

Título: Péptidos funcionales: ¿una contribución adicional al efecto inmunomodulador de los hongos comestibles-medicinales?

Autores: Dr.C. Humberto Joaquín Morris Quevedo¹ (hmorris@cebi.uo.edu.cu), MSc. Gabriel Llauradó Maury¹, Dra.C. Olimpia Carrillo Farnés², Lic. Yamila Lebeque Pérez¹, MSc. Yaixa Beltrán Delgado³, Téc. Roberto Fontaine Álvarez¹, Dra.C. Rosa Catalina Bermúdez Savón¹

Centro de procedencia de los autores:

¹Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 5, CP 90500, Cuba.

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 25 e/J e I. Vedado, Habana 4, CP 10400, Cuba.

³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente. Avenida Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba 5, CP 90500, Cuba.

PREMIO EN LA INSTANCIA PROVINCIAL DEL CONCURSO, AÑO 2013. CATEGORÍA TEORÍA CIENTÍFICA

Resumen

Los hongos comestibles comprenden numerosas especies que han sido empleadas por diferentes civilizaciones como alimento y adicionalmente, por sus propiedades medicinales. Se destaca dentro de su potencial farmacológico la modulación del sistema inmune, y la inhibición del crecimiento tumoral y la inflamación. Estos efectos han sido atribuidos fundamentalmente a la presencia de polisacáridos con estructura tipo β -1,3-1,6-glucanos, obtenidos generalmente mediante tratamiento térmico a elevadas temperaturas. La contribución de otras biomoléculas -como péptidos y proteínas- a la actividad inmunomoduladora de productos derivados de los hongos comestibles-medicinales ha sido poco abordada en las investigaciones del tema. El concepto de que los péptidos presentes en las proteínas dietéticas, una vez liberados en el tracto digestivo por las enzimas proteolíticas, pueden ejercer un espectro amplio de funciones biológicas se considera de especial importancia en la actualidad. En el presente trabajo se fundamenta por vez primera la posible contribución de *péptidos funcionales* al efecto

inmunomodulador de preparaciones derivadas de hongos comestibles-medicinales. Dicha teoría se confirmó parcialmente a través de la evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de un extracto del hongo *Pleurotus* sp. obtenido a bajas temperaturas (35% de proteínas) en un biomodelo de malnutrición proteico-energética. En adición al aporte teórico del trabajo, el mismo podría resultar de interés en la investigación de los efectos de suplementos nutricionales y productos biofarmacéuticos de hongos comestibles-medicinales con novedosas aplicaciones en la inmunonutrición y la inmunofarmacología.

Introducción:

La idea de modular funciones metabólicas por medio de la alimentación para obtener un impacto en la salud, no es un concepto nuevo. Sin embargo, el interés en explotar más ampliamente este potencial, y su manejo científico tienen un carácter novedoso^{1, 2}.

En este sentido, el cultivo de los hongos comestibles se ha incrementado significativamente a nivel internacional en las últimas décadas. Su popularidad se ha expandido debido a la facilidad de su cultivo, la posibilidad de emplear diversos sustratos, el elevado rendimiento y su alto valor nutricional^{3, 4}. Entre los numerosos géneros utilizados desde tiempos inmemoriales, los más conocidos son: *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Flammulina*, *Grifola*, *Ganoderma*, *Trametes*, entre otros^{5, 6}. Ellos representan una fuente valiosa de nutrientes y contienen también, diversos compuestos biológicamente activos con efectos terapéuticos^{7, 8}.

Los conocimientos actuales sobre el papel de los productos obtenidos de los hongos comestibles en la profilaxis y tratamiento de diversas enfermedades se encuentran aún en gran medida a un nivel empírico. Estudios recientes en diferentes especies han evidenciado su considerable potencial farmacológico que comprende: la modulación del sistema inmune, la inhibición del crecimiento tumoral y la inflamación, la actividad hipoglicemiante y antitrombótica, la disminución de las concentraciones de lípidos séricos, la prevención de la hipertensión arterial y la aterosclerosis, así como los efectos antioxidantes, antimicrobianos y antivirales, entre otros^{9, 10}.

Los hongos comestibles constituyen una fuente de compuestos “*potenciadores de la defensa del huésped*” por su actividad estimuladora del sistema inmune^{11,12}. Diversas sustancias con efecto inmunoestimulante han sido aisladas del micelio y cuerpos fructíferos de estos organismos, fundamentalmente polisacáridos con estructura tipo β -1,3-1,6-glucanos, obtenidos generalmente mediante tratamiento térmico a elevadas temperaturas^{13,14}. Estos compuestos estimulan diferentes poblaciones celulares como macrófagos, células NK (*Natural Killer*), linfocitos e inducen la síntesis de citocinas^{10,15}. Sin embargo, la contribución de otras biomoléculas -como péptidos y proteínas- a dicha actividad ha sido poco abordada en las investigaciones del tema.

En Cuba, el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) desarrolla proyectos relacionados con la evaluación de las propiedades inmunofarmacológicas de bioproductos de *Pleurotus* (hongo ostra u oreja), fundamentalmente de extractos acuosos^{16,17}. Los resultados obtenidos en la evaluación de un extracto acuoso de *Pleurotus* tratado a altas temperaturas evidenciaron un efecto modulador en la hemopoyesis en ratones inmunocompetentes¹⁸. Asimismo, ejerció un efecto inmunopotenciador en ratones Balb/c inmunodeficientes como consecuencia del tratamiento con ciclofosfamida¹⁹ o la exposición a radiaciones ionizantes²⁰.

Si bien las investigaciones acerca de los efectos fisiológicos de los hongos comestibles-medicinales se han realizado con extractos acuosos obtenidos por tratamiento térmico, para aplicaciones inmunonutricionales resulta de gran importancia preservar la integridad de vitaminas, aminoácidos y proteínas que son biomoléculas termolábiles. Entre los múltiples nutrientes y compuestos de la dieta que poseen acción inmunoestimuladora (“*inmunonutrientes*”) se destacan algunos péptidos derivados de diferentes proteínas de la dieta, como la caseína y la soya^{21, 22}.

El presente trabajo introduce el enfoque novedoso de la posible contribución de *péptidos funcionales* al efecto inmunomodulador de preparaciones derivadas de hongos comestibles, teoría que será confirmada parcialmente a través de la evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de un extracto de *Pleurotus* obtenido a bajas temperaturas (35% de proteínas) en un biomodelo de malnutrición.

Consideraciones generales acerca de los péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivas dentro de la proteína intacta. Estas secuencias pueden ser liberadas durante la digestión de los alimentos o mediante hidrólisis enzimática (figura 1), ejerciendo diversos efectos beneficiosos para la salud (tabla 1)^{22, 23}. Aunque se han encontrado en proteínas animales y vegetales, los de la leche han sido los más estudiados²⁴.

Un aporte significativo al conocimiento del papel de los péptidos funcionales en la salud humana, ha sido el hallazgo de péptidos originados a partir de las proteínas alimentarias y de hidrolizados de naturaleza diversa, los que ejercen un efecto inmunomodulador. Los hidrolizados proteicos y los péptidos purificados pueden modular las respuestas inmunológicas; sin embargo, la identidad de las células blanco y las funciones específicas en que están involucrados son pobremente comprendidas^{25, 26}.

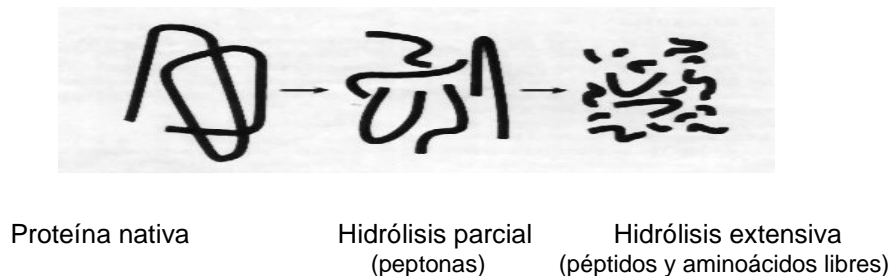


Figura 1. Etapas de la hidrólisis enzimática de una proteína nativa.

Los primeros informes en el tema refieren el aislamiento de fracciones a partir de la soya y la identificación de péptidos inmunoestimulantes con las secuencias Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr, Ile-Gln-Gln-Gly-Asn y Ser-Gly-Phe-Ala-Pro²⁷. Otras direcciones de trabajo surgieron a partir de la purificación y caracterización de nuevos péptidos con propiedades antimicrobianas e inmunoestimulantes, obtenidos como resultado de la hidrólisis de la caseína con quimosina (“isracidina” y “casecidina”)²⁸.

Tabla 1. Efectos beneficiosos de los péptidos bioactivos en el organismo.

Acción farmacológica	Efecto beneficioso para el organismo
Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina	Antihipertensivo, reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidante	Prevención de enfermedades degenerativas y del envejecimiento
Hipocolesterolémica	Disminución de los niveles de colesterol en sangre, reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Inmunomoduladora	Estimulación de la respuesta inmunológica
Anticoagulante	Reducción de los riesgos de formación de trombos
Regulación del tránsito intestinal	Favorecen la digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes
Regulación de la proliferación celular	Reducción de la proliferación de las células tumorales
Antimicrobiana	Disminución del riesgo de infecciones
Quelante	Promoción de la absorción de minerales

Según refieren Kazlauskaitè *et al.*²⁹, la administración oral de un hidrolizado de caseína durante cinco días a ratones en dosis de 1 mg/g, potenció la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y fagocitos de la sangre, con índices de estimulación de 1,39 y 1,34, respectivamente. Por su parte, el tratamiento de ratones Balb/c con un suplemento oral formulado con un hidrolizado comercial de pescado (Seacure®) incrementó significativamente los niveles de interleuquinas 4, 6 y 10, y el número de células secretoras de IgA (inmunoglobulina A) en la lámina propia del intestino delgado³⁰.

Morris *et al.*³¹ informaron que un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* moduló eficientemente la recuperación inmunológica de ratones Balb/c malnutridos, a través de la estimulación de la actividad hematopoyética de la médula ósea, del estado funcional del sistema monocito-macrófago, así como de la respuesta humoral y celular, en términos de los títulos de anticuerpos y la inducción de reacción de hipersensibilidad retardada, respectivamente.

En la literatura consultada hasta la fecha, no se han encontrado evidencias experimentales relacionadas con las propiedades inmunomoduladoras de péptidos bioactivos e hidrolizados proteicos de hongos comestibles-medicinales. Por otra parte, son limitadas las referencias acerca del efecto inmunomodulador de las proteínas fúngicas nativas y se basan en ensayos de estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humana^{32, 33}.

La teoría y su confirmación parcial

Los resultados de nuestro laboratorio han demostrado los efectos inmunomoduladores *in vivo* de extractos de *Pleurotus* obtenidos a altas temperaturas, sugiriendo que los mismos pudieran atribuirse al componente polisacárido termoestable. Ello ha sido corroborado en ensayos de estimulación *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos por fracciones derivadas del extracto primario enriquecidas en polisacáridos³⁴.

Sin embargo, cabría suponer en el caso de los preparados obtenidos en condiciones protectoras de las sustancias termolábiles, *una contribución adicional de la fracción proteica al efecto inmunomodulador que presumiblemente estuviese mediado por la presencia de péptidos bioactivos encriptados en la estructura primaria de la proteína y liberados como resultado de la hidrólisis enzimática que tiene lugar en el tracto digestivo tras ser administrados por vía oral.*

Se ha demostrado la absorción de péptidos intactos en la mucosa intestinal. Además de la ruta paracelular, se ha postulado la ocurrencia de un mecanismo endocítico a nivel de las células M en las placas de Peyer. Estas células transportan los péptidos desde la luz intestinal hasta los tejidos subepiteliales³⁵.

Para la confirmación parcial de esta teoría (*efecto inmunomodulador del componente proteico de hongos comestibles-medicinales*) se preparó un extracto acuoso de *Pleurotus* obtenido a bajas temperaturas (CW-E). La extracción se realizó durante 3 horas a la temperatura de 20°C, a diferencia de los extractos anteriormente evaluados obtenidos mediante decocción durante 10 h a 90-95°C. La extracción acuosa de los cuerpos fructíferos a bajas temperaturas preservó la integridad de las proteínas y de las moléculas termolábiles presentes en el hongo y el extracto presentó un 35% de proteínas³⁶. Se diseñó un experimento para evaluar los efectos de la administración del extracto CW-E a ratones malnutridos, en el que 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 (100 mg/kg). 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. Se consideraron los siguientes parámetros: conteo de leucocitos totales en sangre periférica, actividad del sistema monocito-macrófago mediante la prueba de aclaramiento de partículas de carbón coloidal en sangre periférica, la inmunidad humoral mediante un esquema de inmunización con eritrocitos de carnero como antígeno modelo y la inmunidad celular a través del ensayo de hipersensibilidad retardada (HR) empleando como antígeno seroalbúmina bovina (BSA)³⁷.

El grupo suplementado con CW-E mostró un incremento estadísticamente significativo en el conteo de leucocitos totales con relación al control, pero dentro del intervalo de valores considerados como normales para la especie ($6-17 \times 10^9/\text{mL}$) ($P < 0.05$) (Figura 2). Este resultado permite suponer un efecto modulador de los componentes presentes en el extracto sobre la hemopoyesis.

La actividad de los macrófagos esplénicos y las células de Kupffer se evaluó por la prueba de aclaramiento del carbón coloidal, índice de la actividad fagocítica del hígado y bazo. Administrado oralmente a la dosis de 100 mg/kg, CW-E estimuló la actividad del sistema monocito-macrófago, a juzgar por el tiempo de vida media en sangre del carbón coloidal, significativamente menor a los 5 min ($P < 0,01$) (Tabla 2).

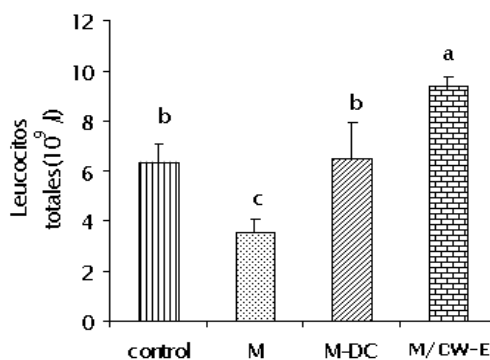


Figura 2. Conteo de leucocitos totales en los diferentes tratamientos experimentales. Los leucocitos se expresan en ($10^9/\text{L}$). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple acoplado a la prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Tabla 2. Aclaramiento de las partículas de carbón coloidal en los grupos experimentales alimentados luego de la depleción nutricional con la dieta convencional (M-DC) y suplementados adicionalmente con CW-E.

	M-DC	M/CW-E
Relación de Absorbancias a los 5 min. (A 675 nm grupo experimental /A 675 nm grupo control sin administración)	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1*

Los valores representan las medias ± la desviación estándar de cada grupo.

(*) Diferencias significativas en la prueba de la *t* de Student ($P < 0.01$).

Aunque se conoce que la respuesta celular y la función de los linfocitos T son las más afectadas en estados de malnutrición, reviste importancia la evaluación de la inmunidad humoral, pues la deficiencia proteica ocasiona una disminución en la síntesis de proteínas vinculadas con los mecanismos de defensa. Los títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero a los catorce días en los animales suplementados con CW-E fueron superiores respecto a los del grupo M-DC, aunque inferiores al control ($p < 0,05$) (Figura 3). 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.

Los ratones que recibieron como suplemento el extracto CW-E mostraron una respuesta de HR superior a la de los grupos M-DC y control a las primeras 24 horas (Figura 4).

Este resultado sugiere un efecto estimulador del extracto de *Pleurotus* sobre la respuesta inmune mediada por células T (CD4+ Th1).

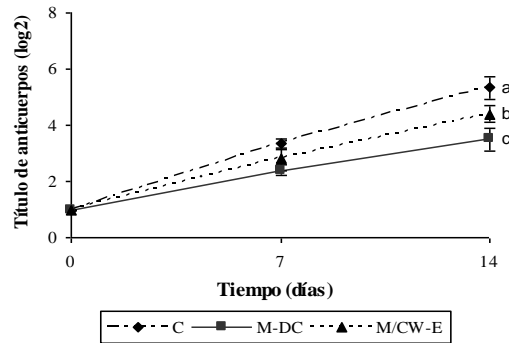


Figura 3. Títulos de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero en ratones Balb/c malnutridos y suplementados o no con el extracto CW-E de *Pleurotus* durante el período de repleción. Los resultados se presentan como el valor medio en cada grupo \pm DE (n= 5). Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA de clasificación simple, Tukey, $p < 0,05$).

La teoría enunciada es sustentada por las evidencias experimentales obtenidas. Es posible presuponer que la activación de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune ocurra en respuesta a péptidos inmunomoduladores derivados de la proteína fúngica, producto de señales resultantes del tejido linfoide asociado a mucosas en el tracto gastrointestinal (la administración del extracto CW-E propició la restauración de la integridad funcional de la mucosa intestinal, resultado no mostrado). Esto representa un enfoque novedoso para explicar la actividad inmunomoduladora observada en bioproductos de hongos comestibles-medicinales y que complementaría el efecto de los polisacáridos tipo β -glucanos. La identificación y liberación controlada por hidrólisis enzimática de péptidos bioactivos, podría conducir al desarrollo de preparaciones con la actividad biológica “oculta” en la secuencia aminoacídica de la proteína²². Este análisis se informa por primera vez para los hongos comestibles-medicinales, y pudiera ser considerado como la extensión de una hipótesis propuesta por los autores para explicar los efectos inmunoestimulantes de suplementos de microalgas³⁸.

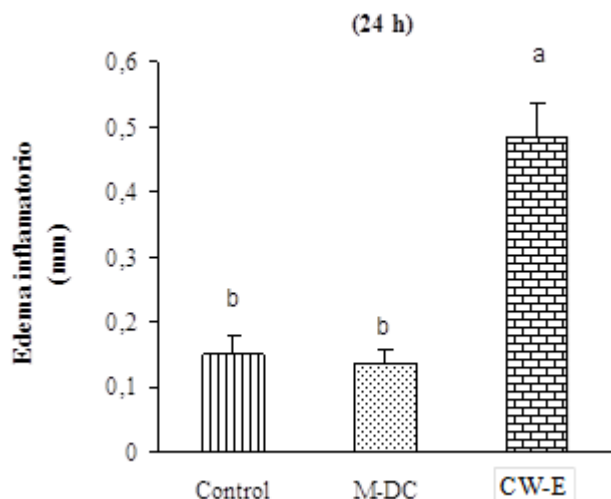


Figura 4. Respuesta de hipersensibilidad retardada (HR) en ratones Balb/c malnutridos y suplementados o no con el extracto CW-E de *Pleurotus* durante el período de depleción.

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

Estrategias futuras para la confirmación de la teoría

En virtud del interés científico, tecnológico y comercial suscitado por las propiedades biofuncionales de los péptidos³⁹, se abren nuevas oportunidades para la investigación de las proteínas presentes en los hongos comestibles-medicinales y las secuencias peptídicas en ellas “ocultas”. Una línea de particular relevancia es la modulación del sistema inmune por estos biopéptidos con vistas al desarrollo de fármacos de nueva generación con potenciales aplicaciones en el tratamiento del cáncer, las inmunodeficiencias y las enfermedades autoinmunes. En consecuencia, las investigaciones futuras deben encaminarse a la caracterización de las proteínas y péptidos a partir de las especies cultivadas internacionalmente, mediante estrategias integradas que contemplen el empleo de métodos químicos y biotecnológicos, incluidas las técnicas de biología molecular. Por otra parte, los estudios predictivos *in silico* con herramientas bioinformáticas podrían acelerar el descubrimiento de nuevas entidades moleculares y contribuir a “mejorar” el diseño de los péptidos ya existentes⁴⁰.

Conclusiones:

Se fundamentó por vez primera la posible contribución de *péptidos funcionales* al efecto inmunomodulador de biopreparados de hongos comestibles-medicinales. Dicha teoría se

confirmó parcialmente a través de la evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de un extracto de *Pleurotus* obtenido a bajas temperaturas (35% de proteínas) en un biomodelo de malnutrición. En adición al aporte teórico del trabajo, el mismo podría resultar de interés en la investigación de los efectos de suplementos nutricionales y productos biofarmacéuticos de hongos comestibles-medicinales con novedosas aplicaciones en la inmunonutrición y la inmunofarmacología. Se precisan estudios perspectivas encaminados a la identificación de las secuencias peptídicas y la realización de análisis predictivos de su actividad biológica.

Referencias bibliográficas

1. Ashwell M. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. Washington DC: ILSI Press; 2004.
 2. Kim YS, Milner JA. Bioactive Food Components and Cancer-Specific Metabonomic Profiles. J Biomed Biotechnol; 2011,doi:10.1155/2011/721213.
 3. Martínez-Carrera D, López-Martínez de Alva L Historia del cultivo comercial de hongos comestibles en México II: éxitos y fracasos durante el período 1991-2009. En: Martínez-Carrera D, Curvetto N, Sobal M, editores. Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Puebla, México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-UAEM-IMINAP (en prensa, 2011).
 4. Sánchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol 2010;85:1321-37.
 5. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. Int J Med Mush 2010;12:1-16.
 6. Sánchez JE, Mata G. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. El Colegio de la Frontera Sur, Instituto de Ecología, Tapachula Chiapas. ISBN 978-607-7637-73-8. (On line first). <http://200.23.34.14/sibe/#getbook:52225>; 2012
 7. Kalac P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. Food Chem;2009;113:9–16.
 8. Llauradó G, Morris HJ, Marcos J, Castán L, Bermúdez RC. Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. Rev Cubana Invest Biomed 2011;30(4). Disponible en URL: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol30_4_11/
-

9. Lindequist U, Niedermeyer TH, Julich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:285-99.
 10. Gregori A, Švagel M, Pohleven J. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol Biotechnol* 2007;45:238-49.
 11. Bush JA, Watkin JE. The beneficial effects of mushrooms. A preventive and adjuvant therapeutic strategy against cancer. 2007. Disponible en URL: <http://www.biomedicallabs.com> (August 21, 2007).
 12. Petrova R, Wasser SP, Mahajna JA, Denchev CM, Nevo E. Potential role of medicinal mushrooms in breast cancer treatment: current knowledge and future perspectives. *Int J Med Mush* 2005;7:141-55.
 13. Ramberg JE, Nelson ED, Sinnott RA. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutr J* 2010;9(54):1-22.
 14. Thompson IJ, Oyston PCF, Williamson DE. Potential of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(3):339-52.
 15. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Micol Res* 2007;III:635-52.
 16. Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Rodríguez S. Procedimiento para la obtención de un preparado inmunocéutico de *Pleurotus* spp. Certificado No. 23717;2011 (Resolución 1754/2011) Ref: 2011/1337.
 17. 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* 2012 (article in press, <http://dx.doi.org/10.1080/09540105.2012.686988>).
 18. 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, editores. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. Tapachula, Chiapas:El Colegio de la Frontera Sur, Instituto de Ecología; 2012. On line first: <http://200.23.34.14/sibe/#getbook:52225>.
 19. Morris HJ, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Tamayo V, García N, Bermúdez RC. Immunomodulating effects of hot-water extract from *Pleurotus ostreatus* mycelium on cyclophosphamide treated mice. *Micol Apl Int* 2003;15(1):7-13.
-

20. Morris HJ, Lebeque Y, Marcos J, Llauradó G, Fontaine R, Bermúdez RC, Beltrán Y, García N, Tamayo V. Preliminary characterization and radioprotective effects of aqueous extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Comunicaciones cortas 17 Conferencia de Química*. Santiago de Cuba, Diciembre 4-6. ISBN 959-207-063-0.
 21. Satyaraj E. Emerging paradigm in immunonutrition. *Topics Companion Animal Med* doi:10.1053/j.tcam.2011.01.004.
 22. Zambrowicz A, Timmer M, Polanowski A, Lubec G, Trziszka T. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids* 2013;44:315–20.
 23. Hartman R, Miesel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:163–9.
 24. Wagar LE, Champagne CP, Buckley ND, Raymond Y, Green-Johnson JM. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *J Food Sci* 2009;74(8):423–43.
 25. Biziulevicius GA. How food-borne peptides may give rise to their immunostimulatory activities: a look through the microbiologist's window into the immunologist's garden (hypothesis). *Br J Nutr* 2004;92:1009-12.
 26. Quian B, Xing M, Cui L, Deng Y, Xu Y, Huang M, Zhang S. Antioxidant, antihypertensive and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* LB340. *J Dairy Res* 2011;78(1):2–9.
 27. Werner GH, Jollès P. Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications. *Eur J Biochem* 1996;242:1-19.
 28. Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol* 1996;34:131-45.

 29. Kazlauskaitė J, Biziulevicius GA, Zukaitė V, Biziulevicienė G, Miliukienė V, Siaurys A. Oral tryptic casein hydrolysate enhances phagocytosis by mouse peritoneal and blood phagocytic cells but fails to prevent induced inflammation. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1936-44.
 30. Duarte J, Vinderola G, Ritz B, Perdigon G. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* 2006;211:341-50.
 31. Morris HJ, Carrillo O, Bermúdez RC, Lebeque Y, Fontaine R, Llauradó G, Beltrán Y. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microb Technol* 2007;40(3):456-60.
-

32. Jeurink PV, Noguera CL, Savelkoul HFJ, Wichers HJ. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1124–33.
 33. Ou Ch, Hsiao YM, Wang, WH Ko JL, Lin MY. Stability of fungal immunomodulatory protein, FIP-gts and FIP-fve, in IFN- γ production. *Food Agric Immunol* 2009;20:319-32.
 34. 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 spp.* *Food Agric Immunol* 2007;18(1):31-7.
 35. Ouellette AJ, Bevins CL. Development of innate immunity in the small intestine. En: Sanderson IR, Walker WA, editores. *Development of the gastrointestinal tract*. Hamilton, BC:Decker; 2000. p. 147-64.
 36. Llauradó G, Morris HJ, Lebeque Y, Fontaine R, Bermúdez RC, Marcos J, Beltrán Y, García N. Acerca de la funcionalidad de setas comestibles *Pleurotus spp.*: propiedades bioestimulantes de un extracto acuoso. *Rev Cubana Química* 2005;XVII(1):102-7.
 37. Kim YS, Maslinski W, Zheng XX, Stevens AC, Li XC, Tesch GH, Kelley VR, Strom TD. Targeting the IL-15 receptor with an antagonist IL-15 mutant/Fc γ 2a protein blocks delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1998;160:5742-8.
 38. Morris HJ, Carrillo O, Alonso ME, Bermúdez RC. Are the peptide sequences encrypted in food *Chlorella* protein a possible explanation for the immunostimulatory effects of microalgal supplements? *Med Hypotheses* 2008;70(4):896.
 39. Möller NP, Scholz-Arhens KE, Roos N, Sherezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 2008;47(4):171–82.
 40. Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC (2012) Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. *PLoS ONE* 7(10): e45012. doi:10.1371/journal.pone.0045012.
-