

EXPLORANDO NUEVAS FACETAS EN EL PAPEL DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES/ NUTRACÉUTICOS EN LA SALUD HUMANA: UNA MIRADA A LAS SETAS COMESTIBLES-MEDICINALES

Humberto J. Morris¹, Yaixa Beltrán¹, Gabriel Llauradó¹, Yamila Lebeque¹, Isabelle Gaime-Perraud², Serge Moukha³, Paul Cos⁴, Nora García¹, Rosa C. Bermúdez¹

¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Oriente. Ave. Patricio Lumumba s/n. Reparto Jiménez. Santiago de Cuba 5. CP 90500. E-mail: hmorris@cebi.uo.edu.cu

²Instituto Mediterráneo de Biodiversidad y Ecosistemas (IMBE-IRD), Universidad de Marsella, Campus de l'Etoile, 13397 Marseille Cedex 20, Francia

³Laboratorio de Toxicología e Higiene Aplicada / INRA, Universidad de Burdeos -Campus de Carreire, 146 Rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, Francia

Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias. Universidad de Amberes, Bélgica.

RESUMEN

En el área de la interacción alimentos-medicina se han generado novedosos enfoques acerca del papel de los alimentos funcionales y nutraceuticos en la salud. Consumidos como componentes de una dieta normal o como suplementos dietéticos, respectivamente, permiten conservar el estado de bienestar y salud o reducir la aparición de enfermedades.

Los hongos comestibles han devenido un componente esencial de la dieta humana y un recurso innovador para la formulación de alimentos funcionales, nutraceuticos y fármacos. En el presente trabajo, se consideran las tendencias actuales y perspectivas futuras en la ciencia de los alimentos funcionales/nutraceuticos. Se ilustran las investigaciones enfocadas a la evaluación de los efectos funcionales de setas *Pleurotus* cultivadas sobre pulpa de café en Cuba.

Se investigaron los efectos inmunomoduladores de tres preparaciones de cuerpos fructíferos: dos extractos acuosos: HW-E y CW-E, obtenidos a altas y bajas temperaturas, respectivamente, así como la biomasa seca formulada como tabletas de 500 mg. La administración de HW-E a ratones Ofbalb (F₁) durante siete días (100 mg/kg) incrementó la celularidad de la médula ósea y esplénica en comparación con los controles (p<0,05). CW-E administrado oralmente a ratones malnutridos estimuló la inmunidad humoral y celular, en función de la respuesta de anticuerpos y la reacción de hipersensibilidad retardada, respectivamente. El tratamiento profiláctico de ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida con las tabletas de *Pleurotus* (1000 mg/kg) evidenció una inmunosupresión menos pronunciada y propició la recuperación hematopoyética.

Las setas *Pleurotus* representan un paradigma de integración entre tradición y novedad con aplicaciones como alimento funcional/nutraceuticos en la inmunonutrición.

INTRODUCCIÓN

En el nuevo milenio la humanidad se enfrenta a los desafíos que impone la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles; al respecto, un análisis de costo desarrollado recientemente en la Universidad de Harvard sugiere que si las actuales tendencias de salud no son revertidas, los costos por concepto de los servicios médicos asociados al cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, pulmonares obstructivas y mentales, ascenderán en el mundo a 47 trillones de USD en los próximos 20 años (Bloom *et al.*, 2010).

En la interfase alimentos-medicina surgió en Japón en la década del 80 del siglo pasado el concepto de alimentos funcionales, posteriormente ampliado en los Estados Unidos y en Europa. Dicho concepto está orientado a estimular la investigación en nutrición para respaldar y validar el desarrollo de nuevos alimentos y componentes alimentarios que promuevan la salud y disminuyan el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la alimentación (Ashwell, 2004).

Los alimentos funcionales no cuentan con una definición internacionalmente establecida por la comunidad científica. No obstante, se sugiere como principales aspectos para considerar un alimento como funcional: (a) que contenga diversos componentes -nutrientes y no nutrientes- que beneficien una o varias funciones corporales relacionadas con el estado de bienestar y salud, la reducción del riesgo de enfermedad, o ambas cosas, (b) el efecto modulador se ejerce independiente de los efectos fisiológicos producidos por los nutrientes que contiene (Siró *et al.*, 2008). Los alimentos funcionales no son formas farmacéuticas o suplementos nutricionales como tabletas o cápsulas, sino alimentos componentes de la dieta y deben consumirse como parte de un régimen normal (Hasler, 2003).

Con posterioridad al surgimiento del concepto de "alimentos funcionales", han surgido una variedad de vocablos más o menos relacionados con los "alimentos con beneficios específicos para la salud" (Foods for Specific Health Use, FOSHU, Japón). En particular, el término nutracéutico fue acuñado en 1989 por Stephen DeFelice, fundador y director de *Foundation for Innovation in Medicine* (FIM, Cranford, NJ) a partir de los vocablos "nutrition" y "pharmaceutical". Según DeFelice, un nutracéutico se define como un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluidos la prevención o el tratamiento de una enfermedad (Brower, 1998).

El consumo de este grupo de productos con beneficios para la salud se estimula como parte de estilos de vida necesarios. Asimismo, se promueven investigaciones y actividades de innovación orientadas a la evaluación de la funcionalidad de los alimentos, incluidos aquellos considerados tradicionalmente como no convencionales, por ejemplo, las microalgas (Morris *et al.*, 2007) y los hongos comestibles (Morris *et al.*, 2013).

En este sentido, el cultivo de los hongos comestibles-medicinales se ha incrementado significativamente a nivel internacional durante las últimas décadas. Su popularidad se ha expandido debido a la facilidad de su cultivo, la posibilidad de emplear una amplia gama de sustratos, el elevado rendimiento potencial y su alto valor nutricional. Entre los numerosos géneros existentes, los más conocidos son: *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Flammulina*, *Grifola*, *Ganoderma*, *Trametes*, entre otros. Estas especies representan una fuente valiosa de nutrientes y contienen también, diversos compuestos biológicamente activos con efectos terapéuticos (Wasser, 2014; Prasad *et al.*, 2015).

El género *Pleurotus* incluye especies empleadas como alimento por diferentes civilizaciones en el mundo y adicionalmente, por sus propiedades medicinales. Estudios recientes realizados en diferentes especies de *Pleurotus* han evidenciado su potencial farmacológico que comprende: la modulación del sistema inmune, la inhibición del crecimiento tumoral y la inflamación, la actividad hipoglicémica y antitrombótica, la disminución de la concentración de lípidos séricos, la prevención de la hipertensión arterial y la aterosclerosis, así como los efectos antioxidantes, antimicrobianos y antivirales, entre otros (Patel *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2016). Un interés especial han recibido las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales por la importancia cada vez mayor del cáncer, las inmunodeficiencias y las infecciones como problemas de salud (Pérez *et al.*, 2015).

Si bien la mayoría de los estudios relacionados con las propiedades inmunomoduladoras de *Pleurotus* spp. se han enfocado al aislamiento de los compuestos bioactivos, en particular polisacáridos, se debe tomar en consideración el posible efecto sinérgico de las biomoléculas presentes en los extractos y otras preparaciones. Los suplementos dietéticos formulados a partir de extractos refinados o parcialmente refinados, o de biomasa seca del micelio o cuerpos fructíferos de setas comestibles capaces de estimular el sistema inmune se refieren en la literatura como "inmunocéuticos" (Petrova *et al.* 2005).

En el presente trabajo, se ilustran las investigaciones desarrolladas en Cuba enfocadas a la caracterización de los efectos funcionales de los hongos comestibles-medicinales. En este contexto, se evalúan las propiedades inmunonutricionales de tres preparaciones de cuerpos fructíferos de *Pleurotus*: dos extractos acuosos: HW-E y CW-E, obtenidos a altas y bajas temperaturas, respectivamente, así como la biomasa seca formulada como tabletas de 500 mg. Los resultados aportan nuevas evidencias experimentales al conocimiento de las potencialidades de las setas comestibles *Pleurotus* como alimento funcional/ nutracéuticos.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* spp.

Se utilizó la cepa *Pleurotus* sp. CCEBI-3024, depositada en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI, Santiago de Cuba). Los cuerpos fructíferos fueron obtenidos por fermentación en estado sólido (FES) en bolsas de 2 kg, bajo las condiciones de cultivo referidas por Bermúdez *et al.* (2001). Se empleó como sustrato pulpa de café previamente pasteurizada.

Productos derivados de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

Extracto acuoso obtenido a altas temperaturas (HW-E): El preparado HW-E se obtuvo mediante la decocción de los cuerpos fructíferos durante 10 h a la temperatura de 90-95°C con agitación continua a 150 rpm en zaranda. El extracto resultante se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Extracto acuoso obtenido a bajas temperaturas (CW-E): Se procedió de forma similar a HW-E, con la diferencia de que la extracción se realizó durante 3 horas a la temperatura de 20 °C.

Tabletas de cuerpos fructíferos: Los cuerpos fructíferos fueron fragmentados en trozos pequeños, secados 24 h a 45 °C, y a continuación se molieron. El polvo resultante fue conservado en bolsas de nylon, protegido de la luz y la humedad. La formulación del suplemento nutricional (tabletas) se desarrolló en el Laboratorio Farmacéutico Oriente (BioCubaFarma, Santiago de Cuba) en base a 500 mg de biomasa seca de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp.

Determinaciones analíticas en los productos

Se determinó la concentración de carbohidratos totales y proteínas por los métodos de Dubois *et al.* (1956) y Lowry *et al.* (1951), respectivamente. Los resultados se expresaron en función de la materia seca.

Animales de experimentación

Se utilizaron animales procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana). Se emplearon condiciones sanitarias convencionales, y se mantuvieron a temperatura y humedad ambiental controladas. En el cuidado de los animales se

cumplieron las normativas establecidas por la Comunidad Económica Europea. La administración de los productos se efectuó diariamente en las mañanas, entre las 9-10 am.

Efectos de la administración del extracto HW-E a ratones inmunocompetentes

Se emplearon ratones Ofbalb (F₁) machos de 8 semanas, con un peso corporal entre 20 y 25 g, libres de patógenos. Los animales recibieron agua acidulada y alimento *ad libitum* (ratonina, CENPALAB, La Habana) durante todo el período de evaluación. Los ratones fueron distribuidos de forma aleatorizada en dos grupos experimentales de 5 ratones cada uno. Uno de los grupos fue administrado durante 7 días por vía intraperitoneal (i.p.) con 0,2 ml del extracto HW-E a la dosis de 100 mg/kg de peso. El grupo control comprendió ratones tratados con solución salina fisiológica (Laboratorio Farmacéutico Oriente, Santiago de Cuba) en sustitución del extracto.

Celularidad de la médula ósea: Al culminar el período experimental, los animales fueron sacrificados y se les retiró el fémur de la pata trasera derecha para la extracción de la médula ósea con 1,5 ml de solución de Hanks. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer al microscopio óptico.

Celularidad esplénica: La suspensión de células esplénicas se preparó triturando suavemente el bazo con solución de Hanks helada, pasándola luego a través de una gasa antiséptica (Johnson and Johnson Medical, TX, USA). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer en un microscopio óptico.

Efectos de la administración del extracto CW-E a ratones malnutridos

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 8 semanas, con un peso corporal entre 18 y 20 g. Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en tres grupos (n= 10). Dos de los grupos se sometieron a un régimen de restricción dietética hasta la pérdida del 25% del peso inicial con el objetivo de inducir un estado de malnutrición. Estos animales fueron asignados a los grupos M-DC y CW-E, que se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial durante el período de repleción. A los animales del tratamiento CW-E se les administró adicionalmente por vía oral, 0,2 ml del extracto CW-E, equivalente aproximadamente a una dosis de 100 mg/kg de peso. El período de repleción tuvo una duración de ocho días en el experimento de evaluación de la respuesta celular y de catorce días en el correspondiente a la inmunidad humoral. Un grupo control se alimentó con dieta convencional durante toda la experimentación.

Evaluación de la inmunidad humoral: Se realizó mediante un esquema de inmunización con eritrocitos de carnero como antígeno modelo. Al término de la depleción y a los siete días, se le inoculó a ambos grupos por vía intraperitoneal 0,2 ml de una solución de eritrocitos de carnero al 25% en solución salina fisiológica (LABEX®). El volumen administrado de la suspensión celular equivale aproximadamente a una cantidad de 2×10^6 células/ratón. La titulación de los anticuerpos se realizó a los siete y catorce días por el método de hemaglutinación directa (Pico *et al.* 1997).

Evaluación de la inmunidad celular: Se desarrolló a través del ensayo de hipersensibilidad retardada (HR) según Kim *et al.* (1998). El día 0 los ratones fueron sensibilizados por la inoculación intradérmica (i.d) de 50 μ l de una solución de seroalbúmina bovina 5 mg/ml en Adyuvante Completo de Freund (Sigma, St. Louis, MO) en dos sitios del abdomen. A los ocho días los animales se retaron por vía i.d. en el cojinete de la pata trasera izquierda con 20 μ l de la solución de BSA 5 mg/ml. En el cojinete de la pata derecha se inoculó un volumen similar de solución salina tamponada con fosfato (SSTF). La medición de la induración se realizó con un micrómetro

(Mitutoyo, Japón) a las 24 h del reto. La respuesta de HR se expresó como la diferencia entre la magnitud del edema en la pata inoculada con el antígeno y su valor en la pata inyectada con SSTF.

Efectos de la administración de biomasa seca y pulverizada a ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida

Se utilizaron ratones Balb/c machos de 8 semanas, con un peso corporal entre 18 y 25 g. Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cinco grupos (n= 5). La inmunosupresión fue inducida mediante la administración intraperitoneal de ciclofosfamida (CY) USP 23 para inyección (JSLYP, China) a una dosis de 100 mg/kg el día 0 en los grupos CY-*Pleurotus* y CY-Salina, o en el día 5 en los grupos *Pleurotus*-CY y Salina-CY. A los grupos CY-*Pleurotus* y *Pleurotus*-CY se les suministró el suplemento nutricional (1 000 mg/kg) durante ocho días por vía oral en un volumen de suspensión de 0,2 ml, preparada en solución salina fisiológica al momento de ser utilizada. Los animales de los grupos CY-Salina y Salina-CY fueron administrados con solución salina fisiológica (SSF) en sustitución del preparado de *Pleurotus*. Un grupo control fue alimentado con dieta convencional durante toda la experimentación.

Celularidad de la médula ósea y conteo total de leucocitos: La celularidad de la médula ósea se estimó según se describió con anterioridad. Para el conteo total de leucocitos se tomaron 20 μ l de sangre, que se añadieron a viales con 0,4 ml de ácido acético al 2%. Se homogeneizó y se procedió al conteo en cámara de Neubauer en microscopio óptico (NOVEL, China).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el paquete *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) para Windows versión 12.0/2003 (SPSS Inc., 1989-2003). Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para la comparación de las medias de los parámetros estudiados durante la administración de HW-E a ratones inmunocompetentes. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple acoplados a la prueba de Tukey para las comparaciones múltiples de las medias de los tratamientos en los experimentos relacionados con la administración de CW-E a ratones malnutridos. En las experiencias desarrolladas con los ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida se efectuaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, acoplados a la prueba de Student-Newman-Keuls para la comparación de las medias. En todos los casos se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectos de la administración del extracto HW-E a ratones inmunocompetentes

La composición de HW-E se caracterizó por la presencia mayoritaria de carbohidratos y proteínas con valores de 29,6 y 23%, respectivamente. En estudios previos se refirió un contenido superior de carbohidratos (70,4%) e inferior de proteínas (15%) en decocciones del micelio de *Pleurotus* sp. utilizando la cepa CCEBI-3024 obtenido mediante fermentación sumergida (Beltrán *et al.* 2005). Las diferencias en los patrones de biosíntesis de los componentes moleculares indispensables para la célula en las distintas etapas de su ciclo vital podría repercutir en la composición bioquímica de los productos obtenidos de las setas comestibles (He y Seleen 2004).

Los animales administrados durante 7 días vía i.p con HW-E (100 mg/kg) mostraron un incremento estadísticamente significativo en la celularidad medular comparado con el grupo control ($p < 0,05$) (Figura 1). Este resultado permite suponer un efecto modulador de los componentes presentes en HW-E en la hemopoyesis, posiblemente a través de la estimulación de la síntesis de factores, como

las citocinas estimuladoras de la hematopoyesis (denominadas colectivamente, factores estimuladores de colonias).

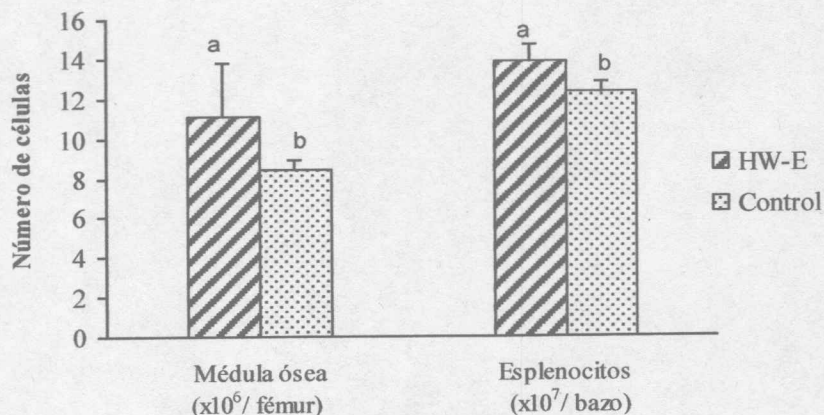


Figura 1. Celularidad de la médula ósea y el bazo en ratones Ofbalb (F₁) inmunocompetentes tratados con el extracto HW-E de *Pleurotus* sp. Los resultados se presentan como el valor medio \pm DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (Mann-Whitney $p < 0,05$).

La celularidad esplénica de los ratones tratados con HW-E mostró valores superiores con relación al grupo administrado con solución salina (Figura 1). Los efectos identificados a nivel de la hematopoyesis medular y la posible inducción de respuestas de fase aguda, proporcionan evidencias que podrían sustentar potenciales aplicaciones en el tratamiento de inmunodeficiencias nutricionales e inducidas con fármacos citostáticos.

Efectos de la administración del extracto CW-E a ratones malnutridos

La composición bioquímica de CW-E reflejó 43% de carbohidratos totales y 35% de proteínas. La extracción acuosa de los cuerpos fructíferos 3 h a 20°C preservó la integridad de las proteínas y de las moléculas termolábiles presentes en la seta (Llauradó *et al.* 2005).

Los títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero a los catorce días en los animales suplementados con CW-E fueron significativamente superiores respecto a los del grupo M-DC, aunque inferiores al control ($p < 0,05$) (Figura 2). Las evidencias sugieren un efecto estimulador por parte del extracto, en la cooperación entre linfocitos T y B, así como en la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas en los animales malnutridos. Al respecto, Tirziu *et al.* (2009) refirieron el efecto estimulante de un extracto alcohólico total de *Pleurotus ostreatus* administrado a concentraciones del 5 y 15%, en la respuesta inmune humoral de gallinas ponedoras vacunadas contra la enfermedad infecciosa de la bursa.

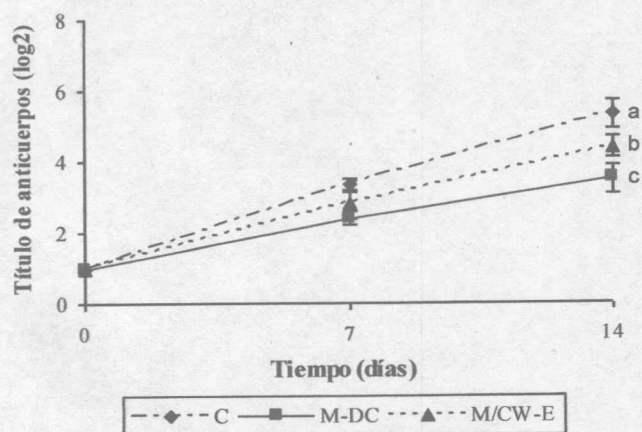


Figura 2. Títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero en ratones Balb/c malnutridos y suplementados o no con el extracto CW-E de *Pleurotus* sp. Los resultados se presentan como el valor medio \pm DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple, Tukey, $p < 0,05$).

Los ratones que recibieron como suplemento el extracto CW-E mostraron una respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) superior a la de los grupos M-DC y control a las primeras 24 horas (Figura 3). Este resultado sugiere un efecto estimulador del extracto de *Pleurotus* sp sobre la respuesta inmune mediada por células T ($CD4^+$ Th1). Paulik *et al.* (1996) evaluaron el efecto en ratones de dos glucanos extraídos de *Pleurotus ostreatus* y una levadura, en diferentes funciones del sistema inmune. Ambos glucanos incrementaron la respuesta de HR respecto al control, aunque el aislado de la seta comestible mostró una respuesta superior.

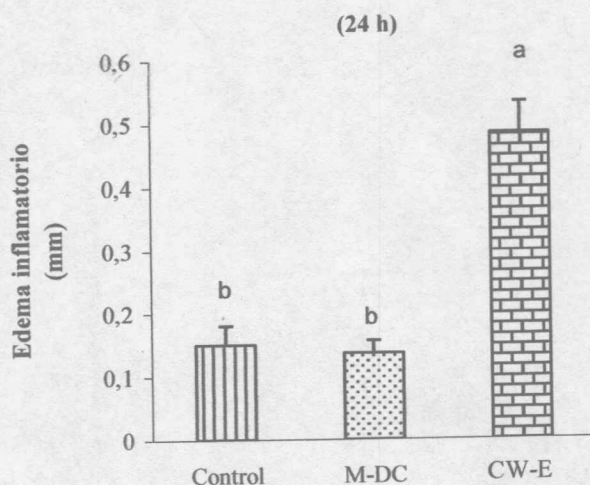


Figura 3. Respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) en ratones Balb/c malnutridos y suplementados o no con el extracto CW-E de *Pleurotus* sp. .

Los resultados se presentan como el valor medio \pm DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple, Tukey, $p < 0,05$).

Efectos de la administración de biomasa seca y pulverizada a ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida

La composición de la preparación seca y pulverizada de cuerpos fructíferos se caracterizó por la presencia mayoritaria de carbohidratos y proteína verdadera, con valores de 55% y 20%, respectivamente. Estos resultados se corresponden con los referidos en la literatura para diferentes especies y cepas de *Pleurotus* (García 2008).

Los resultados del conteo de células en la médula ósea mostraron un efecto potenciador de la actividad hematopoyética cuando el suplemento fue administrado de forma profiláctica ($9,89 \times 10^6/\text{fémur}$), valor estadísticamente similar al de los animales inmunocompetentes utilizados como control ($p < 0,05$) (Figura 4). En cuanto a su administración en régimen terapéutico, no presentó diferencias significativas respecto a los grupos controles tratados con solución salina. En estudios anteriores se informó el efecto estimulador sobre la médula ósea de un extracto crudo, obtenido del micelio de *Pleurotus* sp. por fermentación en estado sólido (FES), en ratones con inmunodeficiencia adquirida, como resultado del tratamiento con ciclofosfamida (Morris *et al.* 2003).

Uno de los parámetros más afectados en estados de inmunodeficiencias inducidas con citostáticos es el conteo total de leucocitos. Se apreció una recuperación de esta población celular en los animales tratados profilácticamente con el suplemento de *Pleurotus*, con niveles similares al control ($p < 0,05$) (Figura 4). Los valores estuvieron comprendidos dentro del intervalo considerado como normal para la especie ($6-17 \times 10^9/\text{L}$). Sin embargo, los ratones administrados con el producto una vez inducido el estado de inmunodepresión no mostraron una recuperación en los conteos leucocitarios en sangre periférica.

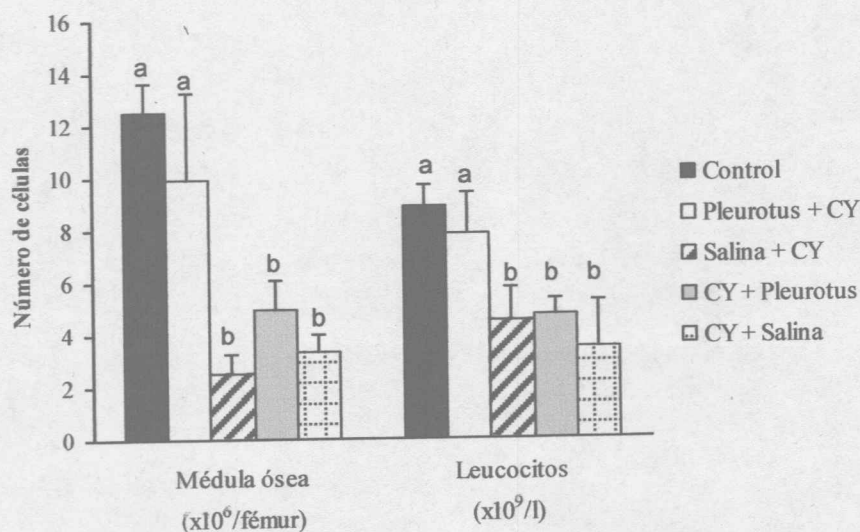


Figura 4. Celularidad de la médula ósea y conteo de leucocitos en ratones Balb/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida y tratados o no con las tabletas de *Pleurotus* sp. Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, Student-Neuman-Keuls $p < 0,05$).

Meerovich *et al.* (2005) informaron la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral en ratones por un extracto del micelio de *P. ostreatus*, administrado sólo o en combinación con la ciclofosfamida. El extracto micelial resultó efectivo en la disminución de la severidad de la leucopenia causada por el fármaco citostático.

CONCLUSIONES

La integración entre las diversas disciplinas implicadas en la ciencia y tecnología de los alimentos y la nutrición resulta esencial en las actividades de investigación-desarrollo-innovación en el área de los alimentos funcionales.

Los conocimientos actuales sobre el papel de los productos obtenidos de *Pleurotus* en la profilaxis y tratamiento de diversas enfermedades se encuentran aún en gran medida a un nivel empírico. Los resultados obtenidos en la evaluación de los efectos inmunomoduladores de los extractos HW-E, CW-E y de una preparación seca y pulverizada en diferentes biomodelos experimentales apuntan a que su consumo podría ser un factor importante en el mantenimiento y/o recuperación de la integridad funcional del organismo.

El progreso en la comprensión de los aspectos metabólicos y funcionales de los alimentos funcionales y nutraceuticos derivados de los hongos comestibles-medicinales resolverá controversias sobre su papel en la inmunonutrición y proporcionará las bases para establecer recomendaciones sobre su utilización terapéutica.

REFERENCIAS

- Ashwell M. (2004) *Conceptos sobre Alimentos Funcionales*. Washington DC: ILSI Press.
- Beltrán Y, Morris HJ, Lebeque Y, Llauradó G, Marcos J, García N, Bermúdez RC (2005) Aqueous extracts from mycelium and fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus* sp. CCEBI-3024. *Rev. Cubana Química* XVII:166.
- Bermúdez RC, García N, Gross P, Serrano M (2001) Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. *Micol. Apl. Int.* 13:25-29.
- Bloom DE, Cafiero ET, Jane'-Llopis E. et al. (2011) *The global economic burden of non-communicable diseases*. Geneva: World Economic Forum [Online], Available: www.weforum.org/reports/global-economic-burden-non-communicable-diseases [4 May 2014].
- Brower V. (1998) Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nat. Biotechnol.* 16:728-731.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- García N (2008) Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus* spp. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.
- Gomes RC, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. (2016) Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: a review on the past decade findings. *Trends Food Sci. Technol.* 50:103-117.
- Hasler CM. (2003) *Alimentos Funcionales*. En: Bowman B, Russell A, eds. Conocimientos actuales sobre nutrición. 8a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; p. 805-816.
- He X, Seleen J (2004) Chemical analysis as a quality control method for medicinal mushroom and fungi extracts. *Int. J. Med. Mush.* 6:253-261.
- Kim YS, Maslinski W, Zheng XX, Stevens AC, Li XC, Tesch GH, Kelley VR, Strom TD. (1998) Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fcy 2a protein blocks delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 160:5742-5748.
- Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Marcos J, Beltrán Y, García N (2005) Acerca de la funcionalidad de setas comestibles *Pleurotus* spp.: propiedades bioestimulantes de un extracto acuoso. *Rev Cubana Química* XVII:102-107.

- Lowry HO, Rosebrough A, Farr L, Randall JR. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Meerovich IG, Yang M, Jiang P, Hoffman RM, Gerasimenya VP, Orlov AE (2005) Study of action of cyclophosphamide and extract of mycelium of *Pleurotus ostreatus* *in vivo* in mice bearing melanoma B16-F0-GFP. In: *Proceedings of the SPIE vol. 5704. Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications III*, San José, California, USA. pp. 214-221.
- Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, Garcia N, Bermudez RC (2003) Immunomodulating effects of the hot water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micol. Apl. Int.* 15:7-13.
- Morris HJ, Carrillo O, Bermúdez RC, Lebeque Y, Fontaine R, Llauradó G, Beltrán Y. (2007) Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microbiol. Technol.* 40:456-460.
- Morris HJ, Carrillo OV, Llauradó G, Bermúdez RC. (2013) Taking advantage of malnourished mice: an animal model for evaluating the immunostimulatory potential of mushroom-derived food and pharmacological products. *Micol. Apl. Int.* 25:1-2 (Invited editorial)
- Patel, Y., Naraian, R. & Singh, V. K. (2012) Medicinal properties of *Pleurotus* species (Oyster Mushroom): a review. *World J. Fungal Plant Biol.* 3:1-12.
- Paulik S, Svrcec K, Mojzisoava, J, Durove A, Benisek Z, Huska M. (1996) The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed-hypersensitivity and phagocytic ability of blood leukocytes in mice. *J. Med. Vet. Biol.* 43:129-135.
- Pérez AS, Acevedo SA, Bibbins M, Galván J, Rosales S. (2015) A perspective on the use of *Pleurotus* for the development of convenient fungi-made oral subunit vaccines. *Vaccine* 33:25-33.
- Petrova R, Wasser SP, Mahajna JA, Denchev CM, Nevo E (2005) Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. *Int. J. Med. Mush.* 7:141-155.
- Pico M, Giraldino I, Otero A (1997) *Inmunología Experimental*. La Habana: Editorial Félix Varela.
- Prasad S, Rathore H, Sharma S, Yadav AS (2015) Medicinal Mushrooms as a Source of Novel Functional Food. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* 4(5):221-225.
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-a review. *Appetite* 51:456-467.
- Tirziu E, Rugea T, Nichita I, Cumpănăsoiu C, Gros RV, Șereș M (2009) Immunostimulant effect of fungal polysaccharides upon humoral immune response in broiler chickens. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară XLII*:340-345.
- Wasser SP. (2014) Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed. J.* 37:345-356.