercer sus efectos anticancerígenos.

Los resultados mostraron un efecto potenciador de los extractos de *Trametes versicolor* y *Grifola frondosa* del efecto citotóxico *in vitro* del 5-fluorouracilo (5-FU). En la actualidad, el 5-FU se considera un fármaco importante en el tratamiento quimioterapéutico de los cánceres gastrointestinales. Sin embargo, su eficacia es limitada y a menudo las células cancerosas gástricas desarrollan resistencia al fármaco. [48] Los resultados sobre líneas celulares apoyan la posibilidad de utilizar los extractos de hongos como coadyuvantes para aumentar la eficacia de los tratamientos convencionales. En este sentido, el tratamiento combinado de PSK con docetaxel (quimioterapia) induce una mayor supresión tumoral, mayor apoptosis y mayor respuesta antitumoral en un modelo murino de cáncer de próstata que el docetaxel solo. [423] En una línea de carcinoma hepático (HepG2) el PSP de *Trametes versicolor* aumenta los efectos citotóxicos de la ciclofosfamida, disminuyendo la viabilidad celular en un 22 %. [51] En un estudio paralelo con ratas *in vivo*, el PSP disminuye el ratio de eliminación de ciclofosfamida en un 33 %. [51] Ambos efectos señalan los beneficios del uso del PSP como coadyuvante en los tratamientos con este fármaco.

Además, los extractos de hongos tuvieron efectos significativos sobre las proteínas de migración y adhesión celulares, como son las metaloproteinasas (MMP). La actividad de estas proteínas puede regularse a diferentes niveles, tales como la transcripción, vida media del ARNm, secreción, proteólisis o modificaciones postraduccionales. Los mecanismos implicados en estos efectos aún están por dilucidar. Pero el hecho de que tanto el extracto de *Trametes versicolor* como el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de *Grifola frondosa* sean capaces de disminuir la actividad de la MMP-2 y aumentar los niveles de E-cadherina podrían explicar, al menos en parte, los mecanismos por los cuales los hongos inhiben la migración celular y la capacidad invasiva de las células de colon humano. Sin embargo, no todos los estudios realizados presentaron los mismos resultados. Por ejemplo, el extracto de *Trametes versicolor* redujo la actividad de la MMP-9 en células de carcinoma mamario de ratón, pero sin efectos en la MMP-2. [230] Pero sí se detectó la inhibición de ambas enzimas por el PSK en líneas celulares de cáncer pancreático y gástrico humano. [471] El ácido ganodérico purificado de *Ganoderma lucidum* es capaz de inhibir la proliferación y la agregación celular en células HCT-116 (una línea de carcinoma de colon humano) mediante la inhibición de las MMP de una manera dependiente de la dosis. [61]

Debemos tener en cuenta que los extractos de hongos pueden tener efecto diferencial según el tipo de célula sobre la que actúan, lo que explicaría las diferencias observadas entre diversos trabajos de investigación. En este sentido, un estudio describió que el extracto polisacarídico aislado a partir de cápsulas comerciales de *Trametes versicolor* indujo *in vitro* una inhibición significativa de células de cáncer de mama (células MCF-7), a través de mecanismos dependientes del TNF-α. En estas células, los niveles de IL-1β y IL-6 no se vieron afectados. Sin embargo, en el extracto fúngico incrementó la respuesta proliferativa de linfocitos en cultivo, respuesta que estuvo asociada a un incremento de los niveles del ARNm de IL-1β y IL-6. [190] En células de carcinoma mamario de ratón (células 4T1) el extracto acuoso de *Trametes versicolor* no inhibió la proliferación celular, pero inhibió significativamente los procesos de migración e invasión. [230] Por otra parte, las diferentes respuestas obtenidas en los diversos estudios podrían explicarse por el diferente contenido en polisacáridos de las fracciones utilizadas, aunque también podría influir la composición del cuerpo fructífero del hongo o los procedimientos de extracción empleados.

A pesar de estas diferencias, la evidencia reciente sugiere un efecto antitumoral directo de los extractos polisacáridos de hongos sobre las células cancerosas, efecto que parece ser independiente y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

añadido a las acciones sobre el sistema inmunológico. En el presente estudio, los extractos ricos en polisacáridos de *Grifola frondosa* y *Trametes versicolor* fueron capaces de inhibir el crecimiento celular, la migración celular y la capacidad de invasión, que son características esenciales en el proceso metastásico. Se refuerza así la importancia crítica de las técnicas de producción utilizadas a la hora de observar los efectos sobre las células cancerosas. Además, la combinación de los extractos fúngicos con el 5-FU aumenta la citotoxicidad celular. En conjunto, nuestros resultados sugieren la importancia del potencial papel coadyuvante de estos extractos en el tratamiento de los pacientes con CCR.

6.3 TOXICOLOGÍA FARMACOLÓGICA

El citocromo P450 (CYP450) es una enorme y diversa superfamilia de enzimas que se encuentran en prácticamente todos los organismos, desde bacterias hasta vertebrados superiores. En los seres humanos, estas proteínas se expresan principalmente en el hígado, aunque también en menor medida en el tracto respiratorio, el cerebro y el intestino delgado. A nivel celular, están asociadas al retículo endoplásmico, la membrana citoplasmática y las mitocondrias, donde actúan metabolizando cientos de sustancias endógenas y exógenas. Por lo tanto, las isoenzimas de la familia CYP450 son esenciales en las fases iniciales del metabolismo de xenobióticos, lo que incluye a los fármacos de la medicina convencional y los compuestos complementarios. [120] Al administrar un extracto fúngico, compuesto por multitud de moléculas bioactivas como coadyuvante de un fármaco convencional, pueden aparecer interacciones entre los distintos compuestos. Estas interacciones pueden modificar el metabolismo del fármaco convencional mediante la inducción o inhibición de alguna de las enzimas del grupo CYP450, dando lugar a efectos secundarios no deseados. Estas interacciones no deseadas son cada día más comunes debido a la polifarmacia, a la creciente exposición a contaminantes ambientales y al incremento en el uso de productos CAM. [454] Dado el incremento del consumo de compuestos naturales en occidente, la cuestión de posibles interacciones entre los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fármacos convencionales, que son metabolizados por las enzimas CYP450, y productos coadyuvantes tiene que ser tomada en consideración. [120, 282, 301, 454] De hecho, productos populares tales como el ginseng, la palma serrucho y la hierba de San Juan han demostrado tener una potente actividad inhibitoria del CYP450 *in vitro*. [95] La inhibición de estas enzimas por la coadministración de diferentes fármacos ha llevado a la eliminación del mercado de un buen número de medicamentos. [426]

En la industria farmacéutica, el procedimiento común con nuevos fármacos o substancias bioactivas es buscar y determinar estas posibles interacciones entre compuestos. La manera más común de llevarlo a cabo es mediante la determinación de la acción del nuevo compuesto sobre distintas enzimas de la familia CYP450. [120, 282, 301] En el presente estudio, evaluamos el potencial inhibitorio de los extractos fúngicos incluidos en la formulación de Mico-Digest 2.0® sobre las principales isoformas del CYP450 (CYP3A4, CYPP2D6 y CYP2CP), responsables de la mayoría de los procesos metabólicos conocidos. [426] (ver sección de Metodología).

Los resultados aquí presentados demostraron una baja posibilidad de interacciones medicamentosas *in vivo* entre los fármacos convencionales y los extractos fúngicos por inhibición de las enzimas CYP450, con valores de IC_{50} alrededor de 1000 μg/ml. En este sentido, nuestros resultados no difieren en demasía de los reportados por otros grupos de investigación.

Como en el presente estudio, estos valores de inhibición relativamente altos sugieren un bajo potencial del PSP para causar interacciones con otras drogas a través de las isoformas del CYP450. Por otra parte, se podría sospechar que los fármacos quimioterapéuticos pueden interactuar con los extractos de hongos, lo que disminuiría la eficacia de dichos fármacos. Sin embargo, es poco probable que los medicamentos utilizados en la quimioterapia convencional, que suelen ser administrados por vía intravenosa, puedan interactuar directamente con hongos ingeridos por vía oral. [5] De hecho, se ha demostrado que la ingesta de 3 gramos diarios durante 4-14 meses de PSK en 10 pacientes con cáncer gástrico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

avanzado no alteró el metabolismo del 5-FU utilizado para tratar a dichos pacientes. [9] No obstante, en cualquier ensayo clínico, estas posibles interacciones son algo que deben tenerse en cuenta.

6.4 EFECTOS PREBIÓTICOS

Recientemente, los polisacáridos de hongos han atraído mucha atención por regular la microbiota intestinal mediante la reducción de los niveles de patógenos y la estimulación del crecimiento de microorganismos beneficiosos, creando así nuevas posibilidades para su uso en industrias de alimentos funcionales y nutracéuticos. [460]
Como se ha descrito previamente, los polisacáridos y las proteínas presentes en ciertas especies de hongos basidiomicetos medicinales, como *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eryngii* o *Hericium erinaceus*, son conocidas por presentar beneficios demostrados clínicamente en modelos murinos gracias a sus propiedades prebióticas. [55, 78, 231, 460]
Esta acción se produce a través de la fermentación de los polisacáridos a ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH intestinal y modifican la flora y el equilibrio entre metabolitos microbianos. Los polisacáridos tienen una estabilidad en jugo gástrico superior al 90% y generan un estímulo para el crecimiento de *Lactobacillus* superior al de otros prebióticos ya comercializados, como la inulina o los oligosacáridos de fructosa. [279] Por otra parte, algunas especies de microbiota intestinal obtienen fuentes de carbono y energía durante la degradación de los polisacáridos, lo que los convierte en una microbiota dominante en el intestino. Curiosamente, algunas bacterias intestinales pueden inducir el crecimiento de otras mediante un efecto de alimentación cruzada. La acción prebiótica de los polisacáridos fúngicos ha sido demostrada en un estudio publicado recientemente en humanos. El estudio aleatorizado comparó una dieta enriquecida en *Agaricus bisporus* con una dieta enriquecida con proteínas animales durante 10 días. Los pacientes que recibieron la dieta enriquecida con hongos presentaron un mayor volumen de heces y una modificación en la composición de la microbiota, con mayor abundancia de Bacteroidetes y menor de Firmicutes. [123]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por lo tanto, los polisacáridos de la dieta afectan a la ecología microbiana intestinal, [93] y la microbiota del tracto intestinal humano desempeña un papel importante en la salud del individuo. [258, 391, 388] La microbiota es importante para la nutrición del huésped, la modulación inmunológica, la resistencia a patógenos, el desarrollo y la actividad epitelial del tracto digestivo y el metabolismo energético en general. [93, 320] La microbiota intestinal humana es un ecosistema complejo que mantiene una homeostasis con el intestino a través de interacciones sinérgicas constantes con el huésped. [388] Sin embargo, modificaciones en la composición o en la función de la microbiota podrían alterar este equilibrio, favoreciendo la aparición de enfermedades como la obesidad, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer gastrointestinal. [258] En el caso del CCR, esto es particularmente cierto, ya que la respuesta inflamatoria crónica en el CCR tiene un impacto adicional en la diversidad de la microbiota basal en el momento de la intervención. [20] De hecho, diversos estudios han demostrado que las alteraciones cualitativas y cuantitativas en la composición de la microbiota del tracto digestivo (un proceso conocido como disbiosis) contribuyen a la aparición del cáncer gastrointestinal. Estos tipos de cáncer se consideran enfermedades multifactoriales, resultado de complejas relaciones entre factores genéticos, epigenéticos y medioambientales (lo que incluye el área geográfica y el estatus socioeconómico, la dieta, el estilo de vida, etc.,). Estos factores, a su vez, interaccionan con la flora intestinal, alterando sus funciones, lo que influye en los procesos de génesis y crecimiento tumorales. [20, 350, 476] Estudios recientes establecen que, si bien no hay una relación causal directa con el cáncer, la interacción de la microbiota con el sistema inmunitario del huésped influye de múltiples maneras en el desarrollo de la enfermedad. La evidencia creciente señala a los circuitos regulatorios existentes entre microbiota, células del huésped y sistema inmune como factores involucrados en el desarrollo y la progresión del cáncer. Por ejemplo, la microbiota intestinal es capaz de modular los niveles de estrógenos en sangre. A la inversa, los factores estrogénicos pueden promover la proliferación de ciertos tipos de bacterias. De este modo, la comunicación cruzada entre microbiota y hormonas endógenas puede tener efectos sinérgicos,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tanto en sentido protector como de aumento del riesgo de desarrollar enfermedades. Las investigaciones más recientes sugieren que la microbiota de mujeres con cáncer de mama es diferente de la de mujeres sanas, lo que indica que ciertas bacterias pueden estar asociadas con el desarrollo cancerígeno y con la respuesta a las terapias. [89]

Los carbohidratos de los prebióticos son, por definición, metabolizados únicamente por un grupo de selectos miembros de la flora gastrointestinal. Por lo tanto, estos prebióticos, como los polisacáridos fúngicos, tienen la habilidad de influir sobre la población gastrointestinal, favoreciendo el crecimiento de determinadas bacterias a expensas de otras. [141] Aunque todavía queda mucho por conocer sobre cómo distintas especies de bacterias intestinales influyen en la salud, está generalmente aceptado que las bifidobacterias y las bacterias lácticas (lactobacilos) son componentes importantes de las llamadas «bacterias beneficiosas» del tracto gastrointestinal. [141, 391] Aunque los estudios no son aún muy numerosos, los resultados indican que la quimioterapia aguda reduce la diversidad bacteriana del tracto gastrointestinal, con una marcada reducción de *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*, a la vez que un incremento de *Escherichia* y *Staphylococcus*. [167]

En nuestro estudio *in vitro*, los extractos del hongo *Hericium erinaceus* presentaron actividad prebiótica al favorecer el crecimiento de bacterias probióticas beneficiosas [6, 167] (*Bifidobacterium sp* y *Lactobacillus sp*) frente a bacterias entéricas (*Escherichia coli*) (ver sección de Resultados, epígrafe 5.2). Los valores del índice de actividad prebiótica fueron moderados (>0,15 a las 48 h, para todas las especies de bacterias probióticas ensayadas). En comparación, un estudio con diversos prebióticos obtuvo un valor máximo de 1,17 para *Lactobacillus paracasei* cultivada en presencia de inulina (un polisacárido complejo compuesto de cadenas de fructosa), mientras que el valor más bajo fue de -1,24. [141] Nuestros resultados indican que los extractos de *Hericium erinaceus* ensayados en el presente estudio mostraron una evidente capacidad prebiótica. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación. Por ejemplo, polisacáridos de *Hericium erinaceus* estimularon el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en ensayos *in vitro*. [452] El extracto de este hongo mostró también sus capacidades prebióticas en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal en ratas [79] y en ratones. [78]

En nuestro estudio preclínico, utilizamos un modelo murino de colitis ulcerosa y cáncer colorrectal inducidos mediante la inyección intraperitoneal de AOM y la adición de DSS en el agua de bebida. Parte del ensayo fue el análisis de la microbiota intestinal mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S. Se obtuvieron 6397 ASV (variantes de secuencia de amplicones) en muestras de intestinos de 29 animales. En cuanto a la diversidad alfa, no se encontraron diferencias filogenéticas significativas entre los animales de un mismo grupo experimental. Pero al considerar las diferencias entre los distintos grupos de tratamiento (diversidad beta) se demostró que el grupo de ratones con cáncer tratados con el prebiótico Mico-Digest 2.0® presentaba diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros grupos (ratones con cáncer no tratados con el prebiótico y ratones sanos). Las familias que se expresan de forma diferencial fueron Bifidobacteriaceae, Erysipelotrichaceae y Clostridiaceae (concretamente el género *Candidatus* Arthromitus). Sin embargo, dado el pequeño número de animales analizados, estos resultados no permiten extraer conclusiones definitivas. Serán necesarios nuevos experimentos, quizá con protocolos mejorados y optimizados, para determinar y caracterizar con claridad el efecto del prebiótico fúngico sobre la flora intestinal y sus posibles efectos beneficiosos en este modelo animal de CCR.

Por lo tanto, la manipulación beneficiosa de la flora gastrointestinal puede tener efectos preventivos y terapéuticos para los procesos cancerígenos, así como de mejora de la calidad de vida de los enfermos oncológicos al paliar los efectos secundarios de la quimioterapia. Los oligosacáridos fúngicos, así como los productos de su hidrólisis parcial, gracias a sus propiedades como prebióticos, se convierten en un valioso instrumento de dicha manipulación. [337]. De hecho, los prebióticos, por sí solos o combinados con bacterias probióticas, tienen la capacidad de influir y mejorar la salud gastrointestinal en humanos. [391]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con los conocimientos actuales, sólo podemos especular sobre cómo los principios bioactivos de los hongos influyen en el complejo ambiente del tracto digestivo. Es posible que los fragmentos de polisacáridos parcialmente hidrolizados por bacterias intestinales se unan a las células epiteliales, lo que da lugar a las acciones sobre el sistema inmune a nivel local, o bien ser absorbidos en el torrente sanguíneo y dar lugar a sus efectos inmunomoduladores sistémicos. Diversos estudios han investigado los vínculos entre la bioconversión de los polisacáridos dietéticos, su biodisponibilidad y sus efectos posteriores en el metabolismo y la fisiología del huésped. [320] En este sentido, un ensayo clínico controlado con pacientes que sufrían la enfermedad de Crohn [381] o colitis ulcerosa [382] reportó una mejoría significativa en los síntomas de la enfermedad, así como en la fatiga y la calidad de vida, tras la ingesta durante 3 semanas de un extracto de *Agaricus blazei* Murrill. Estos efectos fueron debidos, al menos parcialmente, al efecto antiinflamatorio del hongo a través de la reducción de los niveles de determinadas citoquinas en sangre. [380]

En el estudio clínico con pacientes de CCR cuyo protocolo se describe en esta tesis doctoral, el efecto prebiótico de los extractos de hongos ensayados es un objetivo importante del estudio. El ensayo permitirá evaluar los efectos que la administración del nutracéutico tiene sobre la microbiota intestinal de pacientes con CCR tratados con cirugía de resección. Esto, a su vez, nos permitirá evaluar el impacto de los extractos fúngicos, a través de sus propiedades como prebióticos (entre otras propiedades), sobre la calidad de vida y el patrón inflamatorio sistémico de los pacientes. De esta manera trataremos de evaluar el impacto en la salud del individuo, en su calidad de vida y en el progreso de la enfermedad. Comprender la respuesta de las comunidades microbianas intestinales a la dieta y otros factores representa, no obstante, una serie de desafíos nada desdeñables. Se necesita una innovación continua en el estudio de la ecología microbiana, en particular para permitir un análisis rápido de la microbiota intestinal en grandes conjuntos de muestras, como suelen ser los ensayos clínicos. Estos análisis permitirán monitorizar los cambios metabólicos de las interacciones en el huésped, lo que

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

será de un valor esencial a la hora de evaluar los beneficios del consumo de prebióticos.

6.5 ENSAYOS PRECLÍNICOS *IN VIVO*

Como se ha descrito a lo largo del texto de esta tesis doctoral, existen multitud de estudios que han demostrado las propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras de los hongos medicinales en ratones y otros modelos animales. En este sentido, la administración en la dieta de extracto de *Trametes versicolor* redujo la incidencia de tumores intestinales en ratones. [69] Ratas con tumores en el tracto digestivo presentaron alivio sintomático tras una única inyección IP del PSK aislado de este hongo. [173] El extracto de *Agaricus blazei* Murrill retrasa el crecimiento tumoral de células de cáncer de colon humano implantadas en ratones. [439] En ratas, el extracto hidrosoluble de *Ganoderma lucidum* es capaz de prevenir las lesiones en el intestino delgado causadas por 5-FU. [419]. El ganodermanontriol, un triterpeno aislado de *Ganoderma lucidum*, inhibe la proliferación de células tumorales de colon en un modelo de ratones *in vivo*. [149] El extracto de *Lentinula edodes* es capaz de inhibir el crecimiento de tumores en ratones injertados con células de carcinoma de colon humano. [268] Un glucano aislado del micelio de Pleurotus ostreatus mostró capacidad antitumoral e inmunomoduladoras en modelos de ratón. [76] Ratones tratados con inyección subcutánea de DMH (1,2-dimetilhidrazina), un potente carcinógeno, desarrollaron tumores intestinales a las 26 y 35 semanas. En contra de los esperado, la adición de un 2 % en la dieta de extracto acuoso de *Trametes versicolor* provocó un ligero aumento en el número de tumores en los animales sacrificados a las 35 semanas. [386] Sin embargo, la ingesta de un 2 % de extracto de *Trametes versicolor* en la dieta redujo el número de tumores por ratón en un modelo murino de cáncer intestinal (ratones C57BL/6J-ApcMin). [387] Futuros estudios en modelos animales permitirán dilucidar con detalle los efectos anticancerígenos de los hongos medicinales.

Los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de los extractos fúngicos se ejercen gracias a la acción de dichos extractos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sobre diversos factores de comunicación intercelular implicados en funciones inmunológicas. [164, 219, 337] Así, se ha descrito que el 1,6-α-D-glucopiranosil, extraído del cuerpo fructífero de *Trametes versicolor*, induce la producción de citoquinas, IFN-α e IFN-γ en ratones con sarcoma. [15,16] Extractos solubles del hongo *Agaricus blazei* Murrill favorecieron la actividad de los linfocitos T y las células NK, así como la proliferación de citoquinas proinflamatorias IL-1b, IL-6 e IFN-γ en ratones. [217, 250] Una proteína aislada del cuerpo fructífero de *Grifola frondosa* mostró capacidad de activar las células NK y DC en ratones, a través de mecanismos dependientes del INF-γ y de los receptores TLR. [390] La bibliografía existente hasta la fecha permite afirmar que la actividad antitumoral y antiinflamatoria de los β-glucanos, uno de los principios activos más importantes de los hongos, estaría generada por la cooperación coordinada entre la respuesta inmune innata y la adaptativa [341, 418]. El complejo proteico inflamasoma es esencial en la activación de ambas respuestas inmunes. [82] En células THP-1 (una línea leucémica de monocitos humanos) el extracto PSK de *Trametes versicolor* es capaz de activar el complejo inflamasoma a través de mecanismos dependientes de la IL-1β. Extractos acuosos de *Agaricus. blazei* Murrill indujeron la secreción de TNF-α, IL-8 y óxido nítrico en macrófagos de rata en cultivo. [366] Un extracto heteropolisacárido de *Lentinula edodes* estimuló la producción de NO, IL-6 y TNF-α en células RAW 264.7 (macrófagos de ratón) en cultivo. [446] Un proteoglicano aislado del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* reforzó el sistema inmune en ratones gracias al incremento en la producción de células B. [472]

En nuestro estudio, utilizamos un modelo murino de colitis ulcerosa y CCR inducido basado en la bibliografía existente. [287,373] Este modelo consiste en la inyección IP del carcinógeno AOM (azoximetano) combinado con la ingesta del polisacárido tóxico dextrano sulfato de sodio (DSS). El tratamiento provoca una inflamación crónica de la mucosa intestinal que deriva en cáncer colorrectal. Durante la disección de los tejidos de los animales a los que se les había inducido el CCR, se detectó la presencia de zonas tumorales localizadas en el intestino grueso, presencia de sangre en el interior del intestino y en ocasiones pérdida de la estructura del tejido

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y coloración anormal. Estos resultados demostraron que el modelo animal utilizado se desarrolló según lo previsto. Sin embargo, durante el periodo experimental algunos animales sufrieron un descenso de peso excesivo, por lo que fue necesario sacrificarlos siguiendo el punto final humanitario establecido por el comité ético. Esta inesperada mortandad, el reducido número de animales que pudieron ser incluidos en el análisis, y la gran variabilidad de los resultados entre animales nos impidió obtener unos resultados satisfactorios y conclusivos. Resulta evidente la necesidad de repetir y optimizar la ejecución de experimentos con este modelo animal de CCR a la hora de evaluar los efectos de los extractos fúngicos. Además de repetir los experimentos con un mayor número de animales, se podrían incorporar mejoras en el diseño de los experimentos. En este sentido, se podría realizar un pretratamiento con el prebiótico Mico-Digest 2.0®, lo que podría permitir una mejor evaluación de los efectos beneficiosos de los extractos fúngicos. También se podrían incluir en el estudio parámetros adicionales que nos permitan evaluar el efecto de los extractos fúngicos, como sería el índice de supervivencia. Lamentablemente, las dificultades logísticas causadas por la pandemia de la COVID-19 imposibilitaron la repetición de nuestros ensayos *in vivo* a tiempo para cumplir los plazos administrativos de esta tesis doctoral.

Aun así, podemos extraer algunas conclusiones preliminares de nuestro estudio preclínico *in vivo*. La inducción química de CCR en ratones tratados con AOM y DSS indujo un incremento del peso de los bazos con respecto a los animales sanos del grupo control. Así mismo produjo un incremento en las concentraciones de IL-6 y TNF-α en suero. Estos factores fueron utilizados como marcadores de inflamación en nuestro modelo animal de CCR. La adición del nutracéutico Mico-Digest 2.0® en la dieta de animales con CCR produjo una ligera disminución del peso de los bazos y de los niveles de IL-6 y TNF-α en suero. Las diferencias con respecto al grupo de animales con cáncer no fueron, sin embargo, estadísticamente significativas en ninguno de los marcadores. De forma similar, la inducción del CCR produjo una disminución de los niveles de colesterol y corticosterona en suero con respecto a los animales sanos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La presencia del nutracéutico revirtió parcialmente estos efectos inhibidores en animales con cáncer, aunque sin que tampoco se consiguiesen unas diferencias significativas. Las dificultades mencionadas anteriormente también impidieron otros análisis, como los niveles de nitritos y triglicéridos, con un mínimo de fiabilidad. No obstante, estos resultados parciales nos ofrecen indicios del posible efecto antiinflamatorio y metabólico de los extractos de hongos medicinales en este modelo animal de CCR. Futuros experimentos, con un número mayor de animales en cada grupo de tratamiento y con protocolos optimizados, permitirán evidenciar con claridad los efectos beneficiosos de los extractos de hongos en ratones con cáncer colorrectal.

También debemos tener en cuenta que, en nuestro ensayo, el nutracéutico ensayado está compuesto por los extractos de nueve especies distintas de hongos medicinales. Cada extracto fúngico es a su vez un complejo de multitud de principios bioactivos con múltiples actividades estimuladoras. [259, 398] Estos efectos pleiotrópicos complican aún más si cabe la interpretación de los resultados obtenidos en cualquier estudio *in vivo* con combinaciones de varios hongos medicinales, como es el caso de la fórmula Mico-Digest 2.0®. Desafortunadamente, no existen muchos estudios enfocados en la combinación de varios hongos medicinales, lo que impide realizar una comparativa apropiada. Aun así, un estudio *in vitro* con células HL-60 mostró que los efectos proapoptóticos del extracto de *Trametes versicolor* se potenciaban con la adición de extracto de *Ganoderma lucidum*, lo que sugiere una potencial sinergia en sus efectos y mecanismos de acción. [136] La administración oral de una mezcla de *Agaricus blazei* Murrill, *Ophiocordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* y *Lentinula edodes* redujo dramáticamente la metástasis pulmonar, la respuesta fibrótica y los marcadores inflamatorios en un modelo murino de cáncer de mama. [332] Por lo tanto, un valor añadido de nuestro estudio es el hecho de ser un pionero en la evaluación de los efectos beneficiosos de diversos hongos medicinales en modelos animales de cáncer.

Como también se ha mencionado ya en el presente manuscrito, uno de los mecanismos principales a través de los cuales los hongos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

medicinales ejercen sus efectos beneficiosos es gracias a sus propiedades como prebióticos. Así, polisacáridos extraídos de *Hericium erinaceus* han mostrado su capacidad prebiótica en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal en ratas [79] y ratones, [78] además de estimular in vitro el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. [452] En un modelo xenográfico de cáncer colorrectal en ratones, la administración de un extracto proteico de *Hericium erinaceus* junto con el tratamiento quimioterápico redujo el crecimiento tumoral y la expresión de marcadores inflamatorios, tales como IFN, IL y TNFα. Además, el extracto fúngico mejoró la disbiosis inducida por la quimioterapia, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y estimulando el crecimiento de bacterias probióticas. [403] En nuestro estudio, los resultados mostraron que no había diferencias significativas en la diversidad taxonómica de la flora intestinal entre los animales de un mismo grupo de tratamiento (diversidad alfa). Sin embargo, los animales a los que se les indujo CCR que fueron tratados con el compuesto prebiótico mostraron diferencias taxonómicas significativas en su flora intestinal (diversidad beta) respecto a los animales de los otros grupos experimentales. Estos resultados, aunque preliminares, nos permiten evidenciar un efecto del compuesto Mico-Digest 2.0® como prebiótico en animales con cáncer. Se confirma así la gran potencialidad que pueden tener los extractos de hongos como prebióticos en la micología aplicada a la oncología integrativa, tal y como han mostrado un amplio número de estudios clínicos y preclínicos.

6.6 LOS EXTRACTOS DE HONGOS EN ONCOLOGÍA INTEGRATIVA

Además de por su acción directa sobre las células cancerígenas, los beneficios terapéuticos de los extractos de hongos en los pacientes oncológicos son ejercidos a través de sus efectos inmunoestimuladores. [253, 367] Los beneficios inmunoterapéuticos del consumo de hongos medicinales y sus extractos derivan de la administración de varias sustancias bioactivas: (1) polisacáridos complejos acoplados a proteínas que estimulan el sistema inmune y tienen actividad antitumoral; (2) enzimas que previenen el estrés

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

oxidativo e inhiben la proliferación celular; y (3) metabolitos secundarios que afectan a diversos procesos biológicos. [50, 70, 109, 249, 253, 299, 367, 375, 401, 408, 449] En el campo de la medicina moderna, la inmunoterapia antitumoral mediante el uso de factores inmunomoduladores de fuentes naturales tiene un enorme potencial de futuro. Supone una metodología eficaz, segura y rentable, lo que pronostica un mercado en rápido crecimiento en todo el mundo. [351]

Como se ha expuesto en la Introducción de esta tesis doctoral, muchos son los estudios que han indagado en los mecanismos celulares y fisiológicos que explican la actividad inmunomoduladora de los principios activos de los hongos. Por ejemplo, los glucanos presentes en *Ganoderma lucidum* pueden unirse al receptor del complemento de membrana tipo 3 (CR3), entre otras proteínas, en la superficie de los macrófagos. Esta unión activaría a este tipo celular, dando lugar a la liberación de citoquinas como IL-1, IL-6, IFN-γ, TNF-α, ON y otros mediadores. Estas moléculas a su vez desencadenarían toda una serie de procesos celulares como la apoptosis de las células tumorales, [62] o la activación de la respuesta inmune mediada por células. [253] Otro evento de capital importancia en la generación de la respuesta inmune es la activación de las células T, con la proliferación y diferenciación de las mismas. Las citoquinas y factores mediadores estimulados por los proteoglicanos fúngicos son fundamentales en la activación de las células T, lo que juega un papel esencial en la potenciación de la respuesta inmune. [191] Por ejemplo, la activación de las células T, así como la secreción de citoquinas y la producción de ON es uno de los mecanismos descritos para el hongo *Agaricus blazei* Murrill. [191] Los productos fúngicos, gracias a sus propiedades inmunomoduladoras, pueden acabar resultando una revolución en las estrategias terapéuticas para frenar, prevenir y tratar enfermedades infecciosas e inmunodeficiencias. Los compuestos fúngicos pueden movilizar el sistema inmunológico para prevenir infecciones virales, bacterianas, fúngicas y protozoarias que presentan resistencia a los antibióticos convencionales. [253, 299]. Es importante tener en cuenta que una respuesta inmune demasiado intensa podría agravar, los efectos lesivos de la enfermedad, o incluso llevar a consecuencias fatales. Por lo tanto, el uso de medicamentos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inmunomoduladores resulta de gran utilidad terapéutica. La mejora de los valores inmunológicos en los pacientes con CCR seleccionados será uno de los parámetros de valoración en el ensayo clínico cuyo protocolo se presenta en esta tesis doctoral.

El CCR es uno de los problemas de salud más importantes en los países desarrollados. La mayor parte de los CCR detectados son candidatos al tratamiento con intención curativa, que consiste principalmente en la resección quirúrgica y el tratamiento neoadyuvante con radioterapia o quimioterapia. [38, 153, 286, 349, 361, 432] De hecho, el 75 % de los pacientes con CCR tienen una enfermedad localizada en el momento del diagnóstico, porcentaje que puede llegar al 95 % en los programas de cribado poblacional. Las tasas de curación por resección quirúrgica oscilan entre el 92 % y el 67 % de las intervenciones, en función del estadio tumoral. [110, 111] Aunque el 70 % de los pacientes diagnosticados son tratables con cirugía, [286] esta se asocia con complicaciones que en algunos casos pueden ser mortales. En nuestro país, dichas complicaciones postquirúrgicas aparecen en hasta un 40 % de los pacientes durante el ingreso, en un 15 % en el mes tras el alta y en un 25 % en el primer año tras la intervención. [317] El origen de las complicaciones durante el ingreso es múltiple: fallo de la sutura, complicaciones sépticas intraabdominales, íleo prolongado, infección de la herida quirúrgica o descompensaciones de enfermedades sistémicas. [72] Para evaluar la gravedad de dichas complicaciones se utilizan escalas validadas; la más utilizada es la de Clavien-Dindo. [68] Se han propuesto diversas intervenciones previas al ingreso con el objetivo de reducir las complicaciones asociadas a la cirugía. Clásicamente, en los pacientes que se van a someter a una colectomía, independientemente de la indicación, se realiza una profilaxis antibiótica endovenosa y una limpieza intestinal con laxantes osmóticos. Recientemente, un ensayo clínico holandés demostró que la descontaminación intestinal selectiva (tobramicina, anfotericina y colistina) reducía el riesgo de complicaciones infecciosas respecto a la profilaxis antibiótica endovenosa pero no modificaba el riesgo de fallo de la anastomosis quirúrgica. [2] Un estudio español concluyó que la administración de antibióticos por vía oral (ciprofloxacino y metronidazol) el día previo al ingreso también

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

reducía el riesgo de infecciones asociadas a la cirugía sin modificar la gravedad de las complicaciones detectadas. [88]

Diversos estudios han explorado el efecto de las modificaciones en la dieta y la administración de prebióticos y probióticos en el periodo previo a la intervención. En este sentido, aunque la adición de suplementos nutricionales no ha demostrado beneficios en términos de reducción de las complicaciones, [41] el uso de dietas inmuno-moduladoras reduce el riesgo de complicaciones infecciosas y de la estancia hospitalaria, aunque sin efecto en las complicaciones no infecciosas o la mortalidad. [4] Un metaanálisis sobre 34 ensayos clínicos aleatorizados confirmó que la administración de probióticos reduce de forma significativa las complicaciones infecciosas durante el ingreso, aunque sin efecto sobre la mortalidad o sobre las complicaciones no infecciosas. [67]

Está bien establecido que las alteraciones fisiológicas en el cuerpo humano causadas como resultado del estrés quirúrgico desencadenan respuestas relacionadas con el huésped que impactan en el delicado equilibrio del microambiente intestinal. [356] La microbiota intestinal humana es un ecosistema complejo que mantiene una homeostasis con el intestino a través de interacciones sinérgicas constantes y a largo plazo con el huésped. [388] Alteraciones de este equilibrio favorecen la aparición enfermedades como la obesidad, diabetes, enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer gastrointestinal. [258] Estudios recientes en animales han revelado alteraciones significativas en la composición de microbiota intestinal tras la resección colorrectal, con abundancia reducida en Bacteroidetes, especialmente en Bacteroidaceae, y en Proteobacteria como Enterobacteriaceae y Rhodospirillaceae. [196] No hay demasiados estudios sobre la alteración de microbiota intestinal y la cirugía colorrectal en pacientes. Un estudio reciente evaluó la composición de microbiota en muestras fecales de 43 pacientes con CCR sometidos a cirugía mediante la secuenciación de amplicones de ARNr 16S. Tras la cirugía, los autores comprobaron que se produjo un incremento en la proporción de ciertas bacterias patógenas oportunistas, mientras que se produjo una reducción del número de anaerobios beneficiosos. [188] Otro factor que hace evidente la interrelación entre CCR y microbiota intestinal es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

que la respuesta inflamatoria crónica que ocurre en esta enfermedad tiene un impacto adicional en la diversidad de microbiota basal en el momento de la intervención quirúrgica. [20]

Por un lado, se ha demostrado que, las intervenciones perioperatorias, especialmente la preparación intestinal mecánica preoperatoria, pueden causar cambios significativos en la composición y diversidad de la microbiota, [319] reduciendo especialmente las bacterias no patógenas como las Bifidobacterias y Lactobacilos y permitiendo que los patógenos prosperen, como *Escherichia coli* y *Staphylococcus sp*. [74] Además, la profilaxis antibiótica, ya sea oral o sistémica, pueden alterar la microbiota intestinal, reduciendo en gran medida la diversidad microbiana. [12, 90] Sin embargo, los actuales regímenes antibióticos profilácticos estándar presentan una actividad de amplio espectro, por lo que no hay capacidad de actuar selectivamente sobre patógenos específicos.

Por otro lado, la microbiota intestinal juega un papel esencial en la cicatrización de heridas, la restitución epitelial y la modulación inmune, por lo que las alteraciones de la microbiota consecuencia del estrés quirúrgico y el manejo perioperatorio pueden estar asociadas con la aparición de complicaciones postoperatorias. [369] La microbiota puede interactuar con las células epiteliales intestinales a través de receptores de la inmunidad innata, como los receptores TLR, regulando así la respuesta del huésped. [3] Además, la vascularización adecuada de la anastomosis intestinal también es un factor importante en la cicatrización anastomótica. [146] La microbiota parece participar en la vascularización anastomótica adecuada, promoviendo la remodelación vascular. [323] Los pacientes que desarrollaron fallo de la anastomosis demostraron un aumento de las bacterias relacionadas con la disbiosis y baja abundancia de bacterias protectoras. [295, 322] Por lo tanto, la determinación de la composición preoperatoria de microbiota colónica podría servir como una herramienta de detección potencial de fallo de anastomosis en pacientes con CCR.

Otro factor para tener en cuenta es que las infecciones postquirúrgicas son una complicación frecuente y desfavorable, que ocurre en el 3 al 26% de los pacientes sometidos a cirugía colorrectal.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[257] El patógeno más común es *Staphylococcus aureus*, que es causal en el 20% de las infecciones quirúrgicas. [28] El único estudio que ha evaluado la asociación entre microbiota fecal y las bacterias relacionadas con infecciones quirúrgicas en pacientes con CCR después de la cirugía reportó infección en 6 de 81 pacientes. Las bacterias causantes de dichas infecciones (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus sp*.) se detectaron más frecuentemente en muestras fecales tras la cirugía de CCR. [283]

En definitiva, las alteraciones de la microbiota intestinal después de la cirugía de CCR podrían promover resultados adversos en estos pacientes, ya sea por el efecto proinflamatorio, fallo de la anastomosis o infección postquirúrgica.

Los efectos beneficiosos de los hongos medicinales a nivel intestinal van más allá de su acción prebiótica. [460] En este sentido, se ha descrito actividad antiinflamatoria para los polisacáridos fúngicos en líneas celulares y en modelos animales. [21,78] En modelos murino de colitis, los polisacáridos aislados de *Ganoderma lucidum* [420] y *Lentinula edodes* [355] demostraron su capacidad antiinflamatoria y e inmuno-moduladora a través rutas intracelulares que implican a las proteínas MAPK y factores como el ON, TNF-α e IL-6. Se ha descrito que la administración de un extracto de hongos basidiomicetos mejora los síntomas inflamatorios en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, reduciendo los marcadores plasmáticos de inflamación, así como la concentración de la calprotectina fecal. [272] A nivel clínico ha sido probado que polisacáridos *Ganoderma lucidum* pueden reducir ligeramente los niveles de ciertas citoquinas proinflamatorias en pacientes de CCR avanzado. [62]

El nutracéutico Mico-Digest 2.0® diseñado y formulado por Hifas da Terra está compuesto por 9 extractos de hongos: *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei* Murrill, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Ophiocordyceps sinensis*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus umbellatus* y *Lentinula edodes*. Diversos grupos de investigadores han propuesto que, para maximizar la respuesta del sistema inmunológico, es mejor la combinación de polisacáridos procedentes de diferentes extractos de hongos. De esta manera se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

envían múltiples estímulos al sistema inmune, con el consiguiente aumento de reacciones e interacciones intracelulares, consiguiendo un mejor estado de alerta inmunológica gracias a la sinergia de los distintos principios activos de las distintas especies de hongos medicinales. [33, 147, 161, 414, 468]

Por todo ello, consideramos que la aplicación combinada del nutracéutico Mico-Digest 2.0®, gracias a su acción mixta como prebiótico e inmunomodulador, puede constituir un recurso terapéutico coadyuvante de importancia a la hora de reducir las complicaciones postquirúrgicas en pacientes con CCR candidatos a tratamiento quirúrgico. Con la intención de validar esta idea, hemos diseñado el estudio clínico cuyo protocolo se describe en esta tesis doctoral.

6.7 EFECTOS NEUROPROTECTORES

La mayoría de las quimioterapias no son lo bastante específicas para actuar únicamente sobre las células cancerosas, por lo que suelen tener efectos secundarios negativos por todo organismo, lo que incluye comorbilidades gastrointestinales y psicológicas, [167, 224] pues afectan de forma negativa al sistema nervioso y alteran la composición y función de la flora gastrointestinal. Así tenemos la neuropatía periférica inducida por la quimioterapia (CIPN, por su siglas en inglés), que es uno de los efectos secundarios relacionados con el tratamiento anticancerígenos que causa una mayor disminución de la calidad de vida del paciente. [122, 469] La prevalencia de la CIPN varía según el agente o agentes antineoplásicos utilizados, dosis, tiempo de tratamiento, estado del paciente, etc., pero puede superar el 20 %. [122, 469] Este sería el caso del oxaliplatino, que produce neuropatía periférica en más del 30 % de los pacientes de cáncer colorrectal en tratamiento con quimioterapia. A menudo se trata de un dolor neuropático devastador que puede durar de meses a años, lo que evita que los pacientes reciban la dosis adecuada de quimioterapia. [122, 354]
La CIPN consiste principalmente en una neuropatía sensorial más que motora, y supone un problema importante para pacientes y profesionales de la salud ya que puede conducir a un abandono del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratamiento. [122] Hasta la fecha, no existe ningún método efectivo de prevenir la CIPN y sus posibilidades de tratamiento son limitadas. [469]

Por otra parte, muchos pacientes tras el tratamiento oncológicos se quejan de pérdidas de memoria, de la atención, de dificultades al hablar y, en general, de pérdidas en las funciones cognitivas que reflejan los efectos neurotóxicos de las quimioterapias. [121] Los pacientes en tratamiento a menudo presentan síntomas de ansiedad, depresión, fatiga, insomnio, etc., que pueden afectar a más de un tercio de los pacientes oncológicos. [167] A este déficit cognitivo y de disminución del funcionamiento neuropsicológico al que se denomina «chemo brain», un efecto secundario muy patente en enfermos oncológicos supervivientes al tratamiento, sobre todo en casos de cáncer de mama y cánceres del sistema digestivo. [121, 167, 224] El papel de la neurotoxicidad de la quimioterapia en este efecto no está aún del todo claro. Los pacientes oncológicos presentan muchos otros factores que pueden afectar a su funcionamiento cognitivo, como cirugía, radioterapia, carga psicológica de la enfermedad, alteración factores biológicos relacionados con la patología, como sería el caso de las citoquinas, etc. [121] Incluso informar al paciente sobre el efecto «chemo brain» puede tener un efecto nocebo. [343] Este efecto neurotóxico tiene efectos debilitantes en el paciente, aumenta los costes sanitarios y disminuye la adherencia al tratamiento. [224]

Además de los efectos nocivos sobre el sistema nervioso central, los pacientes en quimioterapia experimentan efectos secundarios debilitantes en el tracto gastrointestinal: diarrea, náusea, dolor abdominal, vómitos, anorexia, etc., que agravan aún más la enfermedad. [167, 224] De hecho, ambas partes del organismo, sistema nervioso central y tracto digestivo están íntimamente relacionados. En roedores, la microbiota intestinal modula el desarrollo y la función cerebrales a lo largo de toda la vida del animal. [246] En humanos, las alteraciones de las comunidades microbianas del tracto digestivo también están asociadas con diversas enfermedades, y se reconoce un papel en alteraciones de procesos cognitivos, cambios de humor, fatiga y problemas del sueño. [246] No obstante, la evidencia es todavía limitada y los mecanismos de acción aún no han sido adecuadamente delineados. [167, 246] Los datos apuntan a que la microbiota intestinal es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

capaz de alterar la función cerebral de manera simultánea a través de múltiples vías, que es lo que se supone que ocurre durante la quimioterapia. [246] De momento se desconocen los mecanismos por los cuales el sistema endocrino y neuronal son afectados por el tracto gastrointestinal, pero los resultados apuntan a interacciones a través del sistema inmune. De hecho, la investigación básica indica que la inflamación periférica puede traducirse en neuroinflamación a través de vías endocrinas y neurológicas. [167]

En este contexto, uno de los mayores beneficios de los hongos medicinales para combatir los efectos neurotóxicos de la quimioterapia podría radicar en sus propiedades como prebióticos. Los estudios en modelos murinos indican que la alteración en la microbiota intestinal por efecto de la quimioterapia está estrechamente relacionada con las alteraciones neurológicas descritas como EA de dicha quimioterapia. [167, 224, 354] Comprender cómo y en qué medida las alteraciones inducidas por la quimioterapia en el microbioma gastrointestinal contribuyen a las comorbilidades neurológicas y conductuales podría transformar la forma en la que tratamos los efectos secundarios debilitantes de los pacientes oncológicos. [167] En concreto, el tratamiento de las afecciones intestinales con probióticos y prebióticos, e incluso con trasplantes de microbiota fecal, pueden reducir, simultáneamente, las comorbilidades cognitivas, el riesgo de neuropatías periféricas y los síntomas gastrointestinales inducidos por la quimioterapia.

Estudios preclínicos han demostrado efectos neuroprotectores directos de los hongos medicinales, como es el caso de *Hericium erinaceus*, que ha mostrado efectos beneficiosos en modelos animales de ictus, Parkinson, Alzheimer y depresión. [205, 225] Este hongo produce ciertas moléculas bioactivas específicas: las hericenonas y las erinacinas, que son moléculas de naturaleza terpenoide, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar como precursores del NGF. [249] Estas moléculas son capaces de inducir el proceso de mielinización *in vitro*, regenerando así la vaina de mielina que recubre las fibras nerviosas y mejorando la transmisión del impulso nervioso. [187] Estas cualidades hacen a estas sustancias de gran interés en el tratamiento de enfermedades degenerativas del tejido nervioso, así

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

como para la mejora de la memoria y el deterioro cognitivo. [254, 255, 256] En ensayos preclínicos, el extracto de *Hericium erinaceus* estimula la producción de NGF en astrocitos humanos en cultivo, [255] y previene la deficiencia en los procesos de aprendizaje y memoria en ratones. [256] En un ensayo clínico en doble ciego, con grupo control en paralelo, se les suministró por vía oral cápsulas de *Hericium erinaceus* durante 16 semanas a hombres y mujeres japoneses de entre 50-80 años diagnosticados con deterioro cognitivo leve. El grupo tratado con el hongo mostró un incremento significativo de la función cognitiva, aunque 4 semanas después de finalizar el tratamiento la puntuación en los test comenzó a disminuir. [254] Además, este hongo también ha demostrado poseer funciones neuroprotectoras y antiinflamatorias a nivel neuronal, lo que lo convierte en un agente terapéutico útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. [204, 304] Las propiedades neuroprotectoras de los hongos medicinales estarían estrechamente relacionadas con sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. [304]

El suplemento con prebióticos, como serían los extractos de hongos medicinales, está menos estudiado que el tratamiento con probióticos, pero es también una terapia emergente. [167] Se hacen necesarios ensayos clínicos prospectivos y longitudinales en pacientes oncológicos tratados con quimioterapia para desvelar los mecanismos subyacentes a la comunicación entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso que ocurre durante los tratamientos oncológicos, y como esta comunicación está mediada por el sistema inmune periférico. De esta manera se mejoraría la calidad de vida de millones de supervivientes de cáncer al reducir la prevalencia de las comorbilidades asociadas a los tratamientos oncológicos. [167] Los resultados del ensayo clínico cuyo protocolo se presenta en esta tesis doctoral contribuirán sin duda a avanzar en este sentido.

6.8 OTRAS APLICACIONES CLÍNICAS

Un aspecto importante en el tratamiento del paciente oncológico es la calidad de vida del indivíduo. Un aspecto al que se le presta especial atención en el diseño de nuestro ensayo clínico. En este sentido,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

además de sus efectos inmunoestimuladores, antiinflamatorios y prebióticos, otro efecto coadyuvante beneficioso de los hongos medicinales es en el tratamiento del dolor crónico de los pacientes oncológicos. Estos pacientes pueden desarrollar tolerancia a los opioideos, como la morfina, utilizados como estrategia clínica efectiva. Los hongos podrían ayudar en el tratamiento de este dolor crónico. En este sentido, en un modelo en ratas, el tratamiento con polisacáridos de *Trametes versicolor* es capaz de inhibir el desarrollo de la tolerancia a la morfina a través de la activación del receptor cannabinoide de tipo 2. [410]

Otra aplicación de los extractos de hongos dentro de la oncología sería el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Por ejemplo, el desarrollo de este tipo de vacunas mediante la fusión de células dendríticas y células tumorales se ve mejorada mediante el tratamiento de las células con polisacáridos aislados de *Trametes versicolor*, que funcionan como agonistas del receptor TLR2. [185, 186] A través de su acción como agonista del TLR2, el polisacárido K de *Trametes versicolor* incrementa el efecto antitumoral de la terapia con anticuerpos monoclonales gracias a la activación de las células NK. [226] Además, se ha descrito que el PSK de *Trametes versicolor* promueve la maduración de las células dendríticas, esenciales en los procesos de vacunación contra el cáncer. [86, 171, 378] También se podrían utilizar para el desarrollo de nuevas quimioterapias. En este sentido, la conjugación del PSF de *Trametes versicolor* con nanopartículas de selenio inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama *in vitro*, a través de mecanismos estimuladores de la apoptosis. [437] Lignanos (metabolitos secundarios que se encuentran en una amplia variedad de plantas) sintetizados con la ayuda de una enzima lacasa aislada de *Trametes versicolor*, mostraron actividad antiproliferativa *in vitro* en células de carcinoma de colon. [49]

Las propiedades inmunomoduladoras de los peptidoglicanos extraídos de los hongos medicinales pueden tener otras aplicaciones terapéuticas además de las oncológicas. Por ejemplo, los polisacáridos de *Ganoderma lucidum* pueden contribuir al control de pacientes con inmunodeficiencia inducida por el abuso de opiáceos, gracias a su capacidad de restauración de parámetros inmunológicos deprimidos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por este tipo de analgésicos, como ha sido demostrado en modelos murinos. [228] Además, aunque los extractos de muchos hongos medicinales han demostrado ser capaces de estimular el sistema inmune, algunos son capaces de suprimir o reducir respuestas inmunes. Esto podría ser de gran interés para el tratamiento de alergias, un padecimiento de incidencia creciente en todo el mundo. [219] En este sentido, se ha descrito que la ingesta de un extracto de *Agaricus blazei* Murrill disminuye la respuesta alérgica inducida en ratones, presumiblemente a través de la activación de células Th1. [36] Los trasplantes también pueden beneficiarse de las propiedades inmunomoduladoras de los hongos medicinales. Por ejemplo, un metaanálisis concluyó que el tratamiento coadyuvante con *Ophiocordyceps sinensis* mejoró la función renal en enfermos sometidos a trasplante de riñón. [290]

También más allá de la oncología, son dignas de tener en cuenta otras posibles aplicaciones futuras de los hongos. Así, la riqueza enzimática de los hongos puede ser también utilizada para transformar moléculas y obtener nuevos compuestos con actividades terapéuticas [247] o para el desarrollo de nuevas terapias génicas. [194] También pueden utilizarse para cuestiones de calidad alimentaria, como sería el caso del control de micotoxinas producidas por hongos filamentosos que crecen en los alimentos, gracias a las acciones antioxidantes de los β-glucanos. Una estrategia más ecológica que el uso de compuestos químicos manufacturados. [486, 487] Estudios recientes han considerado la aplicación de extractos del hongo *Trametes versicolor* como posible agente biológico en el control de hongos productores de micotoxinas en alimentos. Los extractos de este hongo son capaces de inhibir entre un 40 y un 90 % la producción de las aflatoxinas producidas por hongos tóxicos en cultivos líquidos. [70, 486] A pesar de que los pacientes diabéticos deben extremar las precauciones por el posible efecto hipoglucemiante de algunos hongos, [311] los hongos también pueden tener efectos beneficiosos para los enfermos de diabetes. Así, extractos acuosos de *Trametes versicolor* han demostrado mejorar la resistencia a insulina y reducen los niveles de glucosa en sangre en modelos murinos. Este efecto parece ser ejercido a través de la ruta

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intracelular de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). [442]

Los hongos medicinales también pueden ser utilizados como coadyuvantes para la lucha contra infecciones. En este sentido, se ha descrito que la inyección IP de extracto rico en polisacáridos de *Agaricus brasiliensis* aumenta la capacidad fungicida frente *Candida albicans* en macrófagos de ratón mediante el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno. [239]

Como nutracéuticos, los hongos medicinales son también muy prometedores para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas. Un ejemplo podría ser la osteoporosis, pues los extractos de diversas especies de basidiomicetos superiores han demostrado *in vitro* y en modelos animales su potencialidad en el tratamiento de esta enfermedad. [87]

6.9 PROYECCIONES DE FUTURO

La micoterapia aplicada ofrece una gran variedad de oportunidades que se podrán hacer efectivas en un futuro próximo. Los activos naturales, incluídos los extractos de hongos, pueden llenar los vacíos en el tratamiento oncológico actual, pues ofrecen alternativas útiles como principios inmunomoduladores, antiinflamatorios, apoptóticos y antiangiogénicos. [367] Se estima que de los seis millones de toneladas de hongos que se cultivan cada año, [45] al menos la mitad pueden tener propiedades medicinales y puedan ser usados como fuentes de substancias bioactivas. [337] Las investigaciones están descubriendo, y descubrirán en un futuro próximo, nuevas especies de hongos con propiedades terapéuticas. Ese sería el caso de *Trametes trogii* (*Funalia trogii*) [490] y *Earliella scabrosa*, [491] dos políporos (hongos en repisa) de los que recientemente se han descrito actividades anticancerígenas. La inyección intraperitoneal de un extracto rico en polisacáridos de *Pleurotus djamor* inhibe en un 94 % el crecimiento tumoral en un modelo murino de sarcoma. [35] Un trabajo con *Trametes versicolor* y *Trametes gibbosa* identificó 28 compuestos con alta actividad antioxidante. [309] Una potente actividad antioxidante también se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

demostró *in vitro* e *in vivo* con extractos ricos en polisacáridos de *Metacordyceps taii* (*Cordyceps taii*). [443] Los hongos medicinales surgen pues como una terapia novedosa que puede mejorar el tratamiento del cáncer y la supervivencia de los pacientes oncológicos. Sus propiedades antitumorales, inmunológicas y prebióticas, junto con su baja toxicidad, los convierten en unos excelentes candidatos para paliar los efectos adversos de la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía de resección convencionales.

Existen pues grandes ventajas en incorporar los hongos y sus extractos a la dieta normal debido a las mencionadas propiedades inmunomoduladoras, antitumorales y prebióticas de los polisacáridos fúngicos. Sin embargo, los datos son todavía escasos y es necesario realizar investigaciones más exhaustivas para caracterizar el papel prebiótico de los hongos. Es decir, la oncología botánica y fúngica es un campo emergente y las nuevas investigaciones son casi desesperadamente necesarias. Las evidencias crecientes aportadas por varios grupos de investigación en todo el mundo, respecto a la aplicación antitumoral de los extractos de hongos, hace que la micoterapia oncológica sea indudablemente un área de investigación científica que probablemente crezca con rapidez y atraiga una atención masiva. [299]

Desafortunadamente, la mayor parte de los datos proceden de estudios *in vitro* o con modelos animales. El número de estudios de alta calidad metodológica en el campo de la micoterapia es todavía pequeño, lo que limita la aplicación clínica de los resultados obtenidos. [337] Por lo tanto, es necesario un programa de investigación traslacional que pueda llevar estos resultados preclínicos a la investigación clínica aplicada [337]. Es preciso responder de forma precisa y contundente a la pregunta de si existe una alternativa o coadyuvancia eficaz para reducir el riesgo de recurrencia en los pacientes con cáncer tras el tratamiento convencional. Los estudios que se necesitan con una prioridad muy alta serían los siguientes: [320, 350, 367]

- Ensayos clínicos prospectivos en pacientes oncológicos en los que se apliquen nutracéuticos basados en la evidencia científica disponible.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Ensayos clínicos bien diseñados, aleatorizados, en doble ciego y controlados mediante placebo en el uso de prebióticos (y probióticos) para dilucidar por completo las interacciones de la flora intestinal con factores genéticos, epigenéticos, inmunológicos, dietéticos, etc.
- Ensayos de oncología botánica combinada en los que se utilice un compuesto activo aislado con propiedades anticancerígenas demostradas.
- Investigación traslacional sobre los mecanismos de acción de estos principios bioactivos para conseguir así tratamientos más específicos según el tipo de cáncer.
- Desarrollo de formulaciones intravenosas de los principios activos encontrados en los hongos y plantas medicinales.
- La combinación de productos naturales con tratamientos oncológicos convencionales supone un desafío metodológico que puede y debe ser resuelto. Se hace por lo tanto necesaria la estandarización de los nutracéuticos ensayados, tanto en lo que se refiere a la composición química como a la actividad biológica.
- Ensayos con un solo agente nutracéutico, en dosis crecientes, en pacientes oncológicos.
- Ensayos clínicos en Fase I de nuevos candidatos a nutracéuticos.
- Ensayos clínicos aleatorizados de productos bien caracterizados para comprender mejor los efectos y las aplicaciones específicas de los compuestos fúngicos. Dichos estudios deberán investigar cual es el momento y la duración óptimas del tratamiento coadyuvante.

En definitiva, existen en la actualidad pruebas suficientes de la efectividad de ciertos hongos medicinales como poderosos agentes anticancerígenos, además de sus propiedades antivirales, antibacterianas, analgésicas e inmunoreguladoras. Por esta razón se hace necesario una investigación clínica más exhaustiva, con el fin de confirmar y optimizar los beneficios del tratamiento coadyuvante con estos hongos en pacientes diagnosticados con enfermedades crónicas como el cáncer. [70] Nuevas investigaciones que permitan dilucidar los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mecanismos celulares y fisiológicos a través de los cuales los hongos medicinales ejercen sus efectos. Por ejemplo, el PSP de *Trametes versicolor* ha demostrado ser beneficioso para la calidad de vida y la supervivencia de pacientes con cáncer, hepatitis, hiperlipidemia y otras enfermedades crónicas. Este polisacárido activa a las células inmunitarias, aumenta la expresión de citoquinas y quimioquinas, mejora la infiltración de las células dendríticas y las células T en los tumores, y reduce la incidencia de EA asociados a la quimioterapia. [57] Los resultados en los ensayos clínicos avalan el uso del PSP como un potente inmunoterapéutico. Sin embargo, las complejas propiedades químicas y farmacológicas de esta molécula aún están por dilucidar en su totalidad. Otro ejemplo sería el del ensayo clínico realizado con extracto de *Ophiocordyceps sinensis*, que mejora de forma significativa la calidad de vida de los pacientes con asma de moderada a severa cuando se añade como coadyuvante al tratamiento convencional. [411]

Las investigaciones futuras necesitarán validar el impacto de cada especie y extracto de hongo en el tratamiento de los pacientes oncológicos. El ensayo clínico en pacientes con CCR cuyo diseño se presenta en esta tesis doctoral servirá para contribuir a paliar las deficiencias arriba señaladas en el campo de la micoterapia.

No resulta difícil imaginar el gran desarrollo que tendrá la micoterapia aplicada en las próximas décadas. Varias compañías en todo el mundo están ya dedicadas a la preparación de fórmulas anticancerígenas a partir de extractos de hongos, usando las más modernas tecnologías y consiguiendo cada vez un mayor reconocimiento a nivel mundial. Un ejemplo de este progreso es el ensayo clínico cuyo diseño se describe en la presente tesis doctoral, un trabajo pionero en España dentro del campo de la micoterapia en general, y del uso de los extractos de hongos como medicina coadyuvante para el tratamiento del cáncer, en particular. La fórmula Mico-Digest 2.0® desarrollada por Hifas da Terra será ensayada como terapia coadyuvante en enfermos de cáncer colorrectal. Entre los distintos parámetros de valoración que se medirán en este estudio piloto están la posible mejora de los valores inmunológicos. La estimulación inmunológica durante el cáncer puede ser beneficiosa en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

términos de regresión tumoral y supervivencia de los pacientes. [397] Las terapias actuales pueden así beneficiarse de otros tratamientos paralelos que no solo mejoren la calidad de vida del paciente, sino que aumenten su supervivencia. En el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes reciben tratamientos antineoplásicos, lo que produce inmunodepresión. La evidencia acumulada sugiere que el tratamiento con hongos puede revertir la mielosupresión, lo que los convierte en una terapia complementaria muy prometedora a la hora de mejorar los resultados finales del tratamiento oncológico. Como hemos descrito anteriormente, los hongos parecen aumentar los efectos de la quimioterapia a través de diversos mecanismos. La evaluación de este posible efecto coadyuvante es uno de los principales objetivos de nuestro estudio. También debemos tener en cuenta que la mejora de la respuesta inmune inducida por los extractos de hongos puede depender de una serie de factores, lo que incluye la dosis, la vía de administración y el momento de administración.

No podemos olvidar el hecho de que un extracto fúngico es un complejo de multitud de principios bioactivos, lo que puede inducir múltiples actividades estimuladoras. Así, polímeros derivados de diferentes fuentes pueden diferenciarse en su afinidad por receptores específicos, [398] desencadenando diferentes efectos biológicos en función del origen de estos polímeros. [259] Este factor de efectos pleiotrópicos se multiplica en el caso de tratamientos con combinaciones de varios hongos medicinales, como es el caso de la fórmula Mico-Digest 2.0® que será evaluada en nuestro ensayo clínico.

En cuanto a los efectos pleiotrópicos, no existen muchos estudios enfocados en la combinación de varios hongos medicinales. Por ejemplo, los efectos inmunorreguladores y antitumorales del PSP en un modelo tumor sólido inducido en ratón (carcinoma de ascitis de Ehrlich) fueron incrementado mediante la coadministración de polisacárido de *Astragalus membranaceus*, una planta utilizada en la MTC. [206] Un estudio *in vitro* con células HL-60 mostró que los efectos proapoptóticos del extracto de *Trametes versicolor* se potenciaban con la adición de extracto de *Ganoderma lucidum*, lo que sugiere una potencial sinergia en sus efectos y mecanismos de acción. [136] En el caso de *Ganoderma lucidum*, los triterpenos suprimen el crecimiento y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el comportamiento invasivo de las células cancerosas, mientras que los polisacáridos estimulan el sistema inmune, incrementando la producción de citocinas y la actividad anticancerosa de las células inmunes. [260, 328] La combinación del PSP de *Trametes versicolor* con bajas dosis de IL-2 enlentece la progresión tumoral en un modelo murino de cáncer inducido. [234] La administración oral de una mezcla de *Agaricus blazei* Murrill, *Ophiocordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* y *Lentinula edodes* redujo dramáticamente la metástasis pulmonar, la respuesta fibrótica y los marcadores inflamatorios en un modelo murino de cáncer de mama. [332]

En la MTC, las recetas con productos naturales se administran a los pacientes como complejas formulaciones con múltiples componentes, lo que equivale a la administración de varias entidades químicas a la vez. [135] De hecho, el uso de productos botánicos en oncología se basa en la hipótesis sinérgica: la combinación de diferentes compuestos activos bien seleccionados de una o más especies botánicas tendrá un efecto antineoplásico más acusado que cada componente por separado, a la vez que disminuye los EA y las toxicidades. [135, 367] Si bien algunos estudios han reportado este efecto sinérgico, [135, 136] los mecanismos por los que se producen estos efectos sinérgicos están aún por dilucidar en su totalidad. [47, 48, 62, 289, 473]

6.10 EPÍLOGO

Los diversos estudios clínicos y preclínicos han demostrado que los hongos medicinales pueden ser usados no sólo como potentes inmunomoduladores, sino también como fuentes de metabolitos capaces de atravesar la membrana celular e interferir con diferentes rutas de señalización, influyendo así en procesos tales como la inflamación, la diferenciación celular, la carcinogénesis y la metástasis. [418] La evidencia acumulada gracias a los estudios clínicos demuestra que los hongos medicinales y sus componentes pueden ser utilizados de forma eficaz y segura como terapia coadyuvante en muchos tipos de cáncer. [336] Incluso han demostrado su utilidad como terapia preventiva. [418] Cada día está más aceptada la idea de que los hongos medicinales y sus compuestos bioactivos pueden aportar soluciones efectivas para el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tratamiento de diversos tipos de cánceres en diversos puntos del proceso patológico. [325] Por lo tanto, una investigación rigurosa sobre nuevos compuestos anticancerígenos derivados de los hongos, así como la determinación de sus dianas moleculares y sus mecanismos de acción, está perfectamente justificada. [325] Además, los estudios clínicos sobre el uso de los hongos medicinales para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, son todavía relativamente escasos y dispersos. No existe aún una evidencia firme sobre las dosis o periodos de tratamiento más adecuados. [320, 418]

Además, no en todos los tipos de cáncer ni en todos los estudios el uso de hongos medicinales produce efectos significativos. Por ejemplo, en un ensayo clínico en pacientes con hepatocarcinoma avanzado y funcionalidad del hígado comprometida, la ingesta de *Trametes versicolor* produjo una cierta mejoría en la calidad de vida de los pacientes, comparados con el grupo control. Pero no hubo diferencias significativas en cuanto a otros criterios de valoración, como tiempo hasta la progresión, supervivencia libre de progresión o supervivencia global. [59] Existen muchos factores clínicos que tener en cuenta en los pacientes oncológicos. Algunos de estos efectos aún no caracterizados de forma apropiada se han podido observar en modelos animales. Por ejemplo, un estudio en ratas demostró que la hipertermia debida a fiebre, reducía los efectos inmunoestimuladores y anticancerígenos de polisacáridos derivados de *Trametes versicolor*. [300] Pero, por otro lado, un estudio diferente también en ratas demostró que el PSP de *Trametes versicolor* era capaz de inducir una disminución de la temperatura corporal, mediante un mecanismo dependiente de TNF-α. [152] Aunque otro estudio en ratas demostró que el pretratamiento con PSP, mediante inyección IP, incrementaba el periodo de fiebre inducido por la inyección del antígeno lipopolisacárido. Este efecto parecía estar mediado por la IL-6. [151]

Lo que resulta indudable es que a medida que el tratamiento de los diversos tipos de cáncer continúe evolucionando, los hongos serán cada vez más considerados como una terapia coadyuvante válida. Al igual que con cualquier otro fitoquímico, los métodos de administración, la dosis, la concentración, la duración del tratamiento, etc., serán factores de gran relevancia a dilucidar en las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

investigaciones futuras. Con una mejor comprensión de los mecanismos de acción de los principios bioactivos de los hongos, la medicina integrativa y la oncología trabajarán en tándem para determinar el tratamiento más adecuado para cada individuo. [109] Por lo tanto, la medicina complementaria e integrativa constituye un enfoque novedoso para la atención oncológica, a menudo asociada con un impacto positivo en los pacientes con cáncer en términos de mejor respuesta al tratamiento oncológico tradicional, menos efectos secundarios adversos y mejora de la calidad de vida. [332, 337]

Los hongos medicinales representan un segmento creciente de la industria farmacéutica actual debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos útiles que contienen. Si bien los hongos tienen una larga historia de uso terapéutico en diversas culturas, es en la actualidad cuando están respaldados por investigaciones científicas modernas. Los micólogos de todo el mundo están convencidos de que un mayor conocimiento de los hongos puede mejorar el tratamiento de los enfermos oncológicos en diversas etapas de la enfermedad. [299]

Según los estudios realizados hasta la fecha, parece evidente que la terapia utilizada de forma concomitante a los tratamientos hospitalarios resulta de gran utilidad al mejorar la calidad de vida del paciente oncológico. Esta calidad de vida se ve reflejada a nivel anímico, gracias a los efectos beneficiosos de los hongos sobre la salud emocional, en la forma en la que el paciente se enfrenta a la patología y su proceso. El consumo de extractos de hongos como terapia coadyuvante mejora los niveles linfocitarios, lo que permite la aplicación continuada del tratamiento hospitalario estándar, así como una mayor adherencia al tratamiento por parte del paciente. La micoterapia oncológica puede tener además otros efectos beneficiosos como mejorar las condiciones dermatológicas, lo que a su vez repercute en un mejor estado ánimo del paciente, incrementar la supervivencia media, optimizar los ciclos metabólicos y mejorar el funcionamiento mitocondrial. A nivel de microbiota, los hongos pueden ser excelentes prebióticos que apoyan el desarrollo de las poblaciones bacterianas beneficiosas del tracto gastrointestinal. [141, 391] Esto es importante pues existe una clara relación entre el estado de la microbiota intestinal y la respuesta a los tratamientos oncológicos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Además de la exploración de especies fúngicas silvestres que pueden ofrecer propiedades medicinales únicas, se hace también necesaria la caracterización, conservación y clonación de los hongos con mayores propiedades terapéuticas. Sobre todo, si queremos alcanzar un desarrollo sostenible de la micoterapia. Se deben realizar investigaciones específicas para aislar, purificar y caracterizar nuevos compuestos anticancerígenos e inmunomoduladores. Los estudios realizados hasta la fecha han supuesto ya un gran avance en este sentido, pues se han aislado componentes bioactivos específicos y se ha profundizado en sus mecanismos de acción. Sin embargo, aún se necesitan investigaciones adicionales para dilucidar los diferentes roles que los múltiples compuestos fúngicos pueden tener, así como las distintas rutas metabólicas y celulares implicadas. Estos hallazgos serán esenciales, sobre todo debido a la falta de agentes quimioterapéuticos efectivos para algunas formas de cáncer.

Los resultados de nuestro estudio añadirán nuevos conocimientos y perspectivas al creciente campo del uso terapéutico de los hongos, así como datos útiles para el diseño de futuros ensayos clínicos en micoterapia aplicada a la oncología integrativa. Estos ensayos ayudarán a mejorar el pronóstico del enfermo oncológico. De hecho, la micoterapia podría ser una ayuda crucial tanto para el enfermo, como para familiares, cuidadores y profesionales de la salud.

La evidencia acumulada hasta la fecha ha demostrado que los extractos fúngicos poseen útiles propiedades antitumorales e inmunoestimuladoras, no interfieren con otros fármacos, poseen una baja toxicidad sin apenas efectos secundarios y ayudan a incrementar la esperanza de vida y la calidad de vida del paciente. Tanto como alimentos, suplemento dietético o medicamento, una ingesta regular de hongos puede hacernos más sanos, estar más en forma, ser más felices y ayudarnos a vivir más tiempo. [56]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 CONCLUSIONES

- Los extractos de hongos medicinales evaluados presentaron capacidades prebióticas *in vivo* e *in vitro*, con baja probabilidad de interacciones medicamentosas negativas.
- El extracto del hongo *Hericium erinaceus* presentó actividad prebiótica *in vitro* al favorecer el crecimiento de bacterias probióticas beneficiosas (*Bifidobacterium sp.* y *Lactobacillus sp.*) frente a bacterias entéricas (*Escherichia coli*).
- La baja inhibición de la familia enzimática del CYP450 demuestran una baja probabilidad de interacciones medicamentosas negativas entre los fármacos convencionales y los extractos fúngicos ensayados.
- Los resultados parciales en el modelo murino de CCR permitieron sugerir un posible efecto antiinflamatorio de la fórmula Mico-Digest 2.0® desarrollado por Hifas da Terra. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo que se hacen necesarios nuevos experimentos con modelos animales.
- Los ratones a los que se les indujo CCR tratados con Mico-Digest2.0® presentaron diferencias estadísticamente significativas taxonómicas en su flora intestinal con respecto a animales con CCR inducido y animales sanos. Estos resultados demostraron la capacidad prebiótica *in vivo* del compuesto fúngico. Las familias que se expresan de forma diferencial fueron Bifidobacteriaceae, Erysipelotrichaceae y Clostridiaceae (concretamente el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

género *Candidatus* Arthromitus). Nuevos experimentos y análisis permitirán caracterizar en mayor profundidad este efecto prebiótico.

- El ensayo clínico, multicéntrico, aleatorizado, en doble ciego diseñado en la presente tesis doctoral permitirá evaluar el efecto del nutracéutico Mico-Digest 2.0® en las complicaciones asociadas a la cirugía colorrectal del CCR tratado con intención curativa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Abdulla MA, Noor S, Wong K-H, Ali HM. Effect of culinary-medicinal lion's mane mushroom, Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllophoromycetideae), on ethanol-induced gastric ulcers in rats. Int J Med Mushrooms. 2008;10(4):325-330. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v10.i4.40.
2. Abis GSA, Stockmann HBAC, Bonjer HJ, van Veenendaal N, van Doorn-Schepens MLM, Budding AE, et al. Randomized clinical trial of selective decontamination of the digestive tract in elective colorectal cancer surgery (SELECT trial). Br J Surg. 2019;106(4):355-363. DOI: 10.1002/bjs.11117.
3. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. Nat Rev Immunol. 2010;10(2):131-414. DOI: 10.1038/nri2707.
4. Adiamah A, Skořepa P, Weimann A, Lobo DN. The Impact of Preoperative Immune Modulating Nutrition on Outcomes in Patients Undergoing Surgery for Gastrointestinal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. Ann Surg. 2019;270(2):247-256. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003256.
5. Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JL, et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, Agaricus blazei Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. Int J Gynecol Cancer. 2004;14(4):589-594. DOI: 10.1111/j.1048-891X.2004.14403.x.
6. Aida FMNA, Shuhaimi M, Yazid M, Maaruf AG. Mushrooms as potential source of prebiotics: a review. Trends Food Sci Tech.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2009;20(11-12):567-575. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.007.

7. Akamatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Nakamura R, Hayashi S, Kodama D, et al. Hepatoprotective effects of extract from Lentinus edodes mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biol Pharm Bull. 2004;24(12):1957-1960. DOI: https://doi.org/10.1248/bpb.27.1957.

8. Akhiani AA, Pappo J, Kabok Z, Schön K, Gao W, Franzén LE, et al. Protection against Helicobacter pylori infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. J Immunol. 2002;169(12):6977-6984. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6977.

9. Anai H, Sakaguchi Y, Emi Y, Kohnoe S, Maehara Y, Sugimachi K. A protein-bound polysaccharide immunomodulator, PSK, does not suppress the conversion from 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil to 5-fluorouracil in patients with gastric cancer. Anticancer Drugs. 1991;2(3):275-278. DOI: 10.1097/00001813-199106000-00009.

10. Andritsch E, Dietmaier G, Hofmann G, Zloklikovits S, Samonigg H. Global quality of life and its potential predictors in breast cancer patients: an exploratory study. Support Care Cancer. 2007;15(1):21-30. DOI: 10.1007/s00520-006-0089-7.

11. ANEFP: Asociación para el Autocuidado de la Salud. Memoria Anual 2017 [Internet]. Madrid: ANEFP; 2017 [última consulta en febrero de 2019]. Disponible en: https://www.anefp.org/sites/default/files/memorias_anuales/memoria_anefp_2017.pdf.

12. Antunes LC, Han J, Ferreira RB, Lolić P, Borchers CH, Finlay BB. Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(4):1494-1503. DOI: 10.1128/AAC.01664-10.

13. Aoyagi H, Iino Y, Takeo T, Horii Y, Morishita Y, Horiuchi R. Effects of OK-432 (picibanil) on the estrogen receptors of MCF-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7 cells and potentiation of antiproliferative effects of tamoxifen in combination with OK-432. Oncology. 1997;54(5):414-423. DOI: 10.1159/000227728.

14. Asai K, Kato H, Hirose K, Akaogi K, Kimura S, Mukai S, et al. PSK and OK-432-induced immunomodulation of inducible nitric oxide (NO) synthase gene expression in mouse peritoneal polymorphonuclear leukocytes and NO-mediated cytotoxicity. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2000;22(2):221-235. DOI: 10.3109/08923970009016417.

15. Awadasseid A, Eugene K, Jamal M, Hou J, Musa Hago A, Gamallat Y, et al. Effect of Coriolus versicolor glucan on the stimulation of cytokine production in sarcoma-180-bearing mice. Biomed Rep. 2017a;7(6):567-572. DOI: 10.3892/br.2017.999.

16. Awadasseid A, Hou J, Gamallat Y, Xueqi S, Eugene KD, Musa Hago A, et al. Purification, characterization, and antitumor activity of a novel glucan from the fruiting bodies of Coriolus Versicolor. PLoS One. 2017b;12(2):e0171270. DOI: 10.1371/journal.pone.0171270.

17. Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, de la Cruz-Herrera CF, Romero I. Exploring alternative treatments for Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol. 2014;20(6):1450-1469. DOI: 10.3748/wjg.v20.i6.1450.

18. Ballenger JC, Davidson JR, Lecrubier Y, Nutt DJ, Jones RD, Berard RM, et al. Consensus statement on depression, anxiety, and oncology. J Clin Psychiatry. 2001;62(8):64-67.

19. Bao DP, Bai R, Gao YN, Wu YY, Wang Y. Computational Insights into the Molecular Mechanism of the High Immunomodulatory Activity of LZ-8 Protein Isolated from the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom Ganoderma lucidum (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms. 2018;20(6):537-548. DOI. 10.1615/IntJMedMushrooms.2018026264.

20. Barbara G, Scaioli E, Barbaro MR, Biagi E, Laghi L, Cremon C, et al. Gut microbiota, metabolome and immune signatures in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

patients with uncomplicated diverticular disease. Gut. 2017;66(7):1252-1261. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312377.

21. Barbieri A, Quagliariello V, Del Vecchio V, Falco M, Luciano A, Amruthraj NJ, et al. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Ganoderma lucidum Extract Effects on Melanoma and Triple-Negative Breast Cancer Treatment. Nutrients. 2017;9(3):210. DOI: 10.3390/nu9030210.
22. Barnes TC, Anderson ME, Moots RJ. The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. Int J Rheumatol. 2011;2011:721608. DOI: 10.1155/2011/721608.
23. Barroilhet Díez, S, Forjaz MJ, Garrido Landívar E. Conceptos, teorías y factores psicosociales en la adaptación al cáncer. Actas Españolas de Psiquiatría. 2005;33(6):390-397.
24. Barros AB, Ferrão J, Fernandes T. A safety assessment of Coriolus versicolor biomass as a food supplement. Food Nutr Res. 2016;60:29953. DOI: 10.3402/fnr.v60.29953.
25. Batra P, Sharma AK, Khajuria R. Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom Ganoderma lucidum (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits. Int J Med Mushrooms. 2013;15(2):127-143. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i2.20.
26. Berg B, Lelley JI. Compendium of Mycotherapy. Redding, CT; Begell House Inc.; 2016. Disponible en: https://www.begellhouse.com/ebook_platform/5a65edb04853cf0d.html.
27. Berretta M, Della Pepa C, Tralongo P, Fulvi A, Martellotta F, Lleshi A, et al. Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) in cancer patients: An Italian multicenter survey. Oncotarget. 2017;8(15):24401-24414. DOI: 10.18632/oncotarget.14224.
28. Bhattacharya S, Pal K, Jain S, Chatterjee SS, Konar J. Surgical Site Infection by Methicillin Resistant Staphylococcus aureus- on

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Decline? J Clin Diagn Res. 2016;10(9):DC32-DC36. DOI: 10.7860/JCDR/2016/21664.8587.

29. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds. Biotechnol Annu Rev. 2007;13:265-301. DOI: 10.1016/S1387-2656(07)13010-6.

30. Bohn JA, BeMiller JN. (1→3)-beta-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. Carbohyd Pol. 1995;28:3–14.

31. Boini S, Briançon S, Guillemin F, Galan P, Hercberg S. Impact of cancer occurrence on health-related quality of life: a longitudinal pre-post assessment. Health Qual Life Outcomes. 2004;2:4. DOI: 10.1186/1477-7525-2-4.

32. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol. 2019;37(8):852-857. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.

33. Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ, Gershwin ME. The immunobiology of mushrooms. Exp Biol Med (Maywood). 2008;233(3):259-276. DOI: 10.3181/0708-MR-227.

34. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects ofcyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions. 1944;43:179–186. DOI: https://doi.org/10.1007/BF01986686.

35. Borges GM, De Barba FF, Schiebelbein AP, Pereira BP, Chaves MB, Silveira ML, et al. Extracellular polysaccharide production by a strain of Pleurotus djamor isolated in the south of Brazil and antitumor activity on Sarcoma 180. Braz J Microbiol. 2014;44(4):1059-1065. DOI: 10.1590/S1517-83822014005000019.

36. Bouike G, Nishitani Y, Shiomi H, Yoshida M, Azuma T, Hashimoto T, et al. Treatment with extract of Agaricus blazei Murill enhanced Th1 response through intestinal epithelial cells and suppressed OVA-sensitized allergy in mice. Evid Based

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Complement Alternat Med. 2011;2011. pii: 532180. DOI: 10.1155/2011/532180.

37. Brandt CR, Piraino F. Mushroom antivirals. Recent Res Dev Antimicrob Agents Chemother. 2000;4:11-26.

38. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [published correction appears in CA Cancer J Clin. 2020 Jul;70(4):313]. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424. DOI: 10.3322/caac.21492

39. Breitbart W, Bruera E, Chochinov H, Lynch M. Neuropsychiatric syndromes and psychological symptoms in patients with advanced cancer. J Pain Symptom Manage. 1995;10(2):131-141.

40. Brown DC, Reetz J. Single agent polysaccharopeptide delays metastases and improves survival in naturally occurring hemangiosarcoma. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:384301. DOI: 10.1155/2012/384301.

41. Bruns ERJ, Argillander TE, Van Den Heuvel B, Buskens CJ, Van Duijvendijk P, Winkels RM, et al. Nutrition as a Form of Pre-Operative Enhancement in Patients Undergoing Surgery for Colorectal Cancer: A Systematic Review. Surg Infect (Larchmt). 2018;19(1):1-10. DOI: 10.1089/sur.2017.143.

42. Burgaletta C, Territo MC, Quan SG, Golde DW. Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. J Reticuloendothel Soc. 1978;23(3):195-204.

43. Cai X, Pi Y, Zhou X, Tian L, Qiao S, Lin J. Hepatoma cell growth inhibition by inducing apoptosis with polysaccharide isolated from Turkey tail medicinal mushroom, Trametes versicolor (L.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2010;12(3):257-263. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.40.

44. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Illumina amplicon data. Nat Methods. 2016;13(7):581-583. DOI: 10.1038/nmeth.3869.

45. Cano-Estrada A, Romero-Bautista L. Valor económico, nutricional y medicinal de hongos comestibles silvestres. Rev Chil Nutr. 2016;43(1):75-80. DOI: http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000100011.

46. Cao QZ, Lin ZB. Ganoderma lucidum polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. Life Sci. 2006;78(13):1457-1463. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.07.017.

47. Cao X, Liu R, Liu J, Huo Y, Yang W, Zeng M, et al. A novel polysaccharide from Lentinus edodes mycelia exhibits potential antitumor activity on laryngeal squamous cancer cell line Hep-2. Appl Biochem Biotechnol. 2013;171(6):1444-1453. DOI: 10.1007/s12010-013-0441-6.

48. Cao XY, Liu JL, Yang W, Hou X, Li QJ. Antitumor activity of polysaccharide extracted from Pleurotus ostreatus mycelia against gastric cancer in vitro and in vivo. Mol Med Rep. 2015;12(2):2383-2389. DOI: 10.3892/mmr.2015.3648.

49. Cardullo N, Pulvirenti L, Spatafora C, Musso N, Barresi V, Condorelli DF, et al. Dihydrobenzofuran neolignanamides: laccase-mediated biomimetic synthesis and antiproliferative activity. J Nat Prod. 2016;79(8):2122-2134. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00577.

50. Chan GCF, Chan WK, Sze DMY. The effects of β-glucan on human immune and cancer cells. J Hematol Oncol. 2009;2:25. DOI: https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25.

51. Chan SL, Yeung JH. Effects of polysaccharide peptide (PSP) from Coriolus versicolor on the pharmacokinetics of cyclophosphamide in the rat and cytotoxicity in HepG2 cells. Food Chem Toxicol. 2006a;44(5):689-694. DOI: 10.1016/j.fct.2005.10.001.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

52. Chan SL, Yeung JH. Modulation of antipyrine clearance by polysaccharide peptide (PSP) isolated from Coriolus versicolor in the rat. Food Chem Toxicol. 2006b;44(9):1607-1612. DOI: 10.1016/j.fct.2006.03.008.

53. Chan SL, Yeung JH. Polysaccharide peptides from COV-1 strain of Coriolus versicolor induce hyperalgesia via inflammatory mediator release in the mouse. Life Sci. 2006c;78(21):2463-2470. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.10.011.

54. Chan WK, Lam DT, Law HK, Wong WT, Koo MW, Lau AS, et al. Ganoderma lucidum mycelium and spore extracts as natural adjuvants for immunotherapy. J Altern Complement Med. 2005;11(6):1047-1057. DOI: 10.1089/acm.2005.11.1047.

55. Chang CJ, Lin CS, Lu CC, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, et al. Ganoderma lucidum reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. Nat Commun. 2015;6:7489. DOI: 10.1038/ncomms8489.

56. Chang ST, Wasser SP. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. Int J Med Mushrooms. 2012;14(2):95-134. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v14.i2.10.

57. Chang Y, Zhang M, Jiang Y, Liu Y, Luo H, Hao C, et al. Preclinical and clinical studies of Coriolus versicolor polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. Discov Med. 2017;23(127):207-219.

58. Chang YH, Yang JS, Yang JL, Wu CL, Chang SJ, Lu KW, et al. Ganoderma lucidum extracts inhibited leukemia WEHI-3 cells in BALB/c mice and promoted an immune response in vivo. Biosci Biotechnol Biochem. 2009;73(12):2589-2594.

59. Chay WY, Tham CK, Toh HC, Lim HY, Tan CK, Lim C, et al. Coriolus versicolor (Yunzhi) use as therapy in advanced hepatocellular carcinoma patients with poor liver function or who are unfit for standard therapy. J Altern Complement Med. 2017;23(8):648-652. DOI: 10.1089/acm.2016.0136.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

60. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal beta-(1→3), (1→6)-glucans. Mycol Res. 2007;111(Pt 6):635-652. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.02.011.

61. Chen NH, Liu JW, Zhong JJ. Ganoderic acid T inhibits tumor invasion in vitro and in vivo through inhibition of MMP expression. Pharmacol Rep. 2010;62(1):150-163. DOI: https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70252-8.

62. Chen X, Hu ZP, Yang XX, Huang M, Gao Y, Tang W, et al. Monitoring of immune response to an herbal immune-modulator in patients with advance colorectal cancer. Int Immunopharmacol. 2006;6(3):499-508. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.08.026.

63. Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarría J, Iglesias JR, et al. Novel probiotic Bifidobacterium bifidum CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium Helicobacter pylori. Appl Environ Microbiol. 2011;77(4):1335-1343. DOI: 10.1128/AEM.01820-10.

64. Chihara G, Maeda Y, Hamuro J , Sasaki T, Fukuoka F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from Lentinus edodes (Berk.) sing. Nature. 1969;222(5194):687-688.

65. Chou WT, Sheih IC, Fang TJ. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. J Food Sci. 2013;78(7):M1041-M1048. DOI: 10.1111/1750-3841.12160.

66. Chow LW, Lo CS, Loo WT, Hu XC, Sham JS. Polysaccharide peptide mediates apoptosis by up-regulating p21 gene and down-regulating cyclin D1 gene. Am J Chin Med. 2003;31(1):1-9. DOI: 10.1142/S0192415X03000758.

67. Chowdhury AH, Adiamah A, Kushairi A, Varadhan KK, Krznaric Z, Kulkarni AD, et al. Perioperative Probiotics or Synbiotics in Adults Undergoing Elective Abdominal Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. Ann Surg. 2020;271(6):1036-1047. DOI:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.1097/SLA.0000000000003581.

68. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. Ann Surg. 2009;250(2):187-196. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181b13ca2.

69. Coles M, Toth B. Lack of prevention of large intestinal cancer by VPS, an extract of Coriolus versicolor mushroom. In Vivo. 2005;19(5):867-871.

70. Córdoba KA, Ríos A. Biotechnological applications and potential uses of the mushroom Trametes versicolor. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2012;19(1):70-76.

71. Coy C, Standish LJ, Bender G, Lu H. Significant correlation between TLR2 agonist activity and TNF-α induction in J774.A1 macrophage cells by different medicinal mushroom products. Int J Med Mushrooms. 2015;17(8):713-722. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i8.20.

72. Cubiella J, González A, Almazán R, Rodríguez-Camacho E, Fontenla Rodiles J, Domínguez Ferreiro C, et al. pT1 Colorectal Cancer Detected in a Colorectal Cancer Mass Screening Program: Treatment and Factors Associated with Residual and Extraluminal Disease. Cancers (Basel). 2020;12(9):2530. DOI: 10.3390/cancers12092530.

73. Cui FJ, Li Y, Xu YY, Liu ZQ, Huang DM, Zhang ZC, et al. Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of Grifola frondosa GF9801. Toxicol In Vitro. 2007;21(3):417-427. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.10.004.

74. Defazio J, Fleming ID, Shakhsheer B, Zaborina O, Alverdy JC. The opposing forces of the intestinal microbiome and the emerging pathobiome. Surg Clin North Am. 2014;94(6):1151-1161. DOI: 10.1016/j.suc.2014.08.002.

75. Deng G, Lin H, Seidman A, Fornier M, D´Andrea G, Wesa K, et al. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from Grifola

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

frondosa (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. J Cancer Res Clin Oncol. 2009;135(9):1215-1221. DOI: 10.1007/s00432-009-0562-z.

76. Devi KS, Roy B, Patra P, Sahoo B, Islam SS, Maiti TK. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from Pleurotus ostreatus mycelia. Carbohydr Polym. 2013;94(2):857-865. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.02.017.

77. Dias ES, Abe C, Schwan RF: Truths and myths about the mushroom Agaricus blazei. Sci Agric. 2004;61:545–549.

78. Diling C, Chaoqun Z, Jian Y, Jian L, Jiyan S, Yizhen X, et al. Immunomodulatory Activities of a Fungal Protein Extracted from Hericium erinaceus through Regulating the Gut Microbiota. Front Immunol. 2017;8:666. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00666.

79. Diling C, Xin Y, Chaoqun Z, Jian Y, Xiaocui T, Jun C, et al. Extracts from Hericium erinaceus relieve inflammatory bowel disease by regulating immunity and gut microbiota. Oncotarget. 2017;8(49):85838-85857. DOI: 10.18632/oncotarget.20689.

80. Donatini B. Control of oral human papillomavirus (HPV) by medicinal mushrooms, Trametes versicolor and Ganoderma lucidum: a preliminary clinical trial. Int J Med Mushrooms. 2014;16(5):497-498. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v16.i5.80.

81. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002;2(3):161-174. DOI: 10.1038/nrc745.

82. Eisenbarth SC, Flavell RA. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. EMBO Mol Med. 2009;1(2):92-98. DOI: 10.1002/emmm.200900014.

83. Eliza WL, Fai CK, Chung LP. Efficacy of Yun Zhi (Coriolus versicolor) on survival in cancer patients: systematic review and meta-analysis. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2012;6(1):78-87. DOI: 10.2174/187221312798889310.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

84. Ellertsen LK, Hetland G. An extract of the medicinal mushroom Agaricus blazei Murill can protect against allergy. Clin Mol Allergy. 2009;7:6. DOI: 10.1186/1476-7961-7-6.

85. El-Mekkawy S, Meselhy MR, Nakamura N, Tesuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, et al. Anti-HIV and anti-HIV-protease substances from Ganoderma lucidum. Phytochemistry. 1998;49(6):1651–1657.

86. Engel AL, Sun GC, Gad E, Rastetter LR, Strobe K, Yang Y, et al. Protein-bound polysaccharide activates dendritic cells and enhances OVA-specific T cell response as vaccine adjuvant. Immunobiology. 2013;218(12):1468-1476. DOI: 10.1016/j.imbio.2013.05.001.

87. Erjavec I, Brkljacic J, Vukicevic S, Jakopovic B, Jakopovich I. Mushroom extracts decrease bone resorption and improve bone formation. Int J Med Mushrooms. 2016;18(7):559-569. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i7.10.

88. Espin Basany E, Solís-Peña A, Pellino G, Kreisler E, Fraccalvieri D, Muinelo-Lorenzo M, et al. Preoperative oral antibiotics and surgical-site infections in colon surgery (ORALEV): a multicentre, single-blind, pragmatic, randomised controlled trial. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2020;5(8):729-738. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30075-3.

89. Fernández MF, Reina-Pérez I, Astorga JM, Rodríguez-Carrillo A, Plaza-Díaz J, Fontana L. Breast Cancer and Its Relationship with the Microbiota. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(8):pii: E1747. DOI: 10.3390/ijerph15081747.

90. Ferrer M, Martins dos Santos VA, Ott SJ, Moya A. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. Gut Microbes. 2014;5(1):64-70. DOI: 10.4161/gmic.27128.

91. Fidler IJ, Ellis LM. Chemotherapeutic drugs--more really is not better. Nat Med. 2000 May;6(5):500-502. DOI: 10.1038/74969.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

92. Fisher M, Yang LX. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. Anticancer Res. 2002;22(3):1737-1754.

93. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. Environ Microbiol. 2007;9(5):1101-1111. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x.

94. Fontana S, Flugy A, Schillaci O, Cannizzaro A, Gargano ML, Saitta A, et al. In vitro antitumor effects of the cold-water extracts of Mediterranean species of genus Pleurotus (higher Basidiomycetes) on human colon cancer cells. Int J Med Mushrooms. 2014;16(1):49-63. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v16.i1.50.

95. Foti RS, Wahlstrom JL. The role of dietary supplements in cytochrome P450-mediated drug interactions. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2008;7(2):66-84.

96. Fritz H, Kennedy DA, Ishii M, Fergusson D, Fernandes R, Cooley K, et al. Polysaccharide K and Coriolus versicolor extracts for lung cancer: a systematic review. Integr Cancer Ther. 2015;14(3):201-211. DOI: 10.1177/1534735415572883.

97. Fukuda S, Morimoto K. Lifestyle, stress and cortisol response: Review II : Lifestyle. Environ Health Prev Med. 2001;6(1):15-21. DOI: 10.1007/BF02897304.

98. Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, et al. Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide). Mol Urol. 2000;4(1):7-13.

99. Gao Y, Tang W, Dai X, Gao H, Chen G, Ye J, et al. Effects of water-soluble Ganoderma lucidum polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. J Med Food. 2005;8(2):159-168. DOI: 10.1089/jmf.2005.8.159.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

100. Gao Y, Zhou S, Jiang W, Huang M, Dai X. Effects of ganopoly (a Ganoderma lucidum polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. Immunol Invest. 2003 Aug;32(3):201-215.

101. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J. 2011;278(1):16-27. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.

102. Gibbs JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. Science. 2000;287(5460):1969-1973. DOI: 10.1126/science.287.5460.1969.

103. Gill BS, Navgeet, Kumar S. Ganoderic acid targeting multiple receptors in cancer: in silico and in vitro study. Tumour Biol. 2016;37(10):14271-14290. DOI: 10.1007/s13277-016-5291-8.

104. Gonul O, Aydin HH, Kalmis E, Kayalar H, Ozkaya AB, Atay S, et al. Effects of Ganoderma lucidum (higher Basidiomycetes) extracts on the miRNA profile and telomerase activity of the MCF-7 breast cancer cell line. Int J Med Mushrooms. 2015;17(3):231-239. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i3.30.

105. González Casuarrán GA, Vanaclocha i Vanaclocha, B. Revisión sistemática sobre la eficacia de los preparados a base de hongos como tratamiento coadyuvante del carcinoma no microcítico de pulmón. Revista de Fitoterapia. 2017;17(2):101-115.

106. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. Immunol Rev. 2009;230(1):38-50. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x.

107. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. Nutr Rev. 2015;73 Suppl 1:32-40. DOI: 10.1093/nutrit/nuv039.

108. Gregory FJ, Healy EM, Agersborg HP Jr, Warren GH. Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. Mycologia. 1966;58(1):80-90.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

109. Guggenheim AG, Wright KM, Zwickey HL. Immune modulation from five major mushrooms: application to integrative oncology. Integr Med (Encinitas). 2014;13(1):32-44.

110. Gutierrez-Stampa MA, Aguilar V, Sarasqueta C, Cubiella J, Portillo I, Bujanda L. Impact of the faecal immunochemical test on colorectal cancer survival. BMC Cancer. 2020;20(1):616. DOI: 10.1186/s12885-020-07074-y.

111. Gutierrez-Stampa MA, Aguilar V, Sarasqueta C, Cubiella J, Portillo I, Bujanda L. Colorectal Cancer Survival in 50- to 69-Year-Olds after Introducing the Faecal Immunochemical Test. Cancers (Basel). 2020;12(9):2412. DOI: 10.3390/cancers12092412.

112. Han C, Yuan J, Wang Y, Li L. Hypoglycemic activity of fermented mushroom of Coprinus comatus rich in vanadium. J Trace Elem Med Biol. 2006;20(3):191-196. DOI: 10.1016/j.jtemb.2006.06.003.

113. Harhaji Lj, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D, Stojanović I, Momcilović M, Maksimović V, et al. Anti-tumor effect of Coriolus versicolor methanol extract against mouse B16 melanoma cells: in vitro and in vivo study. Food Chem Toxicol. 2008;46(5):1825-1833. DOI: 10.1016/j.fct.2008.01.027.

114. Hassan IJ, Stark RM, Greenman J, Millar MR. Activities of β-lactams and macrolides against Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(6): 1387–1392. DOI: 10.1128/AAC.43.6.1387.

115. Hatton MN, Desai K, Le D, Vu A. Excessive postextraction bleeding associated with Ophiocordyceps sinensis: a case report and review of select traditional medicines used by Vietnamese people living in the United States. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2018 Dec;126(6):494-500. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.07.005.

116. Hawksworth DL. Fungi in culture. Nature. 1984;310(5972):18.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

117. Hayakawa K, Mitsuhashi N, Saito Y, Nakayama Y, Furuta M, Nakamoto S, et al. Effect of Krestin as adjuvant treatment following radical radiotherapy in non-small cell lung cancer patients. Cancer Detect Prev. 1997;21(1):71-77.

118. Hayakawa K, Mitsuhashi N, Saito Y, Takahashi M, Katano S, Shiojima K, et al. Effect of krestin (PSK) as adjuvant treatment on the prognosis after radical radiotherapy in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 1993;13(5C):1815-1820.

119. Hearst R, Nelson D, McCollum G, Millar BC, Maeda Y, Goldsmith CE, et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (Lentinula edodes) and oyster (Pleurotus ostreatus) mushrooms. Complement Ther Clin Pract. 2009;15(1):5-7. DOI: 10.1016/j.ctcp.2008.10.002.

120. Hellum BH, Hu Z, Nilsen OG. The induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by six trade herbal products in cultured primary human hepatocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2007;100(1):23-30. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2007.00011.x.

121. Hermelink K. Chemotherapy and Cognitive Function in Breast Cancer Patients: The So-Called Chemo Brain. J Natl Cancer Inst Monogr. 2015;2015(51):67-69. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgv009.

122. Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, Lavoie Smith EM, Bleeker J, Cavaletti G, et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. J Clin Oncol. 2014;32(18):1941-1967. DOI: 10.1200/JCO.2013.54.0914.

123. Hess J, Wang Q, Gould T, Slavin J. Impact of Agaricus bisporus Mushroom Consumption on Gut Health Markers in Healthy Adults. Nutrients. 2018;10(10):1402. DOI: 10.3390/nu10101402.

124. Hifas da Terra. Vademécum de Micoterapia. Fichas Técnicas [Internet]. Portamuiños, Bora, Pontevedra; 2018 [consultado en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

febrero de 2019]. Disponible en: http://www.hifasdaterra.com/wp-content/uploads/2018/09/Vademecum-HdT-ES-2018.pdf.

125. Hirahara N, Edamatsu T, Fujieda A, Fujioka M, Wada T, Tajima Y. Protein-bound polysaccharide-K induces apoptosis via mitochondria and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in HL-60 promyelomonocytic leukemia cells. Oncol Rep. 2013;30(1):99-104. DOI: 10.3892/or.2013.2412.

126. Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan H, et al. Coriolus versicolor (Yunzhi) extract attenuates growth of human leukemia xenografts and induces apoptosis through the mitochondrial pathway. Oncol Rep. 2006;16(3):609-616. DOI: https://doi.org/10.3892/or.16.3.609.

127. Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan H, et al. Differential anti-tumor activity of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract through p53- and/or Bcl-2-dependent apoptotic pathway in human breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2005;4(6):638-644.

128. Ho CY, Lau CB, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, et al. Differential effect of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes in vitro. Int Immunopharmacol. 2004;4(12):1549-1557. DOI: 10.1016/j.intimp.2004.07.021.

129. Ho JC, Konerding MA, Gaumann A, Groth M, Liu WK. Fungal polysaccharopeptide inhibits tumor angiogenesis and tumor growth in mice. Life Sci. 2004;75(11):1343-1356. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.02.021.

130. Holland JC, Alici Y. Management of distress in cancer patients. J Support Oncol. 2010;8(1):4-12.

131. Hor SY, Ahmad M, Farsi E, Lim CP, Asmawi MZ, Yam MF. Acute and subchronic oral toxicity of Coriolus versicolor standardized water extract in Sprague-Dawley rats. J

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ethnopharmacol. 2011;137(3):1067-1076. DOI: 10.1016/j.jep.2011.07.007.

132. Hoshi H, Saito H, Iijima H, Uchida M, Wada T, Ito G, et al. Anti-protein-bound polysaccharide-K monoclonal antibody binds the active structure and neutralizes direct antitumor action of the compound. Oncol Rep. 2011;25(4):905-913. DOI: 10.3892/or.2011.1155.

133. Hsieh TC, Kunicki J, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Effects of extracts of Coriolus versicolor (I'm-Yunity) on cell-cycle progression and expression of interleukins-1 beta,-6, and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes. J Altern Complement Med. 2002;8(5):591-602. DOI: 10.1089/107555302320825101.

134. Hsieh TC, Wu JM. Cell growth and gene modulatory activities of Yunzhi (Windsor Wunxi) from mushroom Trametes versicolor in androgen-dependent and androgen-insensitive human prostate cancer cells. Int J Oncol. 2001;18(1):81-88. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.18.1.81.

135. Hsieh TC, Wu JM. Differential control of growth, cell cycle progression, and gene expression in human estrogen receptor positive MCF-7 breast cancer cells by extracts derived from polysaccharopeptide I'm-Yunity and Danshen and their combination. Int J Oncol. 2006;29(5):1215-1222. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.29.5.1215.

136. Hsieh TC, Wu JM. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by the combination of Coriolus versicolor and Ganoderma lucidum. Int J Mol Med. 2013;32(1):251-257. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1378.

137. Hsieh TC, Wu JM. Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of Ganoderma lucidum in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. Int J Mol Med. 2011;28(6):1065-1069. DOI: 10.3892/ijmm.2011.788.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

138. Hsu MJ, Lee SS, Lee ST, Lin WW. Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from Ganoderma lucidum. Br J Pharmacol. 2003;139(2):289-298. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705243.

139. Huang BM, Hsiao KY, Chuang PC, Wu MH, Pan HA, Tsai SJ. Upregulation of steroidogenic enzymes and ovarian 17beta-estradiol in human granulosa-lutein cells by Ophiocordyceps sinensis mycelium. Biol Reprod. 2004;70(5):1358-1364.

140. Huang BM, Hsu CC, Tsai SJ, Sheu CC, Leu SF. Effects of Ophiocordyceps sinensis on testosterone production in normal mouse Leydig cells. Life Sci. 2001;69(22):2593-25602. DOI: 10.1016/s0024-3205(01)01339-x.

141. Huebner J, Wehling RL, Hutkins RW. Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal. 2007;17(7):770-775. DOI: doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006.

142. Hui KP, Sit WH, Wan JM. Induction of S phase cell arrest and caspase activation by polysaccharide peptide isolated from Coriolus versicolor enhanced the cell cycle dependent activity and apoptotic cell death of doxorubicin and etoposide, but not cytarabine in HL-60 cells. Oncol Rep. 2005;14(1):1451-55. DOI: https://doi.org/10.3892/or.14.1.145.

143. Ina K, Furuta R, Kataoka T, Kayukawa S, Yoshida T, Miwa T, et al. Lentinan prolonged survival in patients with gastric cancer receiving S-1-based chemotherapy. World J Clin Oncol. 2011;2(10):339-343. DOI: 10.5306/wjco.v2.i10.339.

144. Ito G, Tanaka H, Ohira M, Yoshii M, Muguruma K, Kubo N, et al. Correlation between efficacy of PSK postoperative adjuvant immunochemotherapy for gastric cancer and expression of MHC class I. Exp Ther Med. 2012;3(6):925-930. DOI: 10.3892/etm.2012.537.

145. Itoh H, Ito H, Hibasami H. Blazein of a new steroid isolated from Agaricus blazei Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. Oncol Res. 2008;20(6):1359-1361. DOI: https://doi.org/10.3892/or_00000152.

146. Jafari MD, Wexner SD, Martz JE, McLemore EC, Margolin DA, Sherwinter DA, et al. Perfusion assessment in laparoscopic left-sided/anterior resection (PILLAR II): a multi-institutional study. J Am Coll Surg. 2015;220(1):82-92.e1. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.09.015.

147. Jakopovich I. New dietary supplements from medicinal mushrooms: Dr Myko San—a registration report. Int J Med Mushrooms. 2011;13(3):307-313. DOI: 10.1615/intjmedmushr.v13.i3.110.

148. Janjušević L, Pejin B, Kaišarević S, Gorjanović S, Pastor F, Tešanović K, et al. Trametes versicolor ethanol extract, a promising candidate for health-promoting food supplement. Nat Prod Res. 2018;32(8):963-967. DOI: 10.1080/14786419.2017.1366484.

149. Jedinak A, Thyagarajan-Sahu A, Jiang J, Sliva D. Ganodermanontriol, a lanostanoid triterpene from Ganoderma lucidum, suppresses growth of colon cancer cells through ß-catenin signaling. Int J Oncol. 2011;38(3):761-767. DOI: 10.3892/ijo.2011.898.

150. Jędrzejewski T, Pawlikowska M, Piotrowski J, Kozak W. Protein-bound polysaccharides from Coriolus versicolor attenuate LPS-induced synthesis of pro-inflammatory cytokines and stimulate PBMCs proliferation. Immunol Lett. 2016;178:140-147. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.08.013.

151. Jedrzejewski T, Piotrowski J, Kowalczewska M, Wrotek S, Kozak W. Polysaccharide peptide from Coriolus versicolor induces interleukin 6-related extension of endotoxin fever in rats. Int J Hyperthermia. 2015;31(6):626-634. DOI: 10.3109/02656736.2015.1046953.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

152. Jedrzejewski T, Piotrowski J, Wrotek S, Kozak W. Polysaccharide peptide induces a tumor necrosis factor-α-dependent drop of body temperature in rats. J Therm Biol. 2014;44:1-4. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2014.06.003.

153. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010;60(5):277-300. DOI: 10.3322/caac.20073.

154. Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, Cronin KA, Ma J, Ryerson B, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. J Natl Cancer Inst. 2017;109(9). DOI: 10.1093/jnci/djx030.

155. Jiang J, Eliaz I, Sliva D. Suppression of growth and invasive behavior of human prostate cancer cells by ProstaCaid™: mechanism of activity. Int J Oncol. 2011;38(6):1675-1682. DOI: 10.3892/ijo.2011.996.

156. Jiang J, Grieb B, Thyagarajan A, Sliva D. Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling. Int J Mol Med. 2008;21(5):577–584. DOI: https://doi.org/10.3892/ijmm.21.5.577.

157. Jiang J, Sliva D. Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells. Int J Oncol. 2010;37(6):1529-1536. DOI: 10.3892/ijo_00000806.

158. Jiang J, Slivova V, Harvey K, Valachovicova T, Sliva D. Ganoderma lucidum suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-kappaB signaling. Nutr Cancer. 2004;49(2):209-216. DOI: 0.1207/s15327914nc4902_13.

159. Jiang J, Slivova V, Sliva D. Ganoderma lucidum inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. Int J Oncol. 2006;29(3):695-703. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.29.3.695.

160. Jiang J, Thyagarajan-Sahu A, Loganathan J, Eliaz I, Terry C, Sandusky GE, et al. BreastDefend™ prevents breast-to-lung cancer metastases in an orthotopic animal model of triple-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

negative human breast cancer. Oncol Rep. 2012;28(4):1139-1145. DOI: 10.3892/or.2012.1936.

161. Jiang J, Wojnowski R, Jedinak A, Sliva D. Suppression of proliferation and invasive behavior of human metastatic breast cancer cells by dietary supplement BreastDefend. Integr Cancer Ther. 2011;10(2):192-200. DOI: 10.1177/1534735410386953.

162. Jiménez-Medina E, Berruguilla E, Romero I, Algarra I, Collado A, Garrido F, et al. The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. BMC Cancer. 2008;8:78. DOI: 10.1186/1471-2407-8-78.

163. Jin CY, Choi YH, Moon DO, Park C, Park YM, Jeong SC, et al. Induction of G2/M arrest and apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of Agaricus blazei. Oncol Rep. 2006;16(6):1349-1355. DOI: https://doi.org/10.3892/or.16.6.1349.

164. Jin X, Ruiz Bequerie J, Sze DM, Chan GC. Ganoderma lucidum (Reishi mushroom) for cancer treatment. Cochrane Database Syst Rev. 2016;4:CD007731. DOI: 10.1002/14651858.CD007731.pub3.

165. Johnson BM, Doonan BP, Radwan FF, Haque A. Ganoderic acid DM: an alternative agent for the treatment of advanced prostate cancer. Open Prost Cancer J. 2010;3:78-85.

166. Jones K. Reishi mushrooms: Ancient medicine in modern times. Alternative and Complementary Therapies. 1998;4(4):256-266.

167. Jordan KR, Loman BR, Bailey MT, Pyter LM. Gut microbiota-immune-brain interactions in chemotherapy-associated behavioral comorbidities. Cancer. 2018;124(20):3990-3999. DOI: 10.1002/cncr.31584.

168. Jumes FM, Lugarini D, Pereira AL, de Oliveira A, Christoff Ade O, Linde GA, et al. Effects of Agaricus brasiliensis mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. Can J Physiol Pharmacol. 2010;88(1):21-27. DOI: 10.1139/Y09-111.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

169. Kalra EK. Nutraceutical – Definition and Introduction. AAPS PharmSci. 2003;5(3):E25. DOI: 0.1208/ps050325.

170. Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa M, Umeda T. Direct tumor growth suppressive effect of melanoidin extracted from immunomodulator-PSK. Cancer Biother Radiopharm. 1997;12(5):341-344. DOI: 10.1089/cbr.1997.12.341.

171. Kanazawa M, Mori Y, Yoshihara K, Iwadate M, Suzuki S, Endoh Y, et al. Effect of PSK on the maturation of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. Immunol Lett. 2004;91(2-3):229-238. DOI: 10.1016/j.imlet.2003.12.007.

172. Kaneko T, Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Higashiguchi T, Sonoda S. Inhibition of Azoxymethane-induced Colorectal Aberrant Crypt Foci in Mice Fed a High-fat Diet by Pleurotus eryngii (Eringi) and Hypsizygus marmoreus (Bunashimeji). Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(9):3881-3885. DOI: http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.9.3881.

173. Kariya K, Nakamura K, Nomoto K, Matama S, Saigenji K. Mimicking of superoxide dismutase activity by protein-bound polysaccharide of Coriolus versicolor QUEL, and oxidative stress relief for cancer patients. Mol Biother. 1992;4(1):40-46.

174. Kato M, Asaka M. Recent knowledge of the relationship between Helicobacter pylori and gastric cancer and recent progress of gastroendoscopic diagnosis and treatment for gastric cancer. Jpn J Clin Oncol. 2010;40(9):828-837. DOI: 10.1093/jjco/hyq119.

175. Kawanishi T, Ikeda-Dantsuji Y, Nagayama A. Effects of two basidiomycete species on interleukin 1 and interleukin 2 production by macrophage and T cell lines. Immunobiology. 2010;215(7):516-520. DOI: 10.1016/j.imbio.2009.10.005.

176. Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. Altern Med Rev. 2000;5(1):4-27.

177. Kim DH, Bae EA, Jang IS, Han MJ. Anti-Helicobacter pylori activity of mushrooms. Arch Pharm Res. 1996;19(6):447-449.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

178. Kim SP, Kang MY, Kim JH, Nam SH, Friedman M. Composition and mechanism of antitumor effects of Hericium erinaceus mushroom extracts in tumor-bearing mice. J Agric Food Chem. 2011;59(18):9861–9869. DOI: 10.1021/jf201944n.

179. Kimura Y, Kido T, Takaku T, Sumiyoshi M, Baba K. Isolation of an anti-angiogenic substance from Agaricus blazei Murill: its antitumor and antimetastatic actions. Cancer Sci. 2004;95(9):758-764.

180. Knežević A, Stajić M, Sofrenić I, Stanojković T, Milovanović I, Tešević V, et al. Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected Trametes species from Serbia. PLoS One. 2018;13(8):e0203064. DOI: 10.1371/journal.pone.0203064.

181. Ko CH, Yue GG, Gao S, Luo KW, Siu WS, Shum WT, et al. Evaluation of the combined use of metronomic zoledronic acid and Coriolus versicolor in intratibial breast cancer mouse model. J Ethnopharmacol. 2017;204:77-85. DOI: 10.1016/j.jep.2017.04.007.

182. Ko HH, Hung CF, Wang JP, Lin CN. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from Ganoderma lucidum and G. tsugae. Phytochemistry. 2008;69(1):234-239. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.06.008.

183. Kobayashi H, Matsunaga K, Oguchi Y. Antimetastatic effects of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from basidiomycetes: an overview. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995;4(3):275-281.

184. Kodama N, Komuta K, Nanba H. Can maitake MD-fraction aid cancer patients? Altern Med Rev. 2002;7(3):236-239.

185. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Takahara A, et al. Augmentation of antitumor immunity by fusions of ethanol-treated tumor cells and dendritic cells stimulated via dual TLRs through TGF-β1 blockade and IL-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

12p70 production. PLoS One. 2013a;8(5):e63498. DOI: 10.1371/journal.pone.0063498.

186. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Takahara A, et al. Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes. PLoS One. 2013b;8(3):e59280. DOI: 10.1371/journal.pone.0059280.

187. Kolotushkina EV, Moldavan MG, Voronin KY, Skibo GG. The influence of Hericium erinaceus extract on myelination process in vitro. Fiziol Zh. 2003;49(1):38-45.

188. Kong C, Gao R, Yan X, Huang L, He J, Li H, et al. Alterations in intestinal microbiota of colorectal cancer patients receiving radical surgery combined with adjuvant CapeOx therapy. Sci China Life Sci. 2019;62(9):1178-1193. DOI: 10.1007/s11427-018-9456-x.

189. Konno S. Synergistic potentiation of D-fraction with vitamin C as possible alternative approach for cancer therapy. Int J Gen Med. 2009;2:91-108.

190. Kowalczewska M, Piotrowski J, Jędrzejewski T, Kozak W. Polysaccharide peptides from Coriolus versicolor exert differential immunomodulatory effects on blood lymphocytes and breast cancer cell line MCF-7 in vitro. Immunol Lett. 2016;174:37-44. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.04.010.

191. Kuo YC, Huang YL, Chen CC, Lin YS, Chuang KA, Tsai WJ. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by Agaricus blazei. J Lab Clin Med. 2002;140(3):176-187. DOI: https://doi.org/10.1067/mlc.2002.126717.

192. Kuznetsov OIu, Mil'kova EV, Sosnina AE, Sotnikova NIu. [Antimicrobial action of Lentinus edodes juice on human microflora] [Article in Russian]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2005;(1):80-82.

193. Lai CH, Teng JF, Hsu TH, Lin FY, Yang PW, Lo HC. 28-day oral safety evaluation of extracellular polysaccharopeptides

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

produced in submerged culture from the turkey tail medicinal mushroom Trametes versicolor (L.:Fr.) Pilát LH-1 in mice. Int J Med Mushrooms. 2011;13(3):227-236. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v13.i3.20.

194. Lai WF, Lin MC, Tang G. A phytochemical-based copolymer derived from Coriolus versicolor polysaccharopeptides for gene delivery. Molecules. 2018;23(9). pii: E2273. DOI: 10.3390/molecules23092273.

195. Lam KL, Cheung PCK. Non-digestible long chain beta-glucans as novel probiotics. Bioact Carbohydrates Diet Fibre. 2013;2(1):45-64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.09.001.

196. Lapthorne S, Bines JE, Fouhy F, Dellios NL, Wilson G, Thomas SL, et al. Changes in the colon microbiota and intestinal cytokine gene expression following minimal intestinal surgery. World J Gastroenterol. 2015;21(14):4150-4158. DOI: 10.3748/wjg.v21.i14.4150.

197. Lau CB, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, et al. Cytotoxic activities of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. Life Sci. 2004;75(7):797-808. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.04.001.

198. Lavi I, Friesem D, Geresh S, Hadar Y, Schwartz B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom Pleurotus ostreatus induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. Cancer Lett. 2006;244(1):61-70. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.12.007.

199. Lee DH, Seong S, Kim SS, Han JB. A case of stage IV non-small cell lung cancer treated with Korean Medicine Therapy alone. Case Rep Oncol. 2013;6(3):574-578. DOI: 10.1159/000356061.

200. Lee HH, Lee JS, Cho JY, Kim YE, Hong EK. Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of Lentinus

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

edodes. J Microbiol Biotechnol. 2009;19(6):566-572. DOI: 10.4014/jmb.0809.541.

201. Lee JS, Hong EK. Agaricus blazei Murill enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by NFκB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. Int J Oncol. 2011;38(2):401-408. DOI: 10.3892/ijo.2010.852.

202. Lee JS, Hong EK. Hericium erinaceus enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett. 2010;297(2):144–154. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.05.006.

203. Lee YC, Chiang TH, Chou CK, Tu YK, Liao WC, Wu MS, et al. Association between Helicobacter pylori eradication and gastric cancer incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology. 2016;150(5):1113-1124. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.01.028.

204. Li G, Yu K, Li F, Xu K, Li J, He S, et al. Anticancer potential of Hericium erinaceus extracts against human gastrointestinal cancers. J Ethnopharmacol. 2014;153(2):521-530. DOI: 10.1016/j.jep.2014.03.003.

205. Li IC, Lee LY, Tzeng TT, Chen WP, Chen YP, Shiao YJ, et al. Neurohealth Properties of Hericium erinaceus Mycelia Enriched with Erinacines. Behav Neurol. 2018;2018:5802634. DOI: 10.1155/2018/5802634.

206. Li J, Bao Y, Lam W, Li W, Lu F, Zhu X, et al. Immunoregulatory and anti-tumor effects of polysaccharopeptide and Astragalus polysaccharides on tumor-bearing mice. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008;30(4):771-782. DOI: 10.1080/08923970802279183.

207. Li R, Chen WC, Wang WP, Tian WY, Zhang XG. Extraction, characterization of Astragalus polysaccharides and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. Carbohydr Polym. 2009;78:738–742. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.06.005.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

208. Li S, Wang N, Hong M, Tan HY, Pan G, Feng Y. Hepatoprotective effects of a functional formula of three Chinese medicinal herbs: experimental evidence and network pharmacology-based identification of mechanism of action and potential bioactive components. Molecules. 2018;23(2). pii: E352. DOI: 10.3390/molecules23020352.

209. Li W, Liu M, Lai S, Xu C, Lu F, Xiao X, et al. Immunomodulatory effects of polysaccharopeptide (PSP) in human PBMC through regulation of TRAF6/TLR immunosignal-transduction pathways. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2010;32(4):576-584. DOI: 10.3109/08923971003586876.

210. Li X, Xu W, Chen J. Polysaccharide purified from *Polyporus umbellatus* (Per) Fr induces the activation and maturation of murine bone-derived dendritic cells via toll-like receptor 4. Cell Immunol. 2010;265(1):50-56. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.07.002.

211. Li X, Zhao X, Wang H, Han J, Liu L. A polysaccharide from the fruiting bodies of Agaricus blazei Murill induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Tumour Biol. 2014 Sep;35(9):8963-8968. DOI: 10.1007/s13277-014-2137-0.

212. Li XY. Immunomodulating components from chinese medicines. Pharm Biol. 2000;38(1):33-40. DOI: 10.1076/phbi.38.6.33.5961.

213. Li YQ, Wang SF. Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from Ganoderma lucidum. Biotechnol Lett. 2006;28(11):837-841. DOI: 10.1007/s10529-006-9007-9.

214. Liang C, Li H, Zhou H, Zhang S, Liu Z, Zhou Q, et al. Recombinant Lz-8 from Ganoderma lucidum induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagic cell death in SGC-7901 human gastric cancer cells. Oncol Rep. 2012;27(4):1079-1089. DOI: 10.3892/or.2011.1593.

215. Liang ZE, Yi YJ, Guo YT, Wang RC, Hu QL, Xiong XY. Inhibition of migration and induction of apoptosis in LoVo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

human colon cancer cells by polysaccharides from Ganoderma lucidum. Mol Med Rep. 2015 Nov;12(5):7629-736. DOI: 10.3892/mmr.2015.4345.

216. Lima CU, Cordova CO, Nóbrega Ode T, Funghetto SS, Karnikowski MG. Does the Agaricus blazei Murill mushroom have properties that affect the immune system? An integrative review. J Med Food. 2011;14(1-2):2-8. DOI: 10.1089/jmf.2010.0017.

217. Lin JG, Fan MJ, Tang NY, Yang JS, Hsia TC, Lin JJ, et al. An extract of Agaricus blazei Murill administered orally promotes immune responses in murine leukemia BALB/c mice in vivo. Integr Cancer Ther. 2012;11(1):29-36. DOI: 10.1177/1534735411400314.

218. Lin ZB, Zhang HN. Anti-tumor and immunoregulatory activities of Ganoderma lucidum and its possible mechanisms. Acta Pharmacol Sin. 2004;25(11):1387-1395.

219. Lindequist U, Niedermeyer TH, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms. Evid Based Complement Alternat Med. 2005;2(3):285-299. DOI: 10.1093/ecam/neh107.

220. Liu C, Dunkin D, Lai J, Song Y, Ceballos C, Benkov K, et al. Anti-inflammatory Effects of Ganoderma lucidum Triterpenoid in Human Crohn's Disease Associated with Downregulation of NF-κB. Signaling. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(8):1918-1925. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000439.

221. Liu J, Shiono J, Shimizu K, Kukita A, Kukita T, Kondo R. Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. 2009a;19(8):2154-2157. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.02.119.

222. Liu J, Tamura S, Kurashiki K, Shimizu K, Noda K, Konishi F, et al. Anti-androgen effects of extracts and compounds from Ganoderma lucidum. Chem Biodivers. 2009b;6(2):231-243. DOI: 10.1002/cbdv.200800019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

223. Liu YW, Gao JL, Guan J, Qian ZM, Feng K, Li SP. Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of Ganoderma on tumor cell lines. J Agric Food Chem. 2009;57(8):3087-3093. DOI: 10.1021/jf900011f.

224. Loman BR, Jordan KR, Haynes B, Bailey MT, Pyter LM. Chemotherapy-induced neuroinflammation is associated with disrupted colonic and bacterial homeostasis in female mice. Sci Rep. 2019;9(1):16490. DOI: 10.1038/s41598-019-52893-0.

225. López-López A, Martínez M, Valente T, Kawagishi H, Rodríguez MJ, Mahy N, et al. Hericium erinaceus extract is a neuroimmunemodulatory and neuroprotective treatment against NMDA-induced excitotoxic lesion. IX Simposi de Neurobiología Experimental. 22-23 October 2014. Barcelona. P-25.

226. Lu H, Yang Y, Gad E, Inatsuka C, Wenner CA, Disis ML, et al. TLR2 agonist PSK activates human NK cells and enhances the antitumor effect of HER2-targeted monoclonal antibody therapy. Clin Cancer Res. 2011;17(21):6742-6753. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1142.

227. Lu QY, Jin YS, Zhang Q, Zhang Z, Heber D, Go VL, et al. Ganoderma lucidum extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. Cancer Lett. 2004;216(1):9-20. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.06.022.

228. Lu ZW. [Psychoneuroimmunological effects of morphine and the immunoprotection of Ganoderma polysaccharides peptide in morphine-dependent mice. [Article in Chinese]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 1995;26(1):45-49.

229. Luk SU, Lee TK, Liu J, Lee DT, Chiu YT, Ma S, et al. Chemopreventive effect of PSP through targeting of prostate cancer stem cell-like population. PLoS One. 2011;6(5):e19804. DOI: 10.1371/journal.pone.0019804.

230. Luo KW, Yue GG, Ko CH, Lee JK, Gao S, Li LF, et al. In vivo and in vitro anti-tumor and anti-metastasis effects of Coriolus versicolor aqueous extract on mouse mammary 4T1 carcinoma.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Phytomedicine. 2014;21(8-9):1078-1087. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.04.020.

231. Ma G, Kimatu BM, Zhao L, Yang W, Pei F, Hu Q. In vivo fermentation of a Pleurotus eryngii polysaccharide and its effects on fecal microbiota composition and immune response. Food Funct. 2017;8(5):1810-1821. DOI: 10.1039/c7fo00341b.

232. Maehara Y, Inutsuka S, Takeuchi H, Baba H, Kusumoto H, Sugimachi K. Postoperative PSK and OK-432 immunochemotherapy for patients with gastric cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 1993;33(2):171-175. DOI: 10.1007/BF00685337.

233. Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. Microb Ecol Health Dis. 2015;26:27663. DOI: 10.3402/mehd.v26.27663.

234. Mao XW, Archambeau JO, Gridley DS. Immunotherapy with low-dose interleukin-2 and a polysaccharopeptide derived from Coriolus versicolor. Cancer Biother Radiopharm. 1996;11(6):393-403. DOI: 10.1089/cbr.1996.11.393.

235. Mariga AM, Yang WJ, Mugambi DK, Pei F, Zhao LY, Shao YN, et al. Antiproliferative and immunostimulatory activity of a protein from Pleurotus eryngii. J Sci Food Agric. 2014;94(15):3152-3162. DOI: 10.1002/jsfa.6665.

236. Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Lu CC, Chang CJ, Lin CS, et al. Immunomodulatory Properties of Plants and Mushrooms. Trends Pharmacol Sci. 2017;38(11):967-981. DOI: 10.1016/j.tips.2017.07.006.

237. Martínez O, Fernández de Ana Portela C, Rodríguez-Blanco A, González-Muñoz MJ, Castosa R, Díaz A, et al. Estudio de la citotoxicidad producida por el tratamiento con extractos de hongos comestibles en carcinoma de colon. Investigación Biomédica del Cáncer en Galicia, III Edición, 14 de junio de 2016, A Coruña. Disponible en: https://hifasdaterra.com/wp-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

content/uploads/2018/07/estudio-de-la-toxicidad-producida-por-los-extractos-de-hongos-en-carcinoma-de-colon.pdf.

238. Martínez Valero C. Psico-oncología e indefensión aprendida: un estudio clínico. Tesis Doctoral. Granada: Universidad de Granada; 2011.

239. Martins PR, Gameiro MC, Castoldi L, Romagnoli GG, Lopes FC, Pinto AV, et al. Polysaccharide-rich fraction of Agaricus brasiliensis enhances the candidacidal activity of murine macrophages. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(3):244-250.

240. Maruyama S, Akasaka T, Yamada K, Tachibana H. Protein-bound polysaccharide-K (PSK) directly enhanced IgM production in the human B cell line BALL-1. Biomed Pharmacother. 2009;63(6):409-412. DOI: 10.1016/j.biopha.2008.08.006.

241. Masuda Y, Inoue H, Ohta H, Miyake A, Konishi M, Nanba H. Oral administration of soluble-glucans extracted from Grifola frondosa induces systemic antitumor immune response and decreases immunosuppression in tumor-bearing mice. Int J Cancer. 2013;133(1):108-119. DOI: 10.1002/ijc.27999.

242. Masuda Y, Inoue M, Miyata A, Mizuno S, Nanba H. Maitake β-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. Int Immunopharmacol. 2009;9(5):620-626. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.02.005.

243. Masuda Y, Murata Y, Hayashi M, Nanba H. Inhibitory effect of MD-Fraction on tumor metastasis: involvement of NK cell activation and suppression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in lung vascular endothelial cells. Biol Pharm Bull. 2008;31(6):1104-1108. DOI: https://doi.org/10.1248/bpb.31.1104.

244. Masuda Y, Nakayama Y, Tanaka A, Naito K, Konishi M. Antitumor activity of orally administered maitake α-glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor. PLoS One. 2017;12(3):e0173621. DOI: 10.1371/journal.pone.0173621

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

245. Matuszewska A, Karp M, Jaszek M, Janusz G, Osińska-Jaroszuk M, Sulej J, et al. Laccase purified from Cerrena unicolor exerts antitumor activity against leukemic cells. Oncol Lett. 2016;11(3):2009-2018. DOI: 10.3892/ol.2016.4220.

246. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. J Clin Invest. 2015;125(3):926-938. DOI: 10.1172/JCI76304.

247. Mazur M, Gładkowski W, Pawlak A, Obmińska-Mrukowicz B, Maciejewska G, Wawrzeńczyk C. Microbial asymmetric functionalization of β-cyclocitral-derived tetramethyl-substituted γ-lactone. Molecules. 2019;24(4). pii: E666. DOI: 10.3390/molecules24040666.

248. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME J. 2012;6(3):610-618. DOI: 10.1038/ismej.2011.139.

249. Mirre Gavalda JC, Fernández de Ana Portela C. 12 setas medicinales. 2ª ed. Pontevedra: Autoedición; 2014.

250. Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. Polysaccharides from Agaricus blazei stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. Biosci Biotechnol Biochem. 1998;62(3):434-437. DOI: 10.1271/bbb.62.434.

251. Mizuno T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. Food Rev Int. 1995;11(1):5-21. DOI: https://doi.org/10.1080/87559129509541017.

252. Monro JA. Treatment of cancer with mushroom products. Arch Environ Health. 2003;58(8):533-537. DOI: 10.3200/AEOH.58.8.533-537.

253. Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

macromycetes fungi (macrofungi). Int Immunopharmacol. 2007;7(6):701-724. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.01.008.

254. Mori K, Inatomi S, Ouchi K, Azumi Y, Tuchida T. Improving effects of the mushroom Yamabushitake (Hericium erinaceus) on mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled clinical trial. Phytother Res. 2009;23(3):367-372. DOI: 10.1002/ptr.2634.

255. Mori K, Obara Y, Hirota M, Azumi Y, Kinugasa S, Inatomi S, et a. Nerve growth factor-inducing activity of Hericium erinaceus in 1321N1 human astrocytoma cells. Biol Pharm Bull. 2008;31(9):1727-1732. DOI: https://doi.org/10.1248/bpb.31.1727.

256. Mori K, Obara Y, Moriya T, Inatomi S, Nakahata N. Effects of Hericium erinaceus on amyloid β(25-35) peptide-induced learning and memory deficits in mice. Biomed Res. 2011;32(1):67-72. DOI: https://doi.org/10.2220/biomedres.32.67.

257. Morikane K, Honda H, Yamagishi T, Suzuki S, Aminaka M. Factors associated with surgical site infection in colorectal surgery: the Japan nosocomial infections surveillance. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014;35(6):660-666. DOI: 10.1086/676438.

258. Morowitz MJ, Babrowski T, Carlisle EM, Olivas A, Romanowski KS, Seal JB, et al. The human microbiome and surgical disease. Ann Surg. 2011;253(6):1094-1101. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31821175d7.

259. Mueller A, Raptis J, Rice PJ, Kalbfleisch JH, Stout RD, Ensley HE, et al. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-3)-β-D-glucan receptors in human monocyte-like cell line. Glycobiology. 2000;10(4):339-346.

260. Müller CI, Kumagai T, O'Kelly J, Seeram NP, Heber D, Koeffler HP. Ganoderma lucidum causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. Leuk Res. 2006;30(7):841-848. DOI: 10.1016/j.leukres.2005.12.004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

261. Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi T, Mazda O, Takeuchi M. Effect of hot water extract from Agaricus blazei Murill on antibody-producing cells in mice. Int Immunopharmacol. 2002;2(8):1205-1211. DOI: https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00056-5.

262. Nakazato H, Koike A, Saji S, Ogawa N, Sakamoto J. Efficacy of immunochemotherapy as adjuvant treatment after curative resection of gastric cancer. Study Group of Immunochemotherapy with PSK for Gastric Cancer. Lancet. 1994;343(8906):1122-1126. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90233-X.

263. National Institutes of Health. National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH). Complementary, alternative, or integrative health what´s in a name? [Internet]. NIH, USA, 2015. Disponible en: https://nccih.nih.gov/health/integrative-health.

264. National Institutes of Health. National Center for Complementary and Integrative Health. CAM use by race and ethnicity among adults-2007 [Internet]. NIH, USA, 2008. Disponible en: : https://nccih.nih.gov/research/statistics/2007/camsurvey_fs1.htm.

265. National-Cancer-Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 5th Edition. (2020). Available at: https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_50. (Accessed: 17th November 2020)

266. Navegantes KC, de Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. J Transl Med. 2017;15(1):36-57. DOI: 10.1186/s12967-017-1141-8.

267. Newport DJ, Nemeroff CB. Assessment and treatment of depression in the cancer patient. J Psychosom Res. 1998;45(3):215-237.

268. Ng ML, Yap AT. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (Lentinus

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

edodes). J Altern Complement Med. 2002;8(5):581-589. DOI: 10.1089/107555302320825093.

269. Ng TB, Wong JH. Fungal proteins with antiproliferative and anticancer activities. Protein Pept Lett. 2013;20(4):433-438. DOI: 10.2174/0929866511320040007.

270. Ng TB. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom Coriolus versicolor (Basidiomycetes: Polyporaceae). Gen Pharmacol. 1998;30(1):1-4. DOI: https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00076-1.

271. Nguyen AH, Gonzaga MI, Lim VM, Adler MJ, Mitkov MV, Cappel MA. Clinical features of shiitake dermatitis: a systematic review. Int J Dermatol. 2017;56(6):610-616. DOI: 10.1111/ijd.13433.

272. Nie Y, Lin Q, Luo F. Effects of Non-Starch Polysaccharides on Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci. 2017;18(7):1372. DOI: 10.3390/ijms18071372.

273. Niu Y, Chang TM, Yeh S, Ma WL, Wang YZ, Chang C. Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. Oncogene. 2010;29(25):3593-3604. DOI: 10.1038/onc.2010.121.

274. Niu YC, Liu JC, Zhao XM, Cao J. A low molecular weight polysaccharide isolated from Agaricus blazei Murill (LMPAB) exhibits its anti-metastatic effect by down-regulating metalloproteinase-9 and up-regulating Nm23-H1. Am J Chin Med. 2009a;37(5):909-921. DOI: 10.1142/S0192415X09007351.

275. Niu YC, Liu JC, Zhao XM, Wu XX. A low molecular weight polysaccharide isolated from Agaricus blazei suppresses tumor growth and angiogenesis in vivo. Oncol Rep. 2009b;21(1):145-152.

276. Niwa Y, Matsuura H, Murakami M, Sato J, Hirai K, Sumi H. Evidence that naturopathic therapy including Ophiocordyceps sinensis prolongs survival of patients with hepatocellular

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

carcinoma. Integr Cancer Ther. 2013;12(1):50-68. DOI: 10.1177/1534735412441704.

277. Novaes MRCG, Novaes LCG, Taveira VC. Natural products from Agaricales medicinal mushrooms: biology, nutritional properties, and pharmacological effects on cancer. Revista Brasileira de Cancerologia. 2007;53(4):411-420.

278. Novak M, Vetvicka V. Glucans as biological response modifiers. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2009;9(1):67-75. DOI: 10.2174/187153009787582423.

279. Nowak R, Nowacka-Jechalke N, Juda M, Malm A. The preliminary study of prebiotic potential of Polish wild mushroom polysaccharides: the stimulation effect on Lactobacillus strains growth. Eur J Nutr. 2018;57(4):1511-1521. DOI: 10.1007/s00394-017-1436-9.

280. Oba K, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamoto J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. Anticancer Res. 2009;29(7):2739-2745.

281. Oba K, Teramukai S, Kobayashi M, Matsui T, Kodera Y, Sakamato J. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curative resections of gastric cancer. Cancer Immunol Immunother. 2007;56(6):905-911. DOI: 10.1007/s00262-006-0248-1.

282. Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. J Pharmacol Exp Ther. 2006;316(1):336-348. DOI: 10.1124/jpet.105.093229.

283. Ohigashi S, Sudo K, Kobayashi D, Takahashi T, Nomoto K, Onodera H. Significant changes in the intestinal environment after surgery in patients with colorectal cancer. J Gastrointest Surg. 2013;17(9):1657-1664. DOI: 10.1007/s11605-013-2270-x.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

284. Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of Agaricus blazei. Biol Pharm Bull. 2001;24(7):820–828. DOI: https://doi.org/10.1248/bpb.24.820.

285. Ohno S, Sumiyoshi Y, Hashine K, Shirato A, Kyo S, Inoue M. Phase I clinical study of the dietary supplement, Agaricus blazei Murill, in cancer patients in remission. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:192381. DOI: 10.1155/2011/192381.

286. Ohwada S, Ogawa T, Makita F, Tanahashi Y, Ohya T, Tomizawa N, et al. Beneficial effects of protein-bound polysaccharide K plus tegafur/uracil in patients with stage II or III colorectal cancer: analysis of immunological parameters. Oncol Rep. 2006;15(4):861-868. DOI: 10.3892/or.15.4.861.

287. Okayasu I, Ohkusa T, Kajiura K, Kanno J, Sakamoto S. Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. Gut. 1996;39(1):87-92. DOI: 10.1136/gut.39.1.87.

288. Okuno K, Uno K. Efficacy of orally administered Lentinula edodes mycelia extract for advanced gastrointestinal cancer patients undergoing cancer chemotherapy: a pilot study. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(7):1671-1674.

289. Oliveira M, Reis FS, Sousa D, Tavares C, Lima RT, Ferreira IC, et al. A methanolic extract of Ganoderma lucidum fruiting body inhibits the growth of a gastric cancer cell line and affects cellular autophagy and cell cycle. Food Funct. 2014:5(7):1389-1394. DOI: 10.1039/c4fo00258j.

290. Ong BY, Aziz Z. Efficacy of Ophiocordyceps sinensis as an adjunctive treatment in kidney transplant patients: A systematic-review and meta-analysis. Complement Ther Med. 2017;30:84-92. DOI: 10.1016/j.ctim.2016.12.007.

291. Ooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. Curr Med Chem. 2000a;7(7):715-729. DOI: 10.2174/0929867003374705.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

292. Ooi VEC. Medicinally important fungi. In: Science and cultivation of edible fungi. Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Maastricht, Netherlands; 2000b. pp.41-51.

293. Oshiman K, Fujimiya Y, Ebina T, Suzuki I, Noji M. Orally administered beta-1,6-D-polyglucose extracted from Agaricus blazei results in tumor regression in tumor-bearing mice. Planta Med. 2002;68(7):610-614. DOI: 10.1055/s-2002-32904.

294. Paccola E, Maki CS, Nobrega GMA, Paccola-Meirelles LD. Antagonistic effect of edible mushroom extract on Candida albicans growth. Braz J Microbiol. 2001;32:3. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000300003.

295. Palmisano S, Campisciano G, Iacuzzo C, Bonadio L, Zucca A, Cosola D, et al. Role of preoperative gut microbiota on colorectal anastomotic leakage: preliminary results. Updates Surg. 2020;72(4):1013-1022. DOI: 10.1007/s13304-020-00720-x.

296. Pang ZJ, Chen Y, Zhou M. Polysaccharide Krestin enhances manganese superoxide dismutase activity and mRNA expression in mouse peritoneal macrophages. Am J Chin Med. 2000;28(3-4):331-341. DOI: 10.1142/S0192415X00000398.

297. Parada M, Rodríguez-Blanco A, Fernández de Ana Magán F, Domínguez H. Sequential extraction of Hericium erinaceus using green solvents. LWT-Food Science and Technology. 2015;64(1):397-404. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.008.

298. Patchen ML, Lotzová E. Modulation of murine hemopoiesis by glucans. Exp Hematol. 1980;8(4):409-422.

299. Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. 3 Biotech. 2012; 2(1):1-15. DOI: 10.1007/s13205-011-0036-2.

300. Pawlikowska M, Jędrzejewski T, Piotrowski J, Kozak W. Fever-range hyperthermia inhibits cells immune response to protein-bound polysaccharides derived from Coriolus versicolor extract.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mol Immunol. 2016;80:50-57. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.10.013.

301. Pérez J, Díaz C, Salado IG, Pérez D I, Peláez F, Genilloud O, et al. Evaluation of the effect of compound aqueous solubility in cytochrome P450 inhibition assays. Advances Biosci Biotech. 2013;4(5):628-639. DOI: http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.45083.

302. Pessôa MG, Paulino BN, Mano MCR, Neri-Numa IA, Molina G, Pastore GM. Fusarium species-a promising tool box for industrial biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol. 2017;101(9):3493-3511. DOI: 10.1007/s00253-017-8255-z.

303. Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Cell Host Microbe. 2008;3(6):417-427. DOI: 10.1016/j.chom.2008.05.001.

304. Phan CW, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V. Therapeutic potential of culinary-medicinal mushrooms for the management of neurodegenerative diseases: diversity, metabolite, and mechanism. Crit Rev Biotechnol. 2015;35(3):355-368. DOI: 10.3109/07388551.2014.887649.

305. Pillai TG, Uma Devi P. Mushroom beta glucan: potential candidate for post irradiation protection. Mutat Res. 2013;751(2):109-115. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.12.005.

306. Pinto AV, Martins PR, Romagnoli GG, et al. Polysaccharide fraction of Agaricus brasiliensis avoids tumor-induced IL-10 production and changes the microenvironment of subcutaneous Ehrlich adenocarcinoma. Cell Immunol. 2009;256(1-2):27–38. DOI: 10.1016/j.cellimm.2009.01.002.

307. Piotrowski J, Jędrzejewski T, Kozak W. [Immunomodulatory and antitumor properties of polysaccharide peptide (PSP)] [Article in Polish]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2015;69:91-77.

308. Planellas P, Farrés R, Cornejo L, Rodríguez-Hermosa JI, Pigem A, Timoteo A, et al. Randomized clinical trial comparing side to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

end vs end to end techniques for colorectal anastomosis. Int J Surg. 2020;83:220-229. DOI: 10.1016/j.ijsu.2020.09.039.

309. Pop RM, Puia IC, Puia A, Chedea VS, Leopold N, Bocsan I, et al. Characterization of Trametes versicolor: Medicinal mushroom with important health benefits. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2018;46(2):343-349. DOI: https://doi.org/10.15835/nbha46211132 .

310. Pouchieu C, Fassier P, Druesne-Pecollo N, Zelek L, Bachmann P, Touillaud M, et al. Dietary supplement use among cancer survivors of the NutriNet-Santé cohort study. Br J Nutr. 2015;113(8):1319-1329. DOI: 10.1017/S0007114515000239.

311. Powell M. Medicinal mushrooms: a clinical guide. Second Edition. UK: Mycology Press; 2014.

312. Price LA, Wenner CA, Sloper DT, Slaton JW, Novack JP. Role for toll-like receptor 4 in TNF-alpha secretion by murine macrophages in response to polysaccharide Krestin, a Trametes versicolor mushroom extract. Fitoterapia. 2010;81(7):914-919. DOI: 10.1016/j.fitote.2010.06.002.

313. Pyo P, Louie B, Rajamahanty S, Choudhury M, Konno S. Possible immunotherapeutic potentiation with D-fraction in prostate cancer cells. J Hematol Oncol. 2008;1:25. DOI: 10.1186/1756-8722-1-25.

314. Qian ZM, Xu MF, Tang PL. Polysaccharide peptide (PSP) restores immunosuppression induced by cyclophosphamide in rats. Am J Chin Med. 1997;25(1):27-35. DOI: 10.1142/S0192415X97000068.

315. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;464(7285):59-66. DOI: 10.1038/nature08821.

316. Quayle K, Coy C, Standish L, Lu H. The TLR2 agonist in polysaccharide-K is a structurally distinct lipid which acts

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

synergistically with the protein-bound β-glucan. J Nat Med. 2015;69(2):198-208. DOI: 10.1007/s11418-014-0879-z.

317. Quintana JM, Antón-Ladisla A, González N, Lázaro S, Baré M, Fernández de Larrea N, et al. Outcomes of open versus laparoscopic surgery in patients with colon cancer. Eur J Surg Oncol. 2018;44(9):1344-1353. DOI: 10.1016/j.ejso.2018.05.030.

318. Ræder H, Henriksen C, Bøhn SK, O de Fey Vilbo AR, Henriksen HB, Kværner AS, et al. Agreement between PG-SGA category and fat-free mass in colorectal cancer patients. Clin Nutr ESPEN. 2018t;27:24-31. DOI: 10.1016/j.clnesp.2018.07.005.

319. Ralls MW, Miyasaka E, Teitelbaum DH. Intestinal microbial diversity and perioperative complications. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2014;38(3):392-399. DOI: 10.1177/0148607113486482.

320. Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. Nutr J. 2010;9:54. DOI: 10.1186/1475-2891-9-54.

321. Rashid S, Unyayar A, Mazmanci M A, McKeown S R, Worthington J, Banat I M. Potential of a Funalia trogii laccase enzyme as an anticancer agent. Annals of microbiology. 2015;65(1):175-183. DOI: 10.1007/s13213-014-0848-5.

322. Regalado NG, Martin G, Antony SJ. Acinetobacter lwoffii: bacteremia associated with acute gastroenteritis. Travel Med Infect Dis. 2009;7(5):316-317. DOI: 10.1016/j.tmaid.2009.06.001.

323. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lundén G, Petersen LC, et al. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. Nature. 2012;483(7391):627-631. DOI: 10.1038/nature10893.

324. Ren L, Perera C, Hemar Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. Food Funct. 2012;3(11):1118-1130. DOI: 10.1039/c2fo10279j.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

325. Rezvani V, Pourianfar HR, Mohammadnejad S, Madjid Ansari A, Farahmand L. Anticancer potentiality and mode of action of low-carbohydrate proteins and peptides from mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(16):6855-6871. DOI: 10.1007/s00253-020-10707-8

326. Rhouma GB, Chebil L, Mustapha N, Krifa M, Ghedira K, Ghoul M, Chékir-Ghédira L. Cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potencies of oligorutins. Hum Exp Toxicol. 2013;32(8):881-889. DOI: 10.1177/0960327113476910.

327. Ricciardi MR, Licchetta R, Mirabilii S, Scarpari M, Parroni A, Fabbri AA, et al. Preclinical antileukemia activity of Tramesan: a newly identified bioactive fungal metabolite. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:5061639. DOI: 10.1155/2017/5061639.

328. Ríos-Cañavete JL. Ganoderma lucidum, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. Revista de Fitoterapia. 2008;8(2):135-146.

329. Ritterband LM, Spielberger CD. Depression in a cancer population. J Clin Psychol Med Settings. 2001;8:85-93.

330. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. Br J Nutr. 2010;104 Suppl 2:S1-63. DOI: 10.1017/S0007114510003363.

331. Roca-Lema D, Martinez-Iglesias O, Fernández de Ana Portela C, Rodríguez-Blanco A, Valladares-Ayerbes M, Díaz-Díaz A, et al. In vitro anti-proliferative and anti-invasive effect of polysaccharide-rich extracts from Trametes versicolor and Grifola frondosa in colon cancer cells. Int J Med Sci. 2016;16(2):231-240. DOI: 10.7150/ijms.28811.

332. Roda E, De Luca F, Di Iorio C, Ratto D, Siciliani S, Ferrari B, et al. Novel Medicinal Mushroom Blend as a Promising Supplement in Integrative Oncology: A Multi-Tiered Study using 4T1 Triple-Negative Mouse Breast Cancer Model. Int J Mol Sci. 2020;21(10):3479. DOI. 10.3390/ijms21103479

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

333. Rodicio MdelR, Mendoza MdelC. Indentificación bacteriana mediante sequenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22(4):238-235.

334. Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv. 2006;24(5):500-513. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.

335. Rodríguez-Seoane P, Díaz-Reinoso B, González-Muñoz MJ, Fernández de Ana Portela C, Domínguez H. Innovative technologies for the extraction of saccharidic and phenolic fractions from Pleurotus eryngii. Food Science and Technology. 2019;101:774-782. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.062.

336. Rossi P, Buonocore D, Altobelli E, Brandalise F, Cesarovi V, Iozzi D, et al. Improving training condition assessment in endurance cyclists: effects of Ganoderma lucidum and OphioOphiocordyceps sinensis dietary supplementation. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014:979613. DOI: 10.1155/2014/979613.

337. Rossi P, Difrancia R, Quagliariello V, Savino E, Tralongo P, Randazzo CL, et al. B-glucans from Grifola frondosa and Ganoderma lucidum in breast cancer: an example of complementary and integrative medicine. Oncotarget. 2018;9(37):24837-24856. DOI: 10.18632/oncotarget.24984.

338. Royse DJ, Baars J, Tan Q. Current overview of mushroom production in the world. In: Zied DC, Pardo-Giménez A, editors. Edible and medicinal mushrooms: technology and applications. John Wiley & Sons; 2017. p. 5-13. DOI: 10.1002/9781119149446.ch2.

339. Ruiz-Cabello J, Berghmans K, Kaplan O, Lippman ME, Clarke R, Cohen JS. Hormone dependence of breast cancer cells and the effects of tamoxifen and estrogen: 31P NMR studies. Breast Cancer Res Treat. 1995;33(3):209-217.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

340. Sakamoto J, Morita S, Oba K, Matsui T, Kobayashi M, Nakazato H, et al. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(4):404-411. DOI: 10.1007/s00262-005-0054-1.

341. Saleh MH, Rashedi I, Keating A. Immunomodulatory properties of Coriolus versicolor: the role of polysaccharopeptide. Front Immunol. 2017;8:1087. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01087.

342. Sawai M, Adachi Y, Kanai M, Matsui S, Yadomae T. Extraction of conformationally stable (1-6)-branched (1-3)-β-D-glucans from premixed edible mushroom powders by cold alkaline solution. Int J Med Mushr. 2002;4(3):197-205. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v4.i3.20.

343. Schagen SB, Das E, Vermeulen I. Information about chemotherapy-associated cognitive problems contributes to cognitive problems in cancer patients. Psychooncology. 2012;21(10):1132-1135. DOI: 10.1002/pon.2011.

344. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. J Pharmacol Pharmacother. 2010;1(2):100-107. DOI: 10.4103/0976-500X.72352.

345. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. Nat Rev Cancer. 2013;13(11):800-812. DOI: 10.1038/nrc3610.

346. Schwartz B, Hadar Y. Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer. Ann Transl Med. 2014;2(2):19. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.01.03.

347. Sekhon BK, Roubin RH, Li Y, Devi PB, Nammi S, Fan K, et al. Evaluation of selected immunomodulatory glycoproteins as an adjunct to cancer immunotherapy. PLoS One. 2016;11(1):e0146881. DOI: 10.1371/journal.pone.0146881.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

348. Selijelid R, Bøgwald J, Rasmussen LT, Larm O, Hoffman J, Berge A, et al In vivo activation of mouse macrophages with beta-1,3-D-glucan-derivatized plastic beads. Scand J Immunol. 1985;21(6):601-605. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1985.tb01850.x.

349. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020 [Internet]. Madrid: SEOM; 2020 [última consulta en septiembre de 2020]. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf

350. Serban DE. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. Cancer Lett. 2014;345(2):258-270. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.013.

351. Shamsaei S, Getso M, Ahmadikia K, Yarahmadi M, Farahani HE, Aslani R, et al. Recent findings on the role of fungal products in the treatment of cancer [published online ahead of print, 2020 Jun 18]. Clin Transl Oncol. 2020;10.1007/s12094-020-02428-1. DOI: 10.1007/s12094-020-02428-1

352. Shang X, Tan Q, Liu R, Yu K, Li P, Zhao GP. In vitro anti-Helicobacter pylori effects of medicinal mushroom extracts, with special emphasis on the Lion's Mane mushroom, Hericium erinaceus (higher Basidiomycetes). Int J Med Mushrooms. 2013;15(2):165-174. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i2.50.

353. Sharma D, Singh VP, Singh NK. A Review on phytochemistry and pharmacology of medicinal as well as poisonous mushrooms. Mini Rev Med Chem. 2018;18(13):1095-1109. DOI: 10.2174/1389557517666170927144119.

354. Shen S, Lim G, You Z, Ding W, Huang P, Ran C, et al. Gut microbiota is critical for the induction of chemotherapy-induced pain. Nat Neurosci. 2017;20(9):1213-1216. DOI: 10.1038/nn.4606.

355. Shi L, Lin Q, Yang T, Nie Y, Li X, Liu B, et al. Oral administration of Lentinus edodes β-glucans ameliorates DSS-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

induced ulcerative colitis in mice via MAPK-Elk-1 and MAPK-PPARγ pathways. Food Funct. 2016;7(11):4614-4627. DOI: 10.1039/c6fo01043a.

356. Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, et al. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS. J Trauma. 2006;60(1):126-133. DOI: 10.1097/01.ta.0000197374.99755.fe.

357. Shing MK, Leung TF, Chu YL, Li CY, Chik KW, Leung PC, et al. Randomized, double-blind and placebo- controlled study of the immunomodulatory effects of Lingzhi in children with cancers. J Clin Oncol. 2008;26(15S):1402. DOI: 10.1200/jco.2008.26.15_suppl.14021.

358. Shiotani A, Cen P, Graham DY. Eradication of gastric cancer is now both possible and practical. Semin Cancer Biol. 2013;23(6):492-501. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.07.004.

359. Shnyreva AV, Shnyreva AA, Espinoza C, Padrón JM, Trigos Á. Antiproliferative activity and cytotoxicity of some medicinal wood-destroying mushrooms from Russia. Int J Med Mushrooms. 2018;20(1):1-11. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025250.

360. Shomori K, Yamamoto M, Arifuku I, Teramachi K, Ito H. Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (Grifola frondosa) on human gastric cancer cell lines. Oncol Resp. 2009;22(3):612-620. DOI: https://doi.org/10.3892/or_00000480.

361. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69(1):7-34. DOI: 10.3322/caac.21551.

362. Smith T, Gillespie M, Eckl V, Knepper J, Reynolds CM. Herbal supplements sales in US increase by 9.4% in 2018. HerbalGram. 2019;123:62-73. Disponible en: http://cms.herbalgram.org/herbalgram/issue123/files/HG123-HMR.pdf.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

363. Soares R, Meireles M, Rocha A, Pirraco A, Obiol D, Alonso E, et al. Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation. J Med Food. 2011;14(6):563-572. DOI: 10.1089/jmf.2010.0095.

364. Song W, Van Griensven LJLD. Pro- and Antioxidative Properties of Medicinal Mushroom Extracts. Int J Med Mushrooms. 2008;10(4):315-324. DOI: https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i4.30.

365. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom Ganoderma lucidum. J Ethnopharmacol. 2004;90(1):17-20.

366. Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with Agaricus blazei Murill fractions in vitro. Cell Struct Funct. 2001;26(2):103-108. DOI: https://doi.org/10.1247/csf.26.103.

367. Standish LJ, Alschuler LN, Weaver M, Nezami M. Botanical and mycological medicine in integrative oncology. In: Abrams, DI and Weil AT, editors. Integrative Oncology. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2014. p. 160-245. DOI: 10.1093/med/9780199329724.003.0007.

368. Standish LJ, Dowd F, Sweet E, Dale L, Weaver M, Osborne B, et al. Breast Cancer Integrative Oncology Care and Its Costs. Integr Cancer Ther. 2017;16(1):85-95. DOI: 10.1177/1534735416649034.

369. Stavrou G, Kotzampassi K. Gut microbiome, surgical complications and probiotics. Ann Gastroenterol. 2017;30(1):45-53. DOI: 10.20524/aog.2016.0086.

370. Sun J, Wang H, Nq TB. Isolation of a laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from fresh fruiting bodies of the Lentinus edodes (Shiitake mushroom). Indian J Biochem Biophys. 2011;48(2):88-94.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

371. Sun LX, Li WD, Lin ZB, Duan XS, Li XF, Yang N, et al. Protection against lung cancer patient plasma-induced lymphocyte suppression by Ganoderma lucidum polysaccharides. Cell Physiol Biochem. 2014;33(2):289-299. DOI: 10.1159/000356669.

372. Sun LX, Lin ZB, Duan XS, Lu J, Ge ZH, Li XJ, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides antagonize the suppression on lymphocytes induced by culture supernatants of B16F10 melanoma cells. J Pharm Pharmacol. 2011;63(5):725-735. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2011.01266.x.

373. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with azoxymethane and dextran sodium sulfate. Cancer Sci. 2004;95(9):721-727. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03252.x.

374. Synytsya A, Mickova K, Synytsya A, Jablonsky I, Spevacek J, Erban V, et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers. 2009;76:548-556. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.11.021.

375. Sze DM, Chan GC. Supplements for immune enhancement in hematologic malignancies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;1:313-319. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.313.

376. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action. J Nutr. 2001;131(5):1409-1413. DOI: 10.1093/jn/131.5.1409.

377. Tamura R, Tanebe K, Kawanishi C, Torii K, Ono T. Effects of lentinan on abnormal ingestive behaviors induced by tumor necrosis factor. Physiol Behav. 1997;61(3):399-410. DOI: https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00451-9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

378. Tan Y, Meng Y, Wang Z, Shan F, Wang Q, Zhang N. Maturation of morphology, phenotype and functions of murine bone marrow-derived dendritic cells (DCs) induced by polysaccharide Kureha (PSK). Hum Vaccin Immunother. 2012;8(12):1808-1816. DOI: 10.4161/hv.21993.

379. Tang W. Recent advances in antineoplastic principles of Traditional Chinese Medicine. Pharmazie. 2002;57(4):223-232.

380. Therkelsen SP, Hetland G, Lyberg T, Lygren I, Johnson E. Cytokine levels after consumption of a medicinal Agaricus blazei Murill-based mushroom extract, AndoSan™, in patients with Crohn´s disease and ulcerative colitis in a randomized single-blinded placebo-controlled study. Scand J Immunol. 2016c;84(6):323-331. DOI: 10.1111/sji.12476.

381. Therkelsen SP, Hetland G, Lyberg T, Lygren I, Johnson E. Effects of the medicinal Agaricus blazei Murill-based mushroom extract, AndoSan™, on symptoms, fatigue and quality of life in patients with Crohn´s disease in a randomized single-blinded placebo-controlled study. PLoS One. 2016a;11(7):e0159288. DOI: 10.1371/journal.pone.0159288.

382. Therkelsen SP, Hetland G, Lyberg T, Lygren I, Johnson E. Effects of the medicinal Agaricus blazei Murill-based mushroom extract, AndoSan™, on symptoms, fatigue and quality of life in patients with ulcerative colitis in a randomized single-blinded placebo-controlled study. PLoS One. 2016b;11(3):e0150191. DOI: 10.1371/journal.pone.0150191.

383. Tomassini JE, Davies ME, Hastings JC, Lingham R, Mojena M, Raghoobar SL, et al. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40(5):1189-1193.

384. Tong H, Xia F, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of Pleurotus ostreatus. Bioresour Technol. 2009;100(4):1682-1686. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.09.004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

385. Torkelson CJ, Sweet E, Martzen MR, Sasagawa M, Wenner CA, Gay J, et al. Phase 1 Clinical Trial of Trametes versicolor in Women with Breast Cancer. ISRN Oncol. 2012;2012:251632. DOI: 10.5402/2012/251632.

386. Toth B, Coles M, Lynch J. Effects of VPS extract of Coriolus versicolor on cancer of the large intestine using a serial sacrifice technique. In Vivo. 2006;20(3):341-346.

387. Toth B, Coles M, Talmadge J. Inhibition of intestinal cancer by VPS extract of the Coriolus versicolor mushroom in C57BL/6J-Apc (Min) mice. FASEB J. 2007;21(6):A756.

388. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. Nature. 2012;489(7415):242-249. DOI: 10.1038/nature11552.

389. Tsang KW, Lam CL, Yan C, Mak JC, Ooi GC, Ho JC, et al. Coriolus versicolor polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. Respir Med. 2003;97(6):618-624. DOI: 10.1053/rmed.2003.149.

390. Tsao YW, Kuan YC, Wang JL, Sheu F. Characterization of a novel maitake (Grifola frondosa) protein that activates natural killer and dendritic cells and enhances antitumor immunity in mice. J Agric Food Chem. 2013;61(4):9828-9838. DOI: 10.1021/jf4031184.

391. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov Today. 2003;8(15):692-700. DOI: 10.1016/s1359-6446(03)02746-6.

392. Unver N, McAllister F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. Cytokine Growth Factor Rev. 2018;41:10-17. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.04.004.

393. Unyayar A, Demirbilek M, Turkoglu M, Celik A, Mazmanci MA, Erkurt EA, et al. Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of Coriolus versicolor and Funalia trogii extracts on

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mammalian cells. Drug Chem Toxicol. 2006;29(1):69-83. DOI: 10.1080/01480540500408655 .

394. Uribe-Echeverry PT, Lopez-Gartner GA. Fungal immunomodulatory proteins in the context of biomedicine. Front Biosci (Elite Ed). 2017;9:286-306. DOI: http://dx.doi.org/10.2741/803.

395. Uwafuji S, Goi T, Naruse T, Kurebayashi H, Nakazawa T, Hirono Y, et al. Protein-bound polysaccharide K reduced the invasive ability of colon cancer cell lines. Anticancer Res. 2013;33(11):4841-4845.

396. Van Griensven LJLD. Culinary-Medicinal Mushrooms: Must Action Be Taken? Int J Med Mushrooms. 2009;11(3):281-286. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v11.i3.70.

397. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. Nat Rev Cancer. 2012;12(4):237-251. DOI: 10.1038/nrc3237.

398. Vannucci L, Krizan J, Sima P, Stakheev D, Caja F, Rajsiglova L, et al. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). Int J Oncol. 2013;43(2):357-364. DOI: 10.3892/ijo.2013.1974.

399. Vattem DA, Lin YT, Shetty K. Enrichment of phenolic antioxidants and anti-Helicobacter pylori properties of Cranberry Pomace by solid-state bioprocessing. Food Biotechnol. 2005;19:51-68. DOI: https://doi.org/10.1081/FBT-200049065.

400. Vickers A. Recent advances: complementary medicine. BMJ. 2000;321(7262):683-686. DOI: https://doi.org/10.1136/bmj.321.7262.683.

401. Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. Physiol Behav. 2008;94(2):276-284. DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.11.045.

402. Wan JM, Sit WH, Louie JC. Polysaccharopeptide enhances the anticancer activity of doxorubicin and etoposide on human breast

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cancer cells ZR-75-30. Int J Oncol. 2008;32(3):689-699. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.32.3.689.

403. Wang D, Zhu X, Tang X, Li H, Yizhen X, Chen D. Auxiliary antitumor effects of fungal proteins from Hericium erinaceus by target on the gut microbiota. J Food Sci. 2020;85(6):1872-1890. DOI:10.1111/1750-3841.15134.

404. Wang DF, Lou N, Li XD. Effect of Coriolus versicolor polysaccharide-B on the biological characteristics of human esophageal carcinoma cell line eca109. Cancer Biol Med. 2012;9(3):164-167. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2012.03.002.

405. Wang G, Zhao J, Liu J, Huang Y, Zhong JJ, Tang W. Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo. Int Immunopharmacol. 2007;7(6):864-870. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.02.006.

406. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of Tricholoma sp., a local edible mushroom. Life Sci. 1995;57(3):269-281. DOI: https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00270-G.

407. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom Tricholoma mongolicum. Immunopharmacology. 1996;31(2-3):205-211. DOI: https://doi.org/10.1016/0162-3109(95)00049-6.

408. Wang J, Dong B, Tan Y, Yu S, Bao YX. A study on the immunomodulation of polysaccharopeptide through the TLR4-TIRAP/MAL-MyD88 signaling pathway in PBMCs from breast cancer patients. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2013;35(4):497-504. DOI: 10.3109/08923973.2013.805764.

409. Wang J, Yuan Y, Yue T. Immunostimulatory activities of β-d-glucan from Ganoderma lucidum. Carbohydr Polym. 2014;102:47-54. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.10.087.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

410. Wang K, Wang Z, Cui R, Chu H. Polysaccharopeptide from Trametes versicolor blocks inflammatory osteoarthritis pain-morphine tolerance effects via activating cannabinoid type 2 receptor. Int J Biol Macromol. 2019;126:805-810. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.212.

411. Wang N, Li J, Huang X, Chen W, Chen Y. Herbal Medicine Ophiocordyceps sinensis Improves Health-Related Quality of Life in Moderate-to-Severe Asthma. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;2016:6134593. DOI: 10.1155/2016/6134593.

412. Wang SR, Zhang L, Chen HP, Li ZH, Dong ZJ, Wei K, et al. Four new spiroaxane sesquiterpenes and one new rosenonolactone derivative from cultures of Basidiomycete Trametes versicolor. Fitoterapia. 2015;105:127-131. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.06.017.

413. Wang Z, Dong B, Feng Z, Yu S, Bao Y. A study on immunomodulatory mechanism of Polysaccharopeptide mediated by TLR4 signaling pathway. BMC Immunol. 2015;16:34. DOI: 10.1186/s12865-015-0100-5.

414. Wasser S P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89(5):1323–1332. DOI: 10.1007/s00253-010-3067-4.

415. Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Crit Rev Immunol. 1999;19(1):65-96. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v19.i1.30.

416. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. Int J Med Mushrooms. 2010;12(1):1-16. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.10.

417. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;60(3):258-274. DOI: 10.1007/s00253-002-1076-7.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

418. Wasser SP. Medicinal Mushrooms in Human Clinical Studies. Part I. Anticancer, Oncoimmunological, and Immunomodulatory Activities: A Review. Int J Med Mushrooms. 2017;19(4):279-317. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v19.i4.10.

419. Watanabe H, Kashimoto H, Ushijima M, Tamura K. Effects of a water-soluble extract of Ganoderma lucidum mycelia on aberrant crypt foci induced by azoxymethane and small-intestinal injury by 5-FU in F344 rats. Med Mol Morphol. 2013;46(2):97-103. DOI: 10.1007/s00795-013-0012-5.

420. Wei B, Zhang R, Zhai J, Zhu J, Yang F, Yue D, et al. Suppression of Th17 Cell Response in the Alleviation of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by *Ganoderma lucidum* Polysaccharides. J Immunol Res. 20180;2018:2906494. DOI: 10.1155/2018/2906494.

421. Wei WS, Tan JQ, Guo F, Ghen HS, Zhou ZY, Zhang ZH, et al. Effects of Coriolus versicolor polysaccharides on superoxide dismutase activities in mice. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1996;17(2):174-178.

422. Wenner CA, Inatsuka C, Smith TD, Sasagawa M, Martzen MR, Standish LJ, et al. Anti-tumor actions of Trametes versicolor extract polysaccharide K include activation of dendritic cells and gamma delta T cells. Planta Medica. 2013;79(10):CL5. DOI: 10.1055/s-0033-1348530.

423. Wenner CA, Martzen MR, Lu H, Verneris MR, Wang H, Slaton JW. Polysaccharide-K augments docetaxel-induced tumor suppression and antitumor immune response in an immunocompetent murine model of human prostate cancer. Int J Oncol. 2012;40(4):905-913. DOI: 10.3892/ijo.2011.1292.

424. Wesa KM, Cunningham-Rundles S, Klimek VM, Vertosick E, Coleton MI, Yeung KS, et al. Maitake mushroom extract in myelodysplastic syndromes (MDS): a phase II study. Cancer Immunol Immunother. 2015;64(2):237-247. DOI: 10.1007/s00262-014-1628-6.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

425. WHO: World Health Organization. Cancer statistics. Fact sheets [Internet]. WHO; 2019. [última consulta en septiembre de 2020]. Disponible en: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer.

426. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(10):825-833. DOI: 10.1038/nrd1851.

427. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World cancer report: cancer research for cancer prevention. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2020. Disponible en: https://www.iccp-portal.org/sites/default/files/resources/IARC%20World%20Cancer%20Report%202020.pdf.

428. Wong CK, Bao YX, Wong EL, Leung PC, Fung KP, Lam CW. Immunomodulatory activities of Yunzhi and Danshen in post-treatment breast cancer patients. Am J Chin Med. 2005;33(3):381-395. DOI: 10.1142/S0192415X05002990.

429. Wong JH, Ng TB, Chan HHL, Liu Q, Man GCW, Zhang CZ, et al. Mushroom extracts and compounds with suppressive action on breast cancer: evidence from studies using cultured cancer cells, tumor-bearing animals, and clinical trials. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(11):4675-4703. DOI:10.1007/s00253-020-10476-4

430. Wong JH, Sze SCW, Ng TB, Cheung RCF, Tam C, Zhang KY, et al. Apoptosis and anti-cancer drug discovery: the power of medicinal fungi and plants. Curr Med Chem. 2018;25(40):5613-5630. DOI: 10.2174/0929867324666170720165005.

431. Wong JY, Abdulla MA, Raman J, Phan CW, Kuppusamy UR, Golbabapour S, et al. Gastroprotective effects of lion´s mane mushroom Hericium erinaceus (Bull.:Fr.) Pers. (Aphyllophoromycetideae) extract against ethanol-induced ulcer in rats. Evid Based Compement Alternat Med. 2013;2013:492976. DOI: 10.1155/2013/492976.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

432. World Health Organization. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. (2020). Available at: https://gco.iarc.fr/today/home. (Accessed: 23rd May 2020)

433. Wright ME, Tsai MJ, Aebersold R. Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. Mol Endocrinol. 2003;17(9):1726-1737. DOI: 10.1210/me.2003-0031.

434. Wu B, Cui J, Zhang C, Li Z. A polysaccharide from Agaricus blazei inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. Int J Biol Macromol. 2012;50(4):1116-1120. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.02.023.

435. Wu GS, Guo JJ, Bao JL, Li XW, Chen XP, Lu JJ, Wang YT. Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from Ganoderma lucidum - a review. Expert Opin Investig Drugs. 2013;22(8):981-992. DOI: 10.1517/13543784.2013.805202.

436. Wu GS, Lu JJ, Guo JJ, Li YB, Tan W, Dang YY, et al. Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. Fitoterapia. 2012;83(2):408-414. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.12.004.

437. Wu H, Li X, Liu W, Chen T, Li Y, Zheng W, et al. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides–protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. J Materials Chem. 2012;22(19):9602-9610. DOI: 10.1039/c2jm16828f.

438. Wu JM, Doonan BB, Hsieh TC, Yang Q, Yang XT, Ling MT. Recent advances and challenges in studies of control of cancer Stem cells and the gut microbiome by the Trametes-derived polysaccharopeptide PSP (Review). Int J Med Mushrooms. 2016;18(8):651-660. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i8.10.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

439. Wu MF, Chen YL, Lee MH, Shih YL, Hsu YM, Tang MC, et al. Effect of Agaricus blazei Murrill extract on HT-29 human colon cancer cells in SCID mice in vivo. In Vivo. 2011;25(4):673-677.

440. Wu SJ, Lu TM, Lai MN, Nq LT. Immunomodulatory activities of medicinal mushroom *Grifola frondosa* extract and its bioactive constituent. Am J Chin Med. 2013;41(1):131-144. DOI: 10.1142/S0192415X13500109.

441. Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, et al. A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp. Molecules. 2014;19(11):17478-17535. DOI: 10.3390/molecules191117478.

442. Xian HM, Che H, Qin Y, Yang F, Meng SY, Li XG, et al. Coriolus versicolor aqueous extract ameliorates insulin resistance with PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways involved in diabetic skeletal muscle. Phytother Res. 2018;32(3):551-560. DOI: 10.1002/ptr.6007.

443. Xiao JH, Xiao DM, Chen DX, Xiao Y, Liang ZQ, Zhong JJ. Polysaccharides from the Medicinal Mushroom Cordyceps taii Show Antioxidant and Immunoenhancing Activities in a D-Galactose-Induced Aging Mouse Model. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:273435. DOI: 10.1155/2012/273435.

444. Xie JT, Wang CZ, Wicks S, Yin JJ, Kong J, Li J, et al. Ganoderma lucidum extract inhibits proliferation of SW 480 human colorectal cancer cells. Exp Oncol. 2006;28(1):25-29.

445. Xu CP, Liu WW, Liu FX, Chen SS, Liao FQ, Xu Z, et al. A double-blind study of effectiveness of Hericium erinaceus pers therapy on chronic atrophic gastritis. A preliminary report. Chin Med J (Engl). 1985;98(6):455-456.

446. Xu X, Yan H, Zhang X. Structure and immuno-stimulating activities of a new heteropolysaccharide from Lentinula edodes. J Agric Food Chem. 2013;60(46):11560-11566. DOI: 10.1021/jf304364c.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

447. Xue CC, Zhang AL, Lin V, Da Costa C, Story DF. Complementary and alternative medicine use in Australia: a national population-based survey. J Altern Complement Med. 2007 Jul-Aug;13(6):643-650. DOI: 10.1089/acm.2006.6355.

448. Yang MM, Chen Z, Kwok JS. The anti-tumor effect of a small polypeptide from Coriolus versicolor (SPCV). Am J Chin Med. 1992;20(3-4):221-232. DOI: 10.1142/S0192415X92000230.

449. Yang SF, Zhuang TF, Si YM, Qi KY, Zhao J. Coriolus versicolor mushroom polysaccharides exert immunoregulatory effects on mouse B cells via membrane Ig and TLR-4 to activate the MAPK and NF-κB signaling pathways. Mol Immunol. 2015;64(1):144-1451. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.11.007.

450. Yang X, Sit WH, Chan DK, Wan JM. The cell death process of the anticancer agent polysaccharide-peptide (PSP) in human promyelocytic leukemic HL-60 cells. Oncol Rep. 2005;13(6):1201-1210. DOI: https://doi.org/10.3892/or.13.6.1201.

451. Yang Y, Inatsuka C, Gad E, Disis ML, Standish LJ, Pugh N, et a. Protein-bound polysaccharide-K induces IL-1β via TLR2 and NLRP3 inflammasome activation. Innate Immun. 2014;20(8):857-866. DOI: 10.1177/1753425913513814.

452. Yang Y, Zhao C, Diao M, Zhong S, Sun M, Sun B, et al. The Prebiotic Activity of Simulated Gastric and Intestinal Digesta of Polysaccharides from the Hericium erinaceus. Molecules. 2018;23(12). pii: E3158. DOI: 10.3390/molecules23123158.

453. Yao X, Li G, Xu H, Lu C. Inhibition of the JAK-STAT3 signaling pathway by ganoderic acid A enhances chemosensitivity of HepG2 cells to cisplatin. Planta Med. 2012;78(16):1740-1748. DOI: 10.1055/s-0032-1315303.

454. Yeung JH, Chan SL, Or PM. Polysaccharide peptides from COV-1 strain of Coriolus versicolor inhibit tolbutamide 4-hydroxylation in the rat in vitro and in vivo. Food Chem Toxicol. 2006;44(8):1414-1423. DOI: 10.1016/j.fct.2006.03.007.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

455. Yeung JH, Chiu LC, Ooi VE. Effect of polysaccharide peptide (PSP) on in vivo sulphation and glucuronidation of paracetamol in the rat. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 1995;20(4):287-292. DOI: 10.1007/BF03190246.

456. Yeung JH, Or PM. Effects of polysaccharide peptides from COV-1 strain of Coriolus versicolor on glutathione and glutathione-related enzymes in the mouse. Food Chem Toxicol. 2007;45(6):953-961. DOI: 10.1016/j.fct.2006.12.005.

457. Yeung JH, Or PM. Polysaccharide peptides from Coriolus versicolor competitively inhibit model cytochrome P450 enzyme probe substrates metabolism in human liver microsomes. Phytomedicine. 2012;19(5):457-463. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.09.077.

458. Yeung JH, Or PM. Polysaccharide peptides from Coriolus versicolor competitively inhibit tolbutamide 4-hydroxylation in specific human CYP2C9 isoform and pooled human liver microsomes. Phytomedicine. 2011;18(13):1170-1175. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.06.002.

459. Yi X, Huan XZ, Jia-Shi Z. Randomized double-blind placebo-controlled clinical trial and assessment of fermentation product of Ophiocordyceps sinensis (Cs-4) in enhancing aerobic capacity and respiratory function of the healthy elderly volunteers. Chinese J Integr Med. 2004;10:187-192. DOI: 10.1007/BF02836405.

460. Yin C, Noratto GD, Fan X, Chen Z, Yao F, Shi D, et al. The Impact of Mushroom Polysaccharides on Gut Microbiota and Its Beneficial Effects to Host: A Review. Carbohydr Polym. 2020;250:116942. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116942.

461. Yin X, Ying J, Li L, Zhang H, Wang H. A meta-analysis of lentinan injection combined with chemotherapy in the treatment of nonsmall cell lung cancer. Indian J Cancer. 2015 Nov;52 Suppl 1:e29-31. DOI: 10.4103/0019-509X.168953.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

462. Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Suh HJ. Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from Ophiocordyceps sinensis by submerged culture. Appl Microbiol Biotechnol. 2008;80(6):1087-1093. DOI: 10.1007/s00253-008-1607-y.

463. You YH, Lin ZB. Protective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. Acta Pharmacol Sin. 2002;23(9):787-791.

464. Yu CH, Kan SF, Shu CH, Lu TJ, Sun-Hwang L, Wang PS. Inhibitory mechanisms of Agaricus blazei Murill on the growth of prostate cancer in vitro and in vivo. J Nutr Biochem. 2009;20(10):753-764. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2008.07.004.

465. Yu L, Wei H. The hypnotic and sedative actions of the spores of Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) in mice. Int J Med Mushrooms. 2000;2(4). DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v2.i4.120.

466. Yu ZT, Liu B, Mukherjee P, Newburg DS. Trametes versicolor extract modifies human fecal microbiota composition in vitro. Plant Foods Hum Nutr. 2013;68(2):107-112. DOI: 10.1007/s11130-013-0342-4.

467. Yuen JW, Gohel MD, Au DW. Telomerase-associated apoptotic events by mushroom Ganoderma lucidum on premalignant human urothelial cells. Nutr Cancer. 2008;60(1):109-119. DOI: 10.1080/01635580701525869.

468. Zaidman BZ, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;67(4):453-468. DOI: 10.1007/s00253-004-1787-z.

469. Zajączkowska R, Kocot-Kępska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J. Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Int J Mol Sci. 2019;20(6). pii: E1451. DOI: 10.3390/ijms20061451.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

470. Zeng F, Hon CC, Sit WH, Chow KY, Hui RK, Law IK, et al. Molecular characterization of Coriolus versicolor PSP-induced apoptosis in human promyelotic leukemic HL-60 cells using cDNA microarray. Int J Oncol. 2005;27(2):513-523. DOI: https://doi.org/10.3892/ijo.27.2.513.

471. Zhang H, Morisaki T, Matsunaga H, Sato N, Uchiyama A, Hashizume K, et al. Protein-bound polysaccharide PSK inhibits tumor invasiveness by down-regulation of TGF-beta1 and MMPs. Clin Exp Metastasis. 2000;18(4):343-352.

472. Zhang J, Tang Q, Zhou C, Jia W, Da Silva L, Nguyen LD, et al. GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from Ganoderma lucidum, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response. Life Sci. 2010;87(19-22):628-637. DOI: 10.1016/j.lfs.2010.09.026.

473. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci Technol. 2007;18(1):4-19. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.07.013.

474. Zhang M, Huang J, Xie X, Holman CD. Dietary intakes of mushrooms and green tea combine to reduce the risk of breast cancer in Chinese women. Int J Cancer. 2009;124(6):1404-1408. DOI: 10.1002/ijc.24047.

475. Zhang M, Zhang Y, Zhang L, Tian Q. Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China. Prog Mol Biol Transl Sci. 2019;163:297-328. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.02.013.

476. Zhang MM, Cheng JQ, Xia L, Lu YR, Wu XT. Monitoring intestinal microbiota profile: a promising method for the ultraearly detection of colorectal cancer. Med Hypotheses. 2011;76(5):670-672. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.01.028.

477. Zhang S, Sugawara Y, Chen S, Beelman RB, Tsuduki T, Tomata Y, et al. Mushroom consumption and incident risk of prostate

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cancer in Japan: A pooled analysis of the Miyagi Cohort Study and the Ohsaki Cohort Study. Int J Cancer. 2020;146(10):2712-2720. doi:10.1002/ijc.32591

478. Zhang Y, Mills GL, Nair MG. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom Grifola frondosa. J Agric Food Chem. 2002;50(26):7581-7585. DOI: 10.1021/jf0257648.

479. Zhao H, Zhang Q, Zhao L, Huang X. Wang J, Kang X. Spore powder of Ganoderma lucidum improves cancer-related fatigue in breast cancer patients undergoing endocrine therapy: a pilot clinical trial. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:809614. DOI: 10.1155/2012/809614.

480. Zhao K, Lin Y, Li YJ, Gao S. Efficacy of short-term Ophiocordyceps sinensis for prevention of contrast-induced nephropathy in patients with acute coronary syndrome undergoing elective percutaneous coronary intervention. Int J Clin Exp Med. 2014;7(12):5758-5764.

481. Zhao L, Hao X, Wu Y. Inhibitory effect of polysaccharide peptide (PSP) against Tobacco mosaic virus (TMV). Int J Biol Macromol. 2015;75:474-478. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.058.

482. Zhao YY. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and quality control of Polyporus umbellatus (Pers.) Fries: A review. J Ethnopharmacol. 2013;149(1):35-48. DOI: 10.1016/j.jep.2013.06.031.

483. Zheng H, Kang Y. Multilayer control of the EMT master regulators. Oncogene. 2014;33(14):1755-1763. DOI: 10.1038/onc.2013.128.

484. Zhong M, Tai A, Yamamoto I. In vitro augmentation of natural killer activity and interferon-gamma production in murine spleen cells with Agaricus blazei fruiting body fractions. Biosci Biotechnol Biochem. 2005;69(12):2466–2469. DOI: https://doi.org/10.1271/bbb.69.2466.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

485. Zhou G, Han C. The co-effect of vanadium and fermented mushroom of Coprinus comatus on glycaemic metabolism. Biol Trace Elem Res. 2008;124(1):20-27. DOI: 10.1007/s12011-008-8118-7.

486. Zjalic S, Reverberi M, Ricelli A, Mario Granito V, Fanelli C, Adele Fabbri A. Trametes versicolor: a possible tool for aflatoxin control. Int J Food Microbiol. 2006;107(3):243-249. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.003.

487. Zjalic S, Reverberi M, Ricelli A, Scarpari M, Fabbri AA, Fanelli C. Control of mycotoxins in feeds by novel more environmental friendly strategies. In: Casasús I, Rogošiç J, Rosati A, Štokoviç I, Gabiña D, editors. Animal farming and environmental interactions in the Mediterranean region. EAAP – European Federation of Animal Sciences. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2012. Vol 131. DOI: https://doi.org/10.3920/978-90-8686-741-7_23.

488. Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. J Nat Prod. 2004;67(2):300-310. DOI: 10.1021/np030372w.

489. Zmitrovich IV, Belova NV, Balandaykin ME, Bondartseva MA, Wasser SP. Cancer without Pharmacological Illusions and a Niche for Mycotherapy (Review). Int J Med Mushrooms. 2019;21(2):105-119. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019030047.

490. Zmitrovich IV, Bondartseva MA, Arefyev SP, Ezhov ON, Wasser SP. Profiles of Little-Known Medicinal Polypores: Funalia trogii (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms. 2018;20(7):657-664. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018026564.

491. Zmitrovich IV, Ezhov ON, Ranadive KR, Wasser SP. Profiles of Little-Known Medicinal Polypores: Earliella scabrosa (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms. 2017;19(11):1023-1027. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2017024496.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

492. Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. Carbohydr Polym. 2012;90(4):1395-1410. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.07.026.

493. Zou X, Jiang H, Lin J, Tang K. Cytotoxic activities of Coriolus versicolor (Yunzhi) extracts on human liver cancer and breast cancer cell line. African J Biotech. 2007;6(15):1740-1743. DOI: https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2255.

494. Zou YJ, Wang HX, Ng TB, Huang CY, Zhang JX. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom Hericium coralloides. J Microbiol. 2012;50(1):72-78. DOI: 10.1007/s12275-012-1372-6.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Glosario de siglas y abreviaturas

5-FU	→ 5-fluorouracilo
ADN	→ ácido desoxirribonucleico
AKT	→ serina/treonina proteína quinasa
ALT	→ alanina aminotransferasa
AMPK	→ proteínas quinasas activadas por cAMP
ANEFP	→ Asociación para el Autocuidado de la Salud
AOM	→ azoximetano
ARN	→ ácido ribonucleico
ARNm	→ ARN mensajero
ARNr	→ ARN ribosomal
ARTOI	→ Asociación de la Investigación de Terapias Oncológicas Integrativas
AST	→ aspartato aminotransferasa
ATCC	→ *American Type Culture Collection*
BrdU	→ bromodesoxiuridina
CAM	→ productos medicinales complementarios y alternativos
CAPOX	→ capecitabina + oxaliplatino
CCR	→ cáncer colorrectal
CD	→ cúmulo de diferenciación
CDR	→ cantidad diaria recomendada

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CECT → Colección Española de Cultivos Tipo
CIPN → neuropatía periférica inducida por la quimioterapia
COX → ciclooxigenasa
CR → receptor del complemento
CRD → cuaderno de recogida de datos
CTL → linfocito T citotóxico
CYP450 → citocromo P450
DC → células dendríticas
DHT → dihidrotestosterona
DMH → dimetilhidrazina
DMSO → dimetilsulfóxido
DSS → sodio sulfato de dextrano
EA → evento adverso
EBM → medicina basada en hechos (*evidence based medicine*)
ECOG → *Eastern Cooperative Oncology Group*
EFSA → Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (UE)
ELISA → e*nzyme-linked immunosorbent assay*
ERK → quinasas reguladas por señales extracelulares
ERα → receptor de estrógeno alfa
ESMO → *European Society for Medical Oncology*
FAK → quinasa de adhesión focal
FDA → *Food and Drug Administration* (EE.UU.)
FIP → proteína fúngica inmunomoduladora
GMP → *good manufacturing practices*
IC_{50} → concentración inhibitoria media
IFN-α → interferón alfa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IFN-γ → interferón gamma
IL → interleucina
IP → intraperitoneal
JNK → quinasa c-Jun N-terminal
LAK → células NK activadas por linfoquinas
LSN → límite superior de normalidad
MAPK → proteína quinasa activada por mitógenos
MASCC → *Multinational Association for Supportive Care in Cancer*
MHG → *microwave hydrodiffusion and gravity*
MMP → metaloproteinasa de matriz extracelular
MNM → medio nutritivo Melin-Norkranks modificado
MRB → modificador de la respuesta biológica
MTC → medicina tradicional china
MTT → 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
NADP → nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCCIH → *National Center for Complementary and Integrative Health* (EE.UU)
NF-κB → factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF → factor de crecimiento nervioso
NIH → *National Institutes of Health* (EE.UU.)
NK → células *natural killer*
NOS → óxido nítrico sintasa
OMS → Organización Mundial de la Salud
ON → óxido nítrico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OTC → medicamentos no financiados sin receta

PAMP → patrones moleculares asociados a patógenos

PDA → *potato dextrose agar*

PG-SGA → *Patient-Generated Subjective Global Assessment*

PRR → receptor de reconocimiento de patrones

PSK → polisacárido K obtenido de *Trametes versicolor* (krestin)

PSP → polisacárido P obtenido de *Trametes versicolor* (coriolan)

SD → desviación estándar

SEOM → Sociedad Española de Oncología Médica

SM → síndrome metabólico

SOD → superóxido dismutasa

TGF-β → factor de crecimiento transformante beta

Th → linfocito T *helper*

TLR → receptor tipo *toll*

TNF-α → factor de necrosis tumoral alfa

UE → Unión Europea

VEGF → factor de crecimiento endotelial vascular

VIH → virus de la inmunodeficiencia humana

VPH → virus del papiloma humano

w/w → *weight to weight* (porcentaje en peso)

βGR → receptor de β-glucano (dectina-1)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Anexos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Innovative technologies for the extraction of saccharidic and phenolic fractions from *Pleurotus eryngii*

Paula Rodriguez-Seoane[a], Beatriz Diaz-Reinoso[b],∗, Ma Jesus Gonzalez-Munoza[b], Catalina Fernandez de Ana Portela[c], Herminia Dominguez[a,b]

[a] *Departamento de Enxeñería Química, Universidade de Vigo (Campus Ourense), Edificio Politécnico. As Lagoas, 32004, Ourense, Spain*

[b] *CITI-Universidade de Vigo, Parque Tecnolóxico de Galicia, Rúa Galicia Nº 2, 32900, Ourense, Spain*

[c] *Hifas da Terra SL, Portamuiños, 7, 36154, Bora, Pontevedra, Spain*

https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818310235?via%3Dihub

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD PRODUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS DE HONGOS COMESTIBLES EN CARCINOMA DE COLON.

Martínez, O[1]., Fernández de Ana Portela, C[2]., Rodríguez-Blanco, A[2]., González-Muñoz, M.J[2]., Castosa, R[1]., Díaz, A[1]., Santamarina, I[1]., Prego, C[3]., Figueroa, A[1].

[1] Instituto Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), A Coruña. [2]Hifas da Terra SL, Pontevedra. [3]CZ Veterinaria SA, Pontevedra

RESUMEN

El cáncer colorrectal supone, aproximadamente, el 10-15% de todos los cánceres. En los países occidentales ocupa el segundo lugar en incidencia. Las nuevas exigencias sociales y de salud han llevado a la implementación de alimentos funcionales y nutraceúticos que, además de sus funciones nutritivas generales, aportan un beneficio añadido para la salud proporcionando en muchos casos beneficios médicos, incluso en la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer. En este trabajo analizamos el efecto citotóxico de diferentes extractos de hongos comestibles sobre una línea humana epitelial de adenocarcinoma colorrectal. Para ello, empleamos concentraciones crecientes de 6 extractos de origen fúngico en la línea de adenocarcinoma colorrectal LoVo a 24, 48 y 72 horas de tratamiento para determinar la IC50 de dichos extractos. Los resultados obtenidos demuestran que los extractos de hongos empleados afectan a la viabilidad celular y presentan citotóxicidad (IC50) sobre carcinoma de colon de forma variable en función del tiempo de incubación. Todos los extractos presentaron citotoxicidad transcurridas 72h de incubación y afectaron a la viabilidad celular de carcinoma de colon transcurridas 48 h a diferentes concentraciones. Resultados similares se han obtenido previamente con otros metabolitos secundarios de hongos, donde se observa un descenso en la proliferación de células de cáncer colorrectal sin registrarse efectos en la viabilidad celular, por lo que se hace necesario determinar el posible efecto de los extractos sobre la proliferación celular de líneas de cáncer.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son una fuente natural de sustancias con propiedades medicinales. En campañas de aislamiento se recogieron en el noroeste peninsular aislados de especies con interés medicinal, con especial atención a aquellas especies productoras de compuestos con actividad anticancerígena.



Aislamiento en medio de cultivo sólido de cepas fúngicas con interés medicinal en Hifas da Terra S.L.

OBJETIVOS

1.- Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de especies de hongos con interés medicinal.

2.- Analizar el efecto citotóxico de estos aislados sobre células de cáncer de colon.

EL ADN RIBOSOMAL NUCLEAR DE 3 DE LAS CEPAS AISLADAS PRESENTA HOMOLOGÍA CON CEPAS EUROPEAS DE *Grifola frondosa*

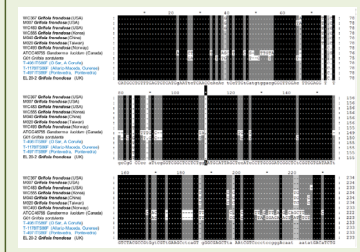


FIG. 1. Alineamiento múltiple de secuencias de la región ADNr 5.8S, ITS2 y ADNs 28S mediante software Gene Doc. Nucleótidos ausentes (guiones) e idénticos (puntos) aparecen indicados. Cepas aisladas identificadas como *Grifola sp.* Aparecen resaltadas (azul).

EL ADN RIBOSOMAL NUCLEAR DE 2 CEPAS AISLADAS PRESENTA MAYOR HOMOLOGÍA FRENTE A CEPAS EUROPEAS Y AMERICANAS QUE FRENTE A CEPAS ASIÁTICAS DE *Ganoderma lucidum*

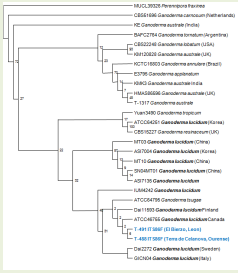


FIG. 2. Árbol filogenético de máxima parsimonia en base a la región ADNr 5.8S, ITS2 y ADNr 28S mediante software Phylowin para cepas identificadas como *Ganoderma sp*).

EL TRATAMIENTO CON DISTINTOS EXTRACTOS DE HONGOS COMESTIBLES PRODUCE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON

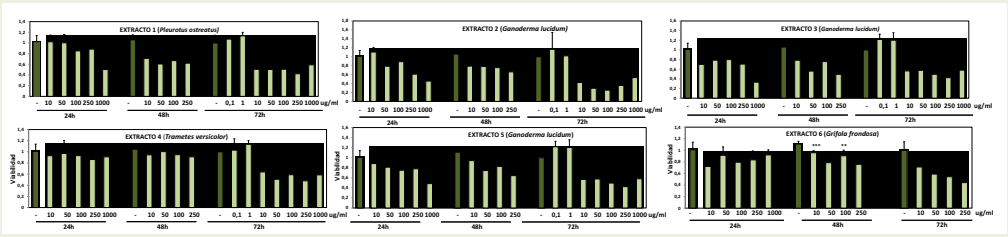


FIG. 3. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayo MTT en la línea celular LoVo a 24, 48 y 72 horas, tratando con las concentraciones indicadas de los distintos extractos. Los resultados se expresan como media ± desv. est y la significación estadística fue determinada mediante ANOVA seguida del test Bonferroni (* P< 0,05; ** P<0,01; ***P<0,001).

VALORES IC50 DE LOS DISTINTOS EXTRACTOS FÚNGICOS

Extracto	IC_{50} (µg/ml) 24h	72h
Extracto 2	817,13	6,9
Extracto 3	683,81	20,09
Extracto 5	643,82	127,12
Extracto 6	-	174,24

Fig 4. Se calculó la IC50 a partir de las curvas dosis-respuesta de los distintos extractos.

CONCLUSIONES

1.- Se han aislado e identificado diferentes cepas de las especies *Grifola frondosa y Ganoderma lucidum*, ambas productoras de compuestos con actividad anticancerígena descrita. Un número muy reducido de cepas de estas especies se han identificado por métodos moleculares en Europa.

2.- El tratamiento de células de carcinoma de colon con algunas de estas cepas produce un significativo efecto citotóxico, pudiendo establecer el IC50 de estos compuestos.

AGRADECIMIENTOS

Estos trabajos forman parte del proyecto FUNGITECHONCO, subvencionado por el Centro para el desarrollo tecnológico industrial (Programa Innterconecta 2015), y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y las empresas CZ Veterinaria, S.A. e Hifas da Terra, S.L.

HIFAS da TERRA
inibic instituto de investigación biomédica a coruña
SERVIZO GALEGO de SAÚDE Xerencia Xestión Integrada A Coruña
CZV CZ VETERINARIA
CDTI Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial
GOBIERNO DE ESPAÑA · MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD · Unión Europea · Fondo Europeo de Desarrollo Regional
FEDER - INNTERCONECTA "Una manera de hacer Europa"
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

In Vitro Anti-proliferative and Anti-invasive Effect of Polysaccharide-rich Extracts from *Trametes Versicolor and Grifola Frondosa* in Colon Cancer Cells

Daniel Roca-Lema[1*], Olaia Martinez-Iglesias[1*], Catalina Fernández de Ana Portela[2], Arturo Rodríguez-Blanco[2], Manuel Valladares-Ayerbes3, Andrea Díaz-Díaz[1], Alba Casas-Pais1, Cecilia Prego[4] and Angélica Figueroa[1].

1. Epithelial Plasticity and Metastasis Group, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas. Universidade da Coruña (UDC).
2. Hifas da Terra SL, Pontevedra, Spain.
3. Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain.
4. CZ Veterinaria SA, Pontevedra, Spain.

https://www.medsci.org/v16p0231.htm

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lista de verificación de recomendaciones para **Tesis EDI saúde. GENERAL**

Sí-No-N/A		Página
Para todas las Tesis		
Sí	Declaración de potenciales conflictos de interés por parte del autor	107
N/A	Declaración sobre el origen y copyright de las figuras no originales y permiso en caso necesario. Incluirlos en el pie de cada figura no original.	
N/A	Lista de adecuación estadística en caso de no cubrir ninguna de las otras tres *checklist* específicas.	
Para Tesis que implican a seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal		
N/A	Declaración sobre su aprobación por el comité de ética de la investigación	
N/A	Código de registro del estudio	
N/A	Copia del informe favorable	
N/A	Declaración de que los datos se basan en información anónima y por tanto no se necesita aprobación del comité de ética de la investigación	
N/A	Si el estudio es observacional, *checklist* STROBE	
Para Tesis que describen un ensayo clínico		
Sí	Declaración sobre su autorización por la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios.	106
N/A	Copia de la autorización	
N/A	*Checklist* CONSORT	
Para Tesis que usan células troncales humanas, embrionarias o inducidas		
N/A	Declaración sobre su autorización	
N/A	Referencia de la autorización	
N/A	Copia de la autorización	
Para Tesis que incluyen estudios con animales de experimentación		
Sí	Declaración de su autorización	97
No	Número de la autorización del proyecto de experimentación animal	
No	Registro del centro de usuario autorizado si es español	
N/A	Copia del certificado de capacitación si los experimentos los ha hecho el doctorando	
Sí	Indicación de la persona, empresa o servicio que llevó a cabo el experimento en su caso	97
Sí	*Checklist* ARRIVE	

Firma doctorando	Visto bueno CAPD
Catalina Fernández de Ana Portela	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Lista de verificación para Tesis con animales de experimentación. **EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ARRIVE**

Sí/no/NA		página
	Título	
Sí	Proporcionar una descripción tan exacta y concisa como sea posible sobre el contenido del trabajo.	1
	Resumen	
Sí	Proporcionar un resumen preciso de los antecedentes, los objetivos de la investigación, incluyendo detalles de la especie y cepa de los animales utilizados, métodos relevantes, hallazgos principales y conclusiones del estudio.	10
	Antecedentes	
Sí	Incluir suficientes antecedentes científicos (incluyendo las referencias pertinentes al trabajo anterior) a fin de comprender la motivación y el contexto para el estudio, y explicar las bases y el enfoque experimental.	21-82
Sí	Explicar cómo y por qué la especie y el modelo animal utilizados permiten abordar los objetivos científicos y, cuando sea apropiado, la relevancia del estudio para la biología humana.	21-82, 85-86, 96-97
	Objetivos	
Sí	Describir claramente los objetivos primarios y secundarios del estudio, o las hipótesis específicas que se van a probar.	85-86
	Declaración Ética	
Sí	Indicar el permiso del comité ético, y las leyes o decretos pertinentes para el cuidado y uso de animales, bajo las que se realiza la investigación.	96-97
	Diseño del estudio	
Sí	Número de grupos experimentales y control.	99-100
Sí	Cualquier medida adoptada para minimizar los efectos de sesgo subjetivo al asignar los animales a los grupos de tratamiento (por ej., procedimiento aleatorio) y al evaluar los resultados (por ej., si se hace, describir quiénes eran ciegos y cuándo).	99-100
Sí	La unidad experimental (por ej., un solo animal, grupos o jaulas de animales). Un diagrama cronológico o de flujo pueden ser útiles para ilustrar cómo se realizaron los diseños de estudio complejos.	99-100
	Procedimientos experimentales	
Sí	Cómo (por ej., formulación y dosis del tratamiento, el sitio y la vía de administración, anestesia y analgesia utilizadas [incluyendo la monitorización], procedimiento quirúrgico, el método de eutanasia). Proporcionar detalles de cualquier equipo especializado utilizado, incluyendo proveedor(es).	99-100
NA	Cuándo (por ej., la hora del día).	
NA	Dónde (por ej., jaula de alojamiento, laboratorio, prueba del laberinto acuático).	
NA	Por qué (por ej., fundamentos para la elección del anestésico específico, la vía de administración, dosis del fármaco utilizado).	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sí/no/NA		página
	Animales de experimentación	
Sí	Proporcionar detalles de los animales utilizados, incluyendo especie, cepa, sexo, etapa de desarrollo (por ej., edad media o mediana de edad y rango) y peso (por ej., media o mediana más rango de peso).	99
NA	Proporcionar otra información pertinente, como la procedencia de los animales, nomenclatura internacional de la cepa, modificación genética (por ej., animal deficiente o transgénico), genotipo, estado de salud/inmune, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido tratamientos anteriormente, procedimientos previos, etc.	
	Animales	
NA	Alojamiento (tipo de instalación por ej., libre de patógenos específicos [SPF], tipo de jaula o habitáculo, material del lecho, número de animales por jaula, forma y material del tanque, etc. para peces).	
NA	Condiciones de cría (por ej., programa de reproducción, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, calidad de agua, etc. para peces, el tipo de alimentación, el acceso a los alimentos y al agua, enriquecimiento ambiental).	
Sí	Evaluaciones e intervenciones relacionadas con el bienestar que se llevaron a cabo antes, durante o después del experimento	99
	Tamaño de la muestra	
Sí	Especificar el número total de animales utilizados en cada experimento, y el número de animales en cada grupo experimental.	99
Sí	Explicar cómo se determinó el número de animales. Proporcionar detalles del cálculo del tamaño muestral utilizado.	99
NA	Indicar el número de repeticiones independientes de cada experimento, si es pertinente.	
	Asignación de animales a grupos experimentales	
Sí	Proporcionar detalles completos de la forma en que los animales fueron asignados a grupos experimentales, incluyendo distribución aleatoria o asignación específica, si así se hizo.	99-100
NA	Describir el orden en el que los animales en los diferentes grupos experimentales fueron tratados y evaluados.	
Sí	Resultados experimentales 12 Definir claramente los resultados primarios y secundarios evaluados (por ej., muerte celular, marcadores moleculares, cambios de comportamiento).	96-104
	Métodos estadísticos	
Sí	Proporcionar detalles sobre los métodos estadísticos utilizados para cada análisis.	104
Sí	Especificar la unidad de análisis para cada grupo de datos (por ej., un solo animal, grupo de animales, neurona individual).	104
Sí	Describir los métodos utilizados para evaluar si los datos corroboran las suposiciones del método estadístico.	104

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sí/no/NA		página
	Datos basales	
Sí	Para cada grupo experimental, indicar las características relevantes y estado de salud de los animales (por ej., peso, estado microbiológico, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido drogas anteriormente) antes de iniciar el tratamiento o prueba. (Esta información puede ser a menudo tabulada).	99-100
	Cantidades analizadas	
Sí	Indicar el número de animales en cada grupo incluido en cada análisis. Presentar números absolutos (por ej., 10/20, no 50 %2).	99
Sí	Si alguno de los animales o datos no fue incluido en el análisis, explicar por qué.	130
	Resultados y Discusión	
Sí	Indicar los resultados de cada análisis llevado a cabo, con una medida de precisión (por ej., error estándar o intervalo de confianza).	131-136
	Eventos adversos	
Sí	Dar detalles de todos los eventos adversos importantes en cada grupo experimental.	130
Sí	Describir las modificaciones a los protocolos experimentales realizadas para reducir los eventos adversos.	130
	Interpretación /implicaciones científicas	
Sí	Interpretar los resultados, teniendo en cuenta los objetivos y las hipótesis del estudio, la teoría actual y otros estudios pertinentes en la literatura.	130-142, 174-178
Sí	Comentar las limitaciones del estudio incluyendo cualquier fuente potencial de sesgo, cualquier limitación del modelo animal y la imprecisión asociada con los resultados	174-178
NA	Describir cualquier implicación de los métodos experimentales o hallazgos para el reemplazo, refinamiento o reducción (las 3 R) del uso de los animales en investigación.	
	Capacidad de generalización/aplicabilidad	
Sí	Comentar si, y de qué forma, los hallazgos de este estudio son aplicables a otras especies o sistemas, incluyendo cualquier relevancia para la biología humana.	174-178
	Financiación	
Sí	Listar todas las fuentes de financiación (incluyendo el número del proyecto) y el papel de la fuente(s) de financiación en el estudio.	106

Basado en *The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*.

Firma doctorando	Visto bueno CAPD
Catalina Fernández de Ana Portela	

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La micoterapia oncológica, es decir, el uso de los hongos como nutracéuticos en el campo de la oncología integrativa, responde a una demanda social, clínica y económica de incuestionable envergadura. La presente tesis doctoral presenta y analiza resultados preclínicos que muestran las propiedades antitumorales de los extractos fúngicos desarrollados por la empresa Hifas da Terra, y su potencialidad como terapia coadyuvante en pacientes con cáncer colorrectal. Así mismo, delinea el protocolo de un ensayo clínico para evaluar los efectos beneficiosos de los extractos de hongos en la calidad de vida de los pacientes oncológicos.