

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE BIOPRODUCTOS OBTENIDOS DE LA SETA COMESTIBLE-MEDICINAL *PLEUROTUS OSTREATUS*

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL DEL RESULTADO. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente.

AUTORES PRINCIPALES. Dr. Humberto Joaquín Morris Quevedo¹, Dr. Gabriel Llauradó Maury¹, Dra. Rosa Catalina Bermúdez Savón¹, Dr. Paul Cos²

OTROS AUTORES. MSc. Yamila Lebeque Pérez¹, MSc. Yaixa Beltrán Delgado¹, MSc. Vivian Tamayo Ortega³, Lic. Onel Fong Lores⁴, MSc. Jane Marcos Albear⁴, Dra. Isabelle Gaime- Perraud⁵

FILICIACIONES

1. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba
2. Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias, Universidad de Amberes, Bélgica
3. Hospital Oncológico Provincial "Conrado Benítez", Santiago de Cuba, Cuba
4. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Santiago de Cuba, Cuba
5. Instituto Mediterráneo de Biodiversidad y Ecología Marina y Continental (IMBE), Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (IRD), Marsella, Francia

COLABORADORES: MSc. Gleymis Venet Cadet^a, Lic. Leodán Ferrera Gutiérrez^b, Dra. Nora García Oduardo^c, Lic. Rosa Isabel Aguirre Alcolea^c, MSc. Migdalia Serrano Alberni^c, Dra. Suyén Rodríguez Pérez^d, Dra. María Caridad Ramírez Arias^e, Dr. Serge Moukha^f, MSc. Miladis Camacho Pozo^c, MSc. Maira Bidart Macedo^g, Dr. Jan Gielis^g, Dr. Davie Cappoen^g, Dra. Anne Marie Farnet^h, Dr. Sevastianos Roussos^h, Lic. Lisandra Cutiño Viñalsⁱ, Lic. Javier Peña Lópezⁱ

FILIACIONES:

aUniversidad Médica de Santiago de Cuba, Cuba

bEmpresa Comercializadora y Distribuidora de Medicamentos (EMCOMED), Las Tunas, Cuba

cCentro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

dLaboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Centro de Inmunología Molecular (LABEX-CIM), Santiago de Cuba, Cuba

eHospital Clínico Quirúrgico “Dr. Juan Bruno Zayas”, Santiago de Cuba,

fLaboratorio de Toxicología e Higiene Aplicada, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Burdeos, Francia

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

hInstituto Mediterráneo de Biodiversidad y Ecología Marina y Continental (IMBE), Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (IRD), Marsella, Francia

iDepartamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Dr. Humberto Joaquín Morris Quevedo

Dirección postal: Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente.

Avenida Patricio Lumumba s/n. Reparto Jiménez, Santiago de Cuba 5. CP 90 500

Teléfono: 022-632095

E-mail: jquevedo@uo.edu.cu

RESUMEN

Antecedentes. Si bien en la actualidad, los hongos comestibles constituyen una fuente importante para la obtención de novedosas sustancias con propiedades inmunomoduladoras, sólo el 3% de la investigación de productos naturales que llega a etapas preclínicas y clínicas se enfoca a su estudio. En Cuba se ha promovido, por su valor nutricional, el consumo de setas del género *Pleurotus* (hongo ostra) dentro del programa de Agricultura Urbana. Sin embargo, por vez primera y como resultado del trabajo realizado durante quince años por un colectivo de investigadores del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la

Universidad de Oriente, en colaboración con varias entidades nacionales y extranjeras, se aportan en esta propuesta evidencias experimentales *in vitro* y en biomodelos experimentales de inmunodeficiencias secundarias, que sustentan el efecto modulador de bioproductos obtenidos de *Pleurotus* sp. sobre la respuesta inmunitaria

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo. La investigación

establece una ruta crítica con enfoques teóricos y prácticos novedosos como plataforma para evaluar el perfil inmunomodulador en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de biopreparados derivados del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*. Ello se reflejó en el desarrollo de formulaciones enriquecidas en metabolitos bioactivos con potenciales aplicaciones en la inmunoterapia y la inmunonutrición.

Resultados. Este trabajo permitió desarrollar un nuevo procedimiento para la obtención de preparados inmunocéuticos de *Pleurotus ostreatus* a partir de la extracción acuosa y/o secado de su biomasa, que dio lugar a una patente de invención y al registro de la marca NUTRISETAS. Dichos bioproductos mostraron en su composición, la presencia mayoritaria de carbohidratos (entre ellos del tipo β -glucanos) y proteínas, así como de diferentes metabolitos secundarios con potencial actividad biológica. Se informa por vez primera, el efecto polarizador de fracciones acuosas de *Pleurotus* hacia la activación del perfil de macrófagos M1 o proinflamatorios. La fracción acuosa obtenida del micelio por fermentación sumergida estimuló, además, la vía alternativa del sistema del complemento. Por otra parte, esta es la primera experiencia reportada con relación al efecto radioprotector de una fracción acuosa de *Pleurotus*, al evaluar el comportamiento de parámetros hematopoyéticos e inmunológicos en un biomodelo de inmunodeficiencia secundaria inducida por exposición a radiaciones ionizantes. Un resultado similar en cuanto a la estimulación de la respuesta humoral y celular se evidenció en ratones tratados con ciclofosfamida asociado a la administración profiláctica por vía oral de la preparación seca y pulverizada de cuerpos fructíferos. En este trabajo se demostró, además, el efecto inmunonutricional del extracto de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* en un modelo experimental de malnutrición proteico-energética. Los resultados evidenciados en la recuperación nutricional e inmunológica de ratones sometidos a un régimen de restricción dietética, constituyen un primer informe para preparados de hongos comestibles. En este sentido, la investigación incluyó el desarrollo de una metodología para obtener un modelo de malnutrición proteico-energética, que representa una herramienta valiosa que puede ser utilizada en el país en la evaluación de suplementos nutricionales y medicamentos. En su conjunto, los resultados de esta investigación abren nuevas oportunidades para el desarrollo de novedosos productos nacionales con posibilidades de registro y comercialización, lo cual posibilitaría su inclusión en el contexto de estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades del sistema inmunitario. El impacto científico de la propuesta está avalado por la publicación de 9 artículos en revistas de la web de ciencias directamente relacionados con el trabajo más otros 6 indexados en bases de prestigio internacional y dos capítulos de libros, la participación en 24 eventos científicos internacionales y la obtención de 8 premios universitarios, 4 provinciales, 4 nacionales y 2 internacionales. Los resultados obtenidos en este trabajo forman parte de 6 tesis de maestría y de una tesis de doctorado en Ciencias de la Salud defendida en el 2016.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

Antecedentes

La prevalencia de estados de inmunodeficiencias secundarias o adquiridas representa en la actualidad una preocupación, no solo en países en vías de desarrollo, sino también en aquellos con un alto desarrollo social. Las inmunodeficiencias secundarias se caracterizan por el deterioro de uno o varios componentes celulares y/o moleculares del sistema inmunitario, aumentando por tanto la susceptibilidad del organismo a contraer enfermedades infecciosas y al desarrollo de tumores. El cáncer, los efectos adversos de la quimio- y radioterapia, la malnutrición, el VIH-SIDA, los procesos quirúrgicos, las quemaduras graves, el estrés, etc., constituyen sus causas más frecuentes [1].

Por esta razón, se evidencia un creciente interés en la búsqueda de inmunomoduladores de origen natural, desprovistos de efectos secundarios severos, con aplicaciones en la inmunoterapia. En adición a las plantas, los hongos figuran entre las fuentes naturales más atractivas de compuestos con potencialidades farmacológicas, y desde tiempos inmemoriales han sido utilizados por diferentes civilizaciones en la medicina tradicional [2].

En este sentido, en la última década, la biotecnología de los hongos comestibles-medicinales ha devenido una opción atractiva para la obtención de extractos y biomoléculas con propiedades inmunomoduladoras y antitumorales. Sin embargo, sólo el 3% de la investigación de productos naturales que llega a etapas preclínicas y clínicas se enfoca al estudio de hongos, lo cual pone de manifiesto la relevancia de la “*micoterapia*” como un campo relativamente nuevo y prometedor [3].

El género *Pleurotus* (Pleurotaceae, Basidiomycota) figura entre los más investigados como fuente natural de compuestos bioactivos capaces de complementar o estimular una respuesta inmunológica deseada en el huésped. Dichos componentes comprenden sustancias de elevado peso molecular, principalmente polisacáridos del tipo β -(1,3)-(1,6)-D-glucanos, proteínas, proteoglicanos y complejos polisacárido-proteínas, así como diferentes metabolitos secundarios de bajo peso molecular. Estas sustancias modulan cascadas de señalización involucradas tanto en la respuesta innata: activación de células asesinas naturales (NK), neutrófilos, complemento, sistema monocito-macrófago, como en la inmunidad adaptativa: estimulación de la producción de anticuerpos por las células B y de la diferenciación de los linfocitos T colaboradores en sus perfiles Th1 y Th2, implicados en respuestas celulares y humorales, respectivamente [2, 4].

En Cuba se ha promovido, por su valor nutricional, la introducción, producción y consumo de setas del género *Pleurotus* (hongo ostra) en varias provincias dentro del programa de Agricultura Urbana [5]. Una de las principales direcciones de trabajo del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial en la región oriental del país, ha sido el desarrollo de proyectos relacionados con su cultivo y la obtención de nuevos productos de interés nutricional, funcional e inmunocéutico a partir de *P. ostreatus* con el empleo de la Fermentación en Estado Sólido (FES) sobre residuos agrícolas y la Fermentación Sumergida del micelio [6].

Aunque en los últimos años es evidente el avance en las investigaciones llevadas a cabo en *Pleurotus* con fines medicinales, aún existen diversos aspectos en que se requiere

profundizar, como son: los procedimientos de extracción empleados, el mecanismo de acción de los bioproductos y el posible papel sinérgico de las moléculas bioactivas. Otra área no explorada es el papel de *Pleurotus* en la modulación del sistema inmune asociado a intervenciones nutricionales, principal objetivo de la "inmunonutrición" [7]. Ello abre nuevas interrogantes y sustenta presentes y futuras investigaciones. Tomando en consideración estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos inmunomoduladores de bioproductos obtenidos de la seta *Pleurotus ostreatus in vitro* y en biomodelos experimentales de inmunodeficiencias secundarias.

RESULTADOS

La investigación establece una ruta crítica con enfoques teóricos y prácticos novedosos como plataforma para evaluar el perfil inmunomodulador de biopreparados derivados del micelio y cuerpos fructíferos de *Pleurotus*. Ello se reflejó en el desarrollo de formulaciones enriquecidas en metabolitos bioactivos con potenciales aplicaciones en la inmunoterapia y la inmunonutrición: dos preparaciones de cuerpos fructíferos (un extracto acuoso -CW-E- obtenido a bajas temperaturas, y la biomasa seca y pulverizada como materia prima de tabletas de 500 mg, suplemento nutricional actualmente en desarrollo) y un extracto acuoso de micelio obtenido a altas temperaturas (Myc-E).

En la literatura no se refieren soluciones análogas relacionadas con procedimientos para la obtención a partir de *Pleurotus spp.* de preparados con actividad inmunocéutica. Ello dio lugar a una patente de invención y al registro de la marca NUTRISETAS [8, 9]. El procedimiento que se desarrolla en condiciones controladas es escalable y factible técnicamente. El preparado inmunocéutico es, además, susceptible de ser fraccionado con incrementos en su actividad y homogeneidad. Los estudios de toxicidad aguda oral y a dosis repetidas no evidenciaron alteraciones en los signos clínicos y parámetros bioquímicos de los animales, lo que permite considerar a los productos como potencialmente no tóxicos [10].

La determinación de los componentes mayoritarios en los bioproductos representó el criterio de partida para la evaluación preclínica de sus propiedades inmunomoduladoras. Los extractos acuosos del micelio y cuerpos fructíferos, así como la preparación seca pulverizada, mostraron en su composición un predominio de carbohidratos y proteínas, con valores de 36-70% y 15-30%, respectivamente, dentro de los límites referidos para las setas comestibles-medicinales. La presencia en la fracción de polisacáridos de estructuras tipo β -1,3-1,6-glucanos, las de mayor actividad biológica, podría fundamentar potenciales aplicaciones en la inmunoterapia. El estudio evidenció, además, la existencia de metabolitos secundarios como triterpenos, quinonas y flavonoides que podrían exhibir actividad inmunomoduladora, antitumoral y antioxidante [5, 11, 12].

De forma general, los estudios *in vitro* mostraron que el extracto de micelio Myc-E (50-100 μ g/pozo de placas de cultivo) ejerció un efecto activador en macrófagos peritoneales murinos, evidenciado en el incremento del consumo de glucosa (1.8-2.9 veces) y la actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal (133-184%) respecto a controles sin el extracto. El efecto dosis-dependiente evidenciado en el aumento de la actividad enzimática, sugiere la presencia de compuestos capaces de unirse a receptores en la superficie del macrófago, como los β -glucanos [13, 14]. Se observó, además, un incremento en la

expresión del gen de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7. En este sentido, el presente estudio constituye un primer reporte sobre el efecto polarizador de extractos de *Pleurotus* hacia el perfil de macrófagos M1 o pro-inflamatorios, que juegan una función importante en la defensa del hospedero y exhiben actividad citotóxica contra células tumorales [10]. Myc-E estimuló, además, la vía alternativa del sistema del complemento, aspecto poco abordado en los hongos comestibles [14].

Desde una perspectiva clínica, las nuevas tecnologías de obtención de productos inmunocéuticos a partir de hongos comestibles podrían aportar soluciones a muchos aspectos de la inmunoterapia. Por esta razón, el trabajo se completó con la evaluación de los efectos inmunomoduladores que produciría la administración de los preparados de *Pleurotus* en tres modelos de inmunodeficiencias secundarias: (i) ratones BALB/c inmunodeprimidos con ciclofosfamida (CY), (ii) ratones BALB/c inmunodeprimidos por exposición a radiaciones ionizantes, y (iii) ratones BALB/c malnutridos, lo que aportó los primeros elementos relacionados con su mecanismo de acción *in vivo*.

La administración de Myc-E durante 7 días (100 mg/kg, vía intraperitoneal) a ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida (CY), fármaco usado comúnmente en la terapia del cáncer, estuvo asociada a una inmunosupresión menos pronunciada y a una recuperación hematopoyética más rápida. Ello se reflejó en un incremento en la celularidad de la médula ósea, los conteos leucocitarios en sangre periférica y la estimulación de la actividad *in vivo* del sistema monocito-macrófago [15].

Resultados similares fueron informados al administrar dicho extracto en régimen profiláctico a ratones BALB/c irradiados, lo que aporta novedosas evidencias en cuanto al efecto radioprotector de los bioproductos de *Pleurotus* spp. [16]. Estos hallazgos se asocian a la estimulación por componentes presentes en los extractos de la maduración, diferenciación y proliferación de diferentes poblaciones celulares de las líneas mieloide y linfoide, mediado por citosinas hematopoyéticas, como los factores estimulantes de colonias (CSF).

Por su parte, la administración oral en régimen profiláctico de una preparación seca de cuerpos fructíferos de *Pleurotus*, favoreció la síntesis de la fracción globulínica y estimuló la inmunidad celular en ratones BALB/c inmunodeprimidos con CY. La respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) antígeno-específica medida a las 48 y 72 h resultó similar a los animales sin tratamiento inmunosupresor, y estuvo asociada a un incremento en el índice de masa de los linfonodos poplíteos. Este resultado sugiere un efecto estimulador del preparado sobre la respuesta inmune mediada por células T (CD4⁺Th1). Se evidenció, además, la estimulación de la respuesta linfoproliferativa de esplenocitos inducida por extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir del polvo de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* [11, 17]. En virtud de sus propiedades regenerativas a nivel celular, atenuando los efectos secundarios derivados de los tratamientos convencionales contra el cáncer, estos bioproductos podrían constituir una alternativa de origen natural para la recuperación de pacientes sometidos a regímenes agresivos de quimioterapia, radioterapia y cirugías.

Otra línea de investigación de gran relevancia actual es la inmunonutrición, considerada un

área interdisciplinaria muy promisoría como coadyuvante de la función gastrointestinal, la inmunidad celular y los procesos inflamatorios. La investigación incluyó el desarrollo de una metodología para obtener un modelo de malnutrición que representa una herramienta valiosa para la evaluación de suplementos nutricionales y medicamentos en el país [18]. La administración oral durante ocho días del extracto acuoso de cuerpos fructíferos (CW-E) (100 mg/kg) a ratones BALB/c malnutridos, ejerció efectos inmunonutricionales a través de la recuperación de la función hepática y la inducción de los procesos de síntesis celular en la mucosa intestinal. CW-E restableció, además, la actividad hematopoyética, la funcionalidad de macrófagos y las respuestas inmune humoral y celular, en términos de los títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero y la reacción de hipersensibilidad retardada (HR), respectivamente [7]. Estos resultados constituyen un primer informe para preparados de hongos comestibles, y podrían contribuir al desarrollo de nuevos soportes inmunonutricionales basados en bioproductos de *Pleurotus*.

En su conjunto, la figura 1 ofrece una propuesta de mecanismo de acción sinérgico para los mico- compuestos presentes en los bioproductos derivados de *Pleurotus*.

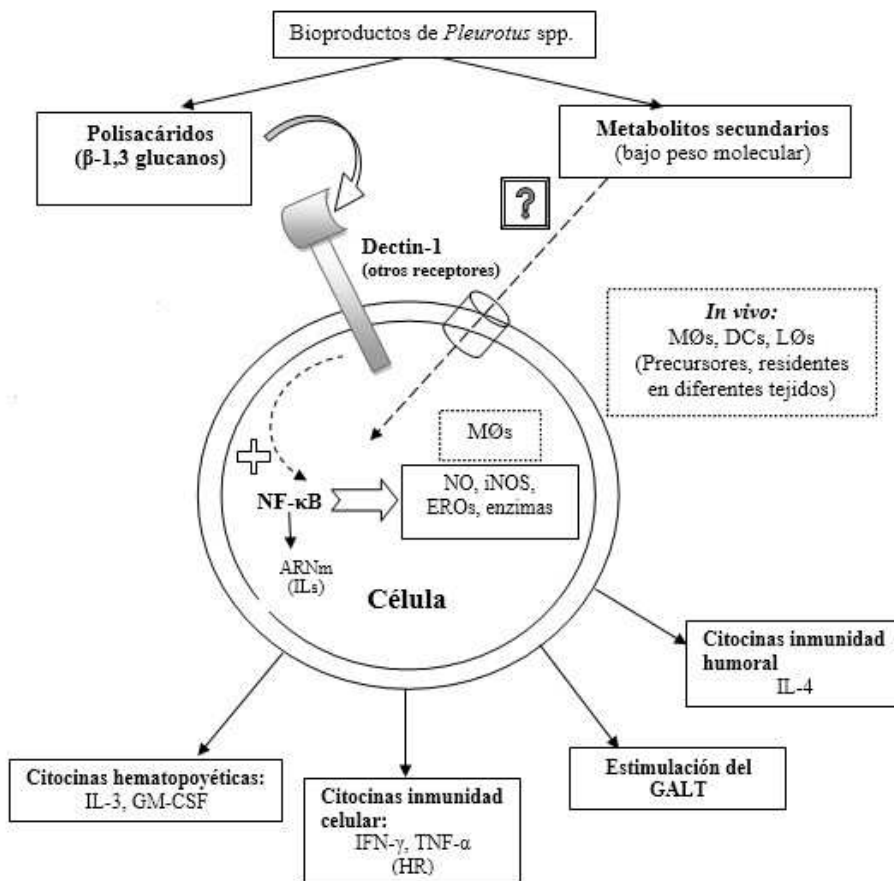


Figura 1. Propuesta de mecanismo de acción para los mico-compuestos presentes en bioproductos inmunocéuticos derivados de *Pleurotus* spp. (Adaptado de [10]).

Leyenda: MØs: macrófagos, DCs: células dendríticas, LØs: linfocitos, EROs especies reactivas del oxígeno, HR: hipersensibilidad retardada, NO: óxido nítrico, iNOS: óxido nítrico sintasa, IL-3: interleucina 3, IL-4: interleucina 4, GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocito-macrófago, IFN- γ : interferón gamma, TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, GALT: tejido linfoide asociado al intestino

ORIGINALIDAD E IMPACTO DEL RESULTADO

Se obtuvieron biopreparados inmunocéuticos a partir de la extracción acuosa y/o secado de la biomasa micelial y de cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, ofreciendo elementos esenciales para la formulación de productos con actividad inmunomoduladora. La importancia teórica del trabajo radica en el aporte de nuevos conocimientos para la comprensión del perfil inmunomodulador de bioproductos de setas *Pleurotus*, los que permiten consolidar la idea de dicho hongo como fuente de una naciente generación de bioterapéuticos. Desde el punto de vista práctico, los preparados podrían tener un amplio espectro de uso en las industrias alimentaria y médico-farmacéutica en la formulación de nuevos productos nacionales (alimentos funcionales y para regímenes especiales, suplementos dietéticos y fármacos) con posibilidades de registro y comercialización. Ello posibilitaría su inclusión en el contexto de estrategias de prevención y tratamiento del cáncer y enfermedades del sistema inmunitario con repercusiones sociales y económicas.

REFERENCIAS

- [1] Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th Ed. London: Garland Science; 2016.
- [2] Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Bermúdez RC, García N, Gaime-Perraud I, Moukha S. The use of mushrooms in the development of functional foods, drugs and nutraceuticals. *En: Ferreira I, Barros L, Morales P (Eds) Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications*. John Wiley and Sons, Ltd.; 2017. p. 123-157.
- [3] Wasser SP Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed. J.* 2014;37:345-356.
- [4] Oloke JK, Adebayo EA Effectiveness of immunotherapies from oyster mushroom (*Pleurotus species*) in the management of immunocompromised patients. *Int. J. Immunol.* 2015;3:8-20.
- [5] Morris HJ, Bermudez RC, Llaurado G, Beltran Y, Garcia N Mushroom science in Cuba: towards new opportunities for developing functional foods/nutraceuticals. *In: Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8)*. New Delhi, India; 2014. p. 422-432.
- [6] Morris HJ, Llauradó G, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, García N, Gutiérrez A

Productos inmunocéuticos derivados del hongo comestible-medicinal *Pleurotus* sp. cultivado sobre pulpa de café en Cuba. En: Sánchez JE, Mata G (Eds) *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. Tapachula, Chiapas: El Colegio de la Frontera Sur; 2012. p. 309-318.

[7] Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Venet G, Fong O, Marcos J, Fontaine R, Cos P, Bermúdez RC. Oral administration of an aqueous extract from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* enhances the immunonutritional recovery of malnourished mice. *Biomed. Pharmacother.* 2016; 83:1456-1463

[8] Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y. Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Rodríguez S, inventores; Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus* spp. Patente Cubana 23717. 2011 Jul 19.

[9] Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Certificado de Registro de Marca NUTRISETAS. Certificado número 2010-0554. 2012 Jun 5.

[10] Llauradó G. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de bioproductos obtenidos de la seta comestible

Pleurotus sp. [Tesis Doctoral en Ciencias de la Salud] Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2016.

[11] Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Gutiérrez A, Fontaine R, Bermúdez RC, Gaime-Perraud I. Phytochemical screening and effects on cell-mediated immune response of *Pleurotus* fruiting bodies powder. *Food Agric. Immunol.* 2013;24:295-304.

[12] Morris HJ, Beltrán Y, Llauradó G, Batista PL, Perraud-Gaime I, García N, Moukha S, Bermúdez RC, Cos P, Hernández E, Díez JC. Mycelia from *Pleurotus* sp. (oyster mushroom): a new wave of antimicrobials, anticancer and antioxidant bio-ingredients. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients.* 2017;4:03

[13] Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Llauradó G, Marcos J. A note on the *in vitro*

macrophage-stimulating activity of water-soluble extracts from mycelium of *Pleurotus* sp. *Food Agric. Immunol.*

2007;18:31-37.

[14] Llauradó G, Morris HJ, Ferrera L, Camacho M, Castán L, Lebeque Y, Beltrán Y, Cos P, Bermúdez RC. *In-vitro* antimicrobial activity and complement/macrophage stimulating effects of a hot-water extract from mycelium of the oyster mushroom *Pleurotus* sp. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2015;30:177-183

[15] Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, Garcia N. Immunomodulating effects of hot water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micol. Apl. Int.* 2003;15:7-13.

[16] Llauradó G, Morris HJ, Tamayo V, Lebeque Y, Beltrán Y, Marcos J, Moukha S, Creppy E, Bermúdez RC. Haematopoiesis radioprotection in Balb/c mice by an aqueous mycelium

extract from the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Nat. Prod. Res.* 2015;29:1557-1561.

[17] Morris HJ, Llauradó G, Gutiérrez A, Lebeque Y, Fontaine R, Beltrán Y, García N, Bermúdez RC, Gaime- Perraud I Immunomodulating properties of *Pleurotus* sp. fruiting bodies powder on cyclophosphamide treated mice. *In: Savoie JM, Foulongne-Oriol M, Largeteau M (eds) Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*, vol. 1. Arcachon, France; 2011. p 329-338.

[18] Morris HJ, Carrillo OV, Llauradó G, Alonso ME, Bermúdez RC, Lebeque Y, Fontaine R, Soria NE, Venet G. Effect of starvation and refeeding on biochemical and immunological status of Balb/c mice: an experimental model of protein-energy malnutrition. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2011;33(3):438-446.