

Ensayo de citotoxicidad de extractos de *Pleurotus ostreatus* en diferentes líneas celulares para aplicaciones inmunonutricionales

Cytotoxicity assay of *Pleurotus ostreatus* extracts in different cell lines to immunonutritional applications

Ensaio de citotoxicidade de extratos de *Pleurotus ostreatus* em diferentes linhagens celulares para aplicações imunonutricionais

Yamila Lebeque Pérez^{I*} , Gabriel Llauradó-Maury^{II} , Manuel de Jesús Serrat-Díaz^{III} , Paul Cos^{III} ,
Guillermo Antonio Barreto Argilagos^{IV} 

^I Universidad de Oriente. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Universidad de Oriente. Departamento de Farmacia. Santiago de Cuba. Cuba.

^{III} Universidad de Amberes. Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Bélgica.

^{IV} Universidad de Camagüey. Facultad de Ciencias Aplicadas. Camagüey, Cuba.

*Autora para la correspondencia: ylebeque@uo.edu.cu

Recibido: 11-09-2023 Aprobado: 20-12-2023 Publicado: 31-01-2024

RESUMEN

Introducción: los bioderivados propuestos como candidatos a ingredientes alimentarios suelen requerir ciertas evaluaciones para las aplicaciones inmunonutricionales. Los hongos comestibles-medicinales son un surtidor de compuestos con estas potencialidades. Entre ellos, las setas *Pleurotus ostreatus* contienen metabolitos bioactivos, con importantes usos en la industria alimenticia y en la práctica terapéutica de la industria médico-farmacéutica. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* constituyen métodos valiosos para evaluar productos de origen natural, como los extractos fúngicos. **Objetivo:** evaluar la citotoxicidad de dos extractos obtenidos de la seta *Pleurotus ostreatus* en diferentes líneas celulares. **Método:** se obtuvieron extractos hidrosolubles a partir del micelio y de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* en laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente. Se evaluó la citotoxicidad de los bioproductos por el ensayo

de reducción del colorante resazurina sobre tres líneas celulares en el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH) de la Universidad de Amberes, Bélgica. Se utilizaron células no adherentes THP-1 (pre-monocitos de leucemia humana), células adherentes Caco-2 (epitelio de adenocarcinoma de colon humano) y células adherentes RAW 264.7 (macrófagos murinos). **Resultados:** los extractos de *Pleurotus ostreatus* no resultaron citotóxicos para ninguna de las líneas celulares estudiadas humanas o murina, ya que no ocasionaron daños sobre la viabilidad de las células epiteliales del sistema gastrointestinal, ni sobre las células del sistema inmune empleadas. **Conclusiones:** este resultado demuestra que ambos bioderivados fúngicos pueden ser aplicados con seguridad en estudios inmunonutricionales.

Palabras clave: pleurotus ostreatus; extractos acuosos; citotoxicidad; líneas celulares; inmunonutrición



ABSTRACT

Introduction: bioderivatives proposed as candidates for food ingredients usually require certain evaluations for immunonutritional applications. Edible-medicinal mushrooms are a source of compounds with these potentials. Among them, *Pleurotus ostreatus* mushrooms contain bioactive metabolites, with important uses in the food industry and in the therapeutic practice of the medical-pharmaceutical industry. In vitro cytotoxicity assays are valuable methods to evaluate products of natural origin, such as fungal extracts. **Objective:** to evaluate the cytotoxicity of two extracts obtained from the *Pleurotus ostreatus* mushroom in different cell lines. **Method:** water-soluble extracts were obtained from the mycelium and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in laboratories of the Center for Industrial Biotechnology Studies of the Universidad de Oriente. The cytotoxicity of the bioproducts was evaluated by the resazurin dye reduction assay on three cell lines at the Laboratory of Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH) of the University of Antwerp, Belgium. Non-adherent THP-1 cells (human leukemia pre-monocytes), Caco-2 adherent cells (human colon adenocarcinoma epithelium) and RAW 264.7 adherent cells (murine macrophages) were used. **Results:** *Pleurotus ostreatus* extracts were not cytotoxic for any of the human or murine cell lines studied, since they did not cause damage to the viability of the epithelial cells of the gastrointestinal system, nor to the immune system cells used. **Conclusions:** this result demonstrates that both fungal bioderivatives can be safely applied in immunonutritional studies.

Keywords: pleurotus ostreatus; aqueous extracts; cytotoxicity; cell lines; immunonutrition

RESUMO

Introdução: bioderivados propostos como candidatos a ingredientes alimentícios geralmente requerem determinadas avaliações para aplicações imunonutricionais. *Pleurotus ostreatus* contém metabólitos bioativos, com importantes utilizações na indústria alimentícia e na prática terapêutica da indústria médico-farmacêutica. Ensaio de citotoxicidade in vitro são métodos valiosos para avaliar produtos de origem natural, como extratos de fungos. **Objetivo:** avaliar a citotoxicidade de dois extratos obtidos do cogumelo *Pleurotus ostreatus* em diferentes linhagens celulares. **Método:** extratos hidrossolúveis foram obtidos do micélio e dos corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* nos laboratórios do Centro de Estudos de Biotecnologia Industrial da Universidade de Oriente. A citotoxicidade dos bioprodutos foi avaliada pelo ensaio de redução do corante resazurina em três linhagens celulares no Laboratório de Microbiologia, Parasitologia e Higiene (LMPH) da Universidade de Antuérpia, Bélgica. Foram utilizadas células THP-1 não aderentes (pré-monócitos de leucemia humana), células aderentes Caco-2 (epitélio de adenocarcinoma do cólon humano) e células aderentes RAW 264.7 (macrófagos murinos). **Resultados:** os extratos de *Pleurotus ostreatus* não foram citotóxicos para nenhuma das linhagens celulares humanas ou murinas estudadas, pois não causaram danos à viabilidade das células epiteliais do sistema gastrointestinal, nem às células do sistema imunológico utilizadas. **Conclusões:** este resultado demonstra que ambos os bioderivados fúngicos podem ser aplicados com segurança em estudos imunonutricionais.

Palavras-chave: pleurotus ostreatus; extratos aquosos; citotoxicidade; linhas de celular; imunonutrição

Cómo citar este artículo:

Lebeque Pérez Y, Llauradó Maury G, Serrat Díaz MJ, Cos P, Barreto Argilagos GA. Ensayo de citotoxicidad de extractos de *Pleurotus ostreatus* en diferentes líneas celulares para aplicaciones inmunonutricionales. Rev Inf Cient [Internet]. 2024 [citado Fecha de acceso]; 103:e4364. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10456696>



INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen fuentes de compuestos con propiedades inmunofarmacológicas, que han resultado de mucho interés para la medicina tradicional de diferentes civilizaciones desde la antigüedad.⁽¹⁾ Las setas comestibles-medicinales poseen una variedad diversa y robusta de moléculas bioactivas que ejercen más de 200 funciones medicinales diferentes.⁽²⁾ En las últimas décadas, los hongos medicinales se han utilizado en el desarrollo de importantes suplementos para la salud. Se ha informado que los consorcios de compuestos bioactivos y sus extractos son específicos para este objetivo.⁽³⁾

Existe un interés progresivo en la investigación de compuestos inmunomoduladores, a partir de fuentes naturales, que carezcan de consecuencias adversas y tengan utilidad en la práctica inmunoterapéutica. Desde un punto de vista clínico, los nuevos procedimientos para el desarrollo de inmunocéuticos obtenidos de setas, podrían constituir respuestas a diversas demandas de la inmunoterapia. La biotecnología de los alimentos basada en el aprovechamiento de los hongos comestibles, resulta una alternativa muy sugerente para la obtención de bioderivados con efectos inmunomoduladores y antitumorales.⁽¹⁾

El *Pleurotus* se encuentra entre los géneros más estudiados como fuente de moléculas bioactivas con capacidad para modular la respuesta inmunológica. Pero, únicamente el 3 % de las investigaciones sobre bioproductos naturales que arriba a las fases preclínica y/o clínicas están orientadas al trabajo con las setas comestibles. Un área menos estudiada, es el uso del *Pleurotus* en la estimulación del sistema inmune en relación a tratamientos nutricionales, que es el propósito fundamental de la "inmunonutrición". Lo cual evidencia la importancia de la "micoterapia" como un área novedosa y promisorio.⁽¹⁾

La salud está fuertemente relacionada con un equilibrio adecuado de las funciones inmunitarias que pueden ser mediadas directamente por las dietas, denominada "modulación inmunitaria por los alimentos". Estos estudios han ganado utilidad debido al uso de líneas celulares. Los compuestos alimentarios suelen estar integrados en diferentes matrices. Después del consumo oral, una matriz alimentaria pasa por el tracto gastrointestinal donde sus bioactividades podrían haberse modificado. Por lo tanto, se hace necesaria una simulación de la digestión gástrica *in vitro* para estudiar la estimulación de las células inmunitarias *in vivo* y *ex vivo* (Chanput W. En: Tesis para el título de doctor. Universidad de Wageningen, Wageningen, NL, 2012).

Por otra parte, el cultivo celular tiene un rol relevante en la investigación de nuevos tratamientos en un gran número de padecimientos.⁽⁴⁾ La línea celular Caco-2, se deriva de un adenocarcinoma colorrectal humano y se caracterizan por ser células de tipo epitelial. Es frecuentemente empleada en los estudios sobre la absorción de compuestos ya que exhiben particularidades propias de células intestinales maduras (Romero y Zabaleta. En: Trabajo para optar por el título de Químico Farmacéutico. Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, 2020).



Las THP-1 monocíticas se corresponden con una línea celular cancerígena, cuyas células pueden diferenciarse a macrófagos exponiéndolas a reactivos como el forbol-12 miristato-13-acetato (PMA). Por lo cual, ha sido utilizada para estudiar los monocitos y macrófagos en diferentes procesos inflamatorios (Gonzaga JF. En: Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, México, 2016).

Por su parte, las células RAW 264.7 pertenecen a una línea celular de macrófagos derivados de monocitos de ratones con leucemia. La utilización de esta línea de macrófagos murinos también es un modelo celular de inflamación, empleado de forma habitual (Arranz EM. En: Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, 2013).

Para evaluar la citotoxicidad, generalmente se utilizan diversas técnicas de tinción celular con el objetivo de calcular, de forma indirecta, la cantidad de células vivas con posterioridad a un tratamiento. Un ensayo correcto para valorar la viabilidad celular y la citotoxicidad debe ser sencillo, rápido, eficiente, económico, sensible, reproducible, seguro y efectivo para la población celular viable, además de no mostrar interferencias con los compuestos evaluados.⁽⁵⁾

El método de resazurina resulta básico para apreciar la proliferación de las células después de ser tratadas y permite complementar los estándares utilizados para la evaluación del efecto citotóxico con la posterior determinación de la proliferación celular.⁽⁵⁾

El objetivo del presente trabajo fue evaluar, a través del ensayo de reducción del colorante resazurina, la actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de extractos acuosos de *Pleurotus ostreatus* para garantizar su aplicación en futuros estudios inmunonutricionales.

MÉTODO

Preparación de muestras

Los extractos acuosos se obtuvieron, previamente, en la planta de setas comestibles y el laboratorio de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente. A partir de la biomasa húmeda del micelio y de los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*) se realizó la decocción (90-100 °C) y se liofilizaron.⁽⁶⁾ Los liofilizados fueron pesados en una balanza (METTLER TOLEDO, New Classic MS, España) y se resuspendieron (100 mg/mL) en agua ultrapura. Posteriormente, se obtuvieron los biopreparados en los medios de cultivo correspondientes, a concentraciones seriadas (512, 256, 128, 64, 32 y 16 µg/mL) y se conservaron hasta su utilización.

Cultivos celulares

En el Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias de la Universidad de Amberes, Bélgica, se realizaron los cultivos celulares y los ensayos para evaluar la citotoxicidad de los bioproductos.



Los extractos fúngicos se evaluaron en tres líneas celulares diferentes: células no adherentes THP-1 (pre-monocitos de leucemia humana), células adherentes Caco-2 (epitelio de adenocarcinoma de colon humano) y células adherentes RAW 264.7 (macrófagos murinos). Las líneas fueron adquiridas de la Colección Americana de Cultivos de Tejidos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) (Manassas, VA, EE. UU.). Las células se sembraron en cabina de flujo laminar (clan LAF®, VFRS 1806, Holanda), se cultivaron en medios de acuerdo a sus especificaciones y en incubadora (BINDER, Alemania) a 37 °C con atmósfera húmeda (CO₂ al 5 %).

Las células THP-1 en medio RPMI 1640 (1X) (Gibco®, EE. UU.), suplementado con suero fetal bovino (iFBS, por sus siglas en inglés) (Gibco®, EE. UU.) al 10 %, L-glutamina (2 mM), higromicina (75 mg/mL) y Penistrep (1 %) (Sigma-Aldrich, EE. UU.). La línea celular Caco-2 se cultivó en DMEM(1X) (Gibco®, EE. UU.), suplementado con iFBS (Gibco®, EE. UU.) al 10 %, L-glutamina al 2 %, D-glucosa (4,5 g/L) y Penistrep (1 %) (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Los macrófagos RAW 264.7 se mantuvieron a 37 °C, atmósfera de CO₂ al 5 % en medio DMEM con FBS (Gibco®, EE. UU.)(10 %), L-glutamina (2 %) y 4,5 g/L de D-glucosa.⁽⁷⁾

Ensayo para evaluar la citotoxicidad

Se evaluó el efecto citotóxico por el ensayo de reducción del colorante resazurina sobre la viabilidad celular. Se utilizó la sal sódica de resazurina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como control estándar. El tamoxifeno se incluyó como fármaco de control de referencia para la citotoxicidad y se utilizó un lector de placas (TECAN GENios, Suiza) para la lectura.⁽⁷⁾

Las células adherentes crecidas (Caco-2) se retiraron con Tripsina-EDTA 0,05 % y centrifugaron a 130 g durante 10 min a 4 °C en centrífuga (Allegra®, X-15R, EE. UU.). Para el ensayo fueron sembradas 200 µL del inóculo de células (5 x 10⁵ células/pocillo) en microplacas estériles de 96 pocillos e incubadas en incubadora (BINDER, Alemania) por 24 h a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Las células no adherentes (THP-1) se centrifugaron a 1 800 rpm/10 min y 4 °C. Se añadieron (5x10⁵ células/pocillo) con 200 µL del medio fresco para ser incubadas.

Se agregaron 10 µL de tamoxifeno a los pocillos del control positivo. Las células de control negativo se incubaron únicamente con 200 µL del medio correspondiente. Al resto de los pocillos se añadieron los extractos en sus diferentes concentraciones y se incubaron las placas durante 24-48 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 50 µL de resazurina (2,2 µg/mL) a cada pocillo y se midió la fluorescencia después de 4 h a 37 °C (excitación λ 550 nm, emisión λ 590 nm).

Se realizaron dos experimentos independientes y las muestras se ensayaron por triplicado en cada uno de ellos.



Procesamiento de datos

Se expresaron los resultados como la media aritmética \pm desviación estándar, a partir del análisis estadístico realizado con el software Graph Pad Prism 7 (Windows, V.7.04, 2017). Los resultados corresponden al Proyecto VLIR-UOP-3 Natural Products and Pharmaceutical Services to improve the patient quality of life in Eastern Cuban Hospital's.

RESULTADOS

Los extractos ensayados en este estudio constituyeron un material con la calidad adecuada para su evaluación.

El efecto de los extractos fúngicos fue evaluado sobre la viabilidad celular de tres líneas celulares secundarias: línea de leucocitos humanos (THP-1), línea epitelial intestinal (Caco-2) y línea de macrófagos murinos (RAW 264.7) (Gráfico 1, Gráfico 2 y Gráfico 3). Se aplicó el ensayo de reducción resazurina como prueba indicativa de posibles daños a nivel de la mitocondria y, por tanto, en los procesos de respiración celular o actividad metabólica.⁽⁷⁾

El colorante resazurina (azul no fluorescente) es reducido a resofurina (rosado muy fluorescente) por las oxidoreductasas presentes, fundamentalmente, en las mitocondrias de células vivas. La resofurina se excreta al medio y permite la observación de la proliferación celular o la citotoxicidad de compuestos sobre diferentes tipos celulares, incluidas las de hongos.⁽⁵⁾

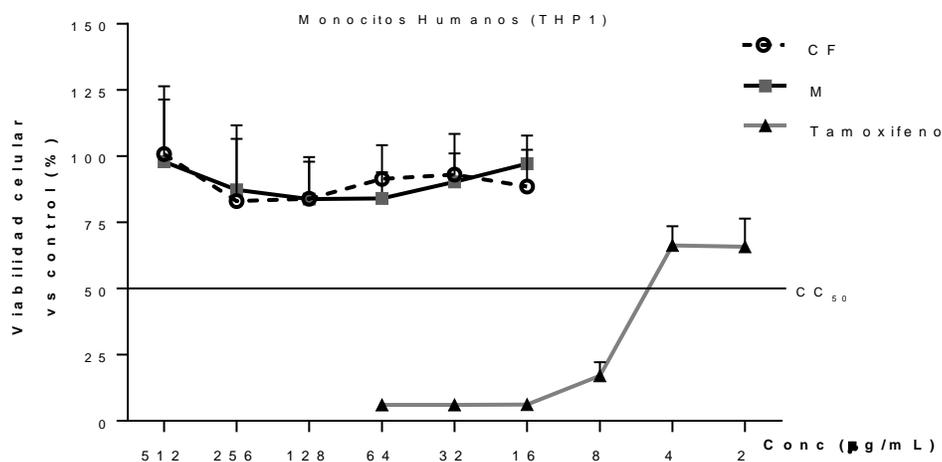


Gráfico 1. Efecto de extractos de *Pleurotus* (Cf y M) en la viabilidad celular de monocitos humanos THP1. Resultados expresados como la media \pm DE de 6 réplicas (n=6). Cf (cuerpos fructíferos). M (micelio). Tamoxifeno (control de referencia para la citotoxicidad).



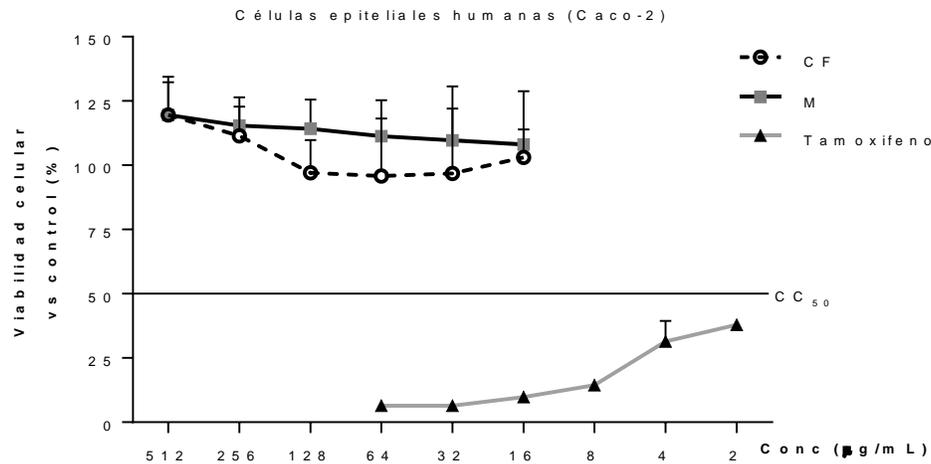


Gráfico 2. Efecto de extractos de *P. ostreatus* en la viabilidad celular de células epiteliales de adenocarcinoma intestinal humano Caco-2. Resultados expresados como la media \pm DE de 6 réplicas (n=6). Cf (cuerpos fructíferos). M (micelio). Tamoxifeno (control de referencia para la citotoxicidad).

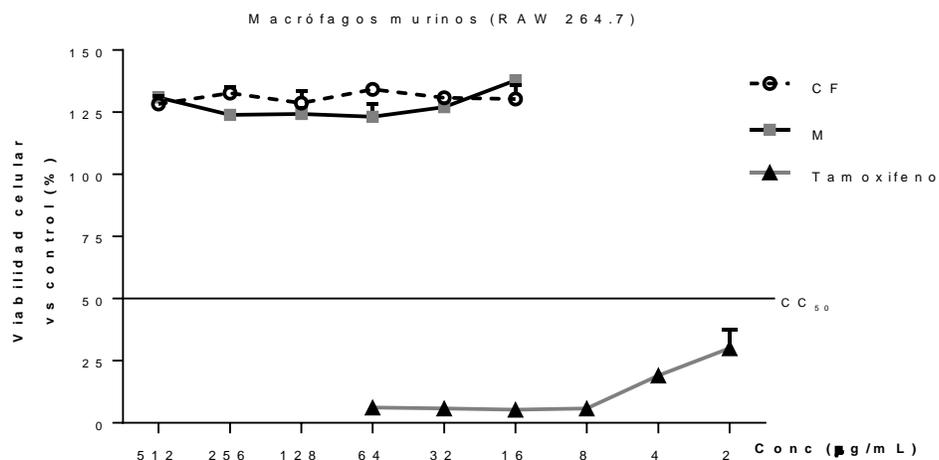


Gráfico 3. Efecto de extractos de *Pleurotus* (Cf y M) en la viabilidad celular de células del sistema inmune (macrófagos murinos RAW 264.7). Resultados expresados como la media \pm DE de 6 réplicas (n=6). Cf (cuerpos fructíferos). M (micelio). Tamoxifeno (control de referencia para la citotoxicidad).



DISCUSIÓN

Los extractos de *P. ostreatus* ensayados resultan bioderivados con capacidad para potenciar la respuesta inmune.⁽⁸⁾ Los carbohidratos y otros compuestos bioactivos presentes en ellos^(8,9,10,11) podrían ser responsables de sus potenciales efectos prebióticos y garantizar sus posibles aplicaciones inmunonutricionales, una vez comprobada la ausencia de citotoxicidad sobre células del sistema gastrointestinal y del sistema inmune seleccionadas.

Diferentes líneas celulares han sido comúnmente utilizadas como modelos en ensayos de cocultivos y sistemas de monocultivos, diseñados para explorar efectos toxicológicos⁽¹²⁾ y como estrategia para evaluar interacciones entre el microorganismo y el hospedero.⁽¹³⁾ En nuestras investigaciones, uno de los primeros estudios a realizar, consiste en descartar un posible efecto citotóxico de los bioderivados fúngicos sobre células implicadas en el estudio de candidatos prebióticos, capaces de estimular la inmunidad local en el intestino (ej. fagocitosis) o interferir en los mecanismos de adherencia de patógenos y favorecer la adhesión de bacterias beneficiosas al epitelio intestinal.

La línea celular monocítica THP-1, es la que se utiliza con mayor frecuencia para investigaciones sobre las funciones de los macrófagos humanos. La incapacidad de expandir las poblaciones de macrófagos *ex vivo* y su vida útil limitada en cultivo, han convertido a las células THP-1 en el modelo *in vitro* para rebasar los inconvenientes del empleo de macrófagos primarios y ha resultado la línea más utilizada para determinar la respuesta de los macrófagos humanos a los estímulos proinflamatorios.⁽¹⁴⁾

Los cultivos de células Caco-2 y HT-29, han sido muy utilizados como modelos para el estudio de funciones específicas en células del epitelio intestinal. Estas líneas celulares permiten reproducir el fenotipo de células absortivas y mucosecretoras.⁽¹⁵⁾

Por otra parte, el método de reducción del colorante resazurina resultó adecuado y reproducible para la evaluación de la citotoxicidad de los bioderivados fúngicos. Se pudo comprobar la actividad metabólica expresada en los niveles de viabilidad de las células tratadas con las sustancias experimentales (extractos), en comparación con los efectos negativos observados sobre la viabilidad celular del compuesto (tamoxifeno), utilizado como control de referencia.

Según Escobar, *et al.*⁽⁵⁾ el colorante resazurina es poco tóxico para las células y permite la continuidad de estudios en las mismas células, lo que economiza tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, el método es sensible y altamente reproducible.

Los resultados de este estudio sugieren que ninguno de los extractos evaluados ocasionó daño en los procesos metabólicos de las células, ya que estos no provocaron la disminución de la viabilidad celular. Por el contrario, se aprecia una ligera tendencia a la estimulación de la proliferación celular, dependiente de la concentración en las líneas de monocitos humanos (THP-1) y células epiteliales (Caco-2). Mientras, en los macrófagos murinos (RAW 264.7) se observó una tendencia de viabilidad muy estable en las diferentes concentraciones aplicadas. Lo anterior evidencia el efecto no citotóxico de los bioderivados fúngicos sobre estas poblaciones celulares.



La reducción de resazurina se ha descrito como un método variable según la línea celular valorada. Un estudio identificó cómo esto ocurre al evaluar CuSO_4 a diferentes concentraciones en tres líneas celulares (hepatocitos de ratón, HepG2, y HeLa). Aquí el método detectó una citotoxicidad más rápida en las primeras líneas; sin embargo, en la línea celular HeLa, el resultado fue contrario. Esto puede indicar una sensibilidad diferente de esta línea. Por esta razón, algunos autores exponen la importancia de valorar individualmente las líneas celulares, ya que cada una posee propiedades metabólicas únicas que deben ser caracterizadas para determinar parámetros experimentales diferentes.⁽⁵⁾

Llauradó, *et al.*⁽⁸⁾ evaluaron la citotoxicidad de un extracto de *P. ostreatus* (HW-Pm) obtenido a 95 °C. El efecto se determinó mediante el ensayo de reducción del colorante resazurina, con la utilización de varias concentraciones (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1024 $\mu\text{g/mL}$) del producto. El resultado arrojó que HW-Pm no fue citotóxico para las células RAW 264.7, ya que se observó una estabilidad en la viabilidad de las células a las diferentes concentraciones ensayadas.

En una investigación realizada para evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto acuoso de la microalga *Phorphyridium cruentum* se demostró, además, que este no ejerció actividad citotóxica sobre monocitos humanos THP-1 y macrófagos murinos RAW 264.7. El método de reducción de resazurina y las mismas concentraciones (512, 256, 128, 64, 32 y 16 $\mu\text{g/mL}$) utilizadas para evaluar el producto de nuestro ensayo fueron utilizadas por estos autores.⁽¹⁶⁾

En el presente estudio también se puede observar que los porcentajes de supervivencia celular obtenidos fueron muy parecidos entre las células tratadas con los diferentes extractos. Mientras, en la evaluación de la citotoxicidad de tres compuestos sintéticos sobre células HEp-2, HT-29 y HeLa, los resultados indicaron que en ninguna de las líneas celulares los compuestos causaron disminución significativa de la supervivencia celular con el empleo del método de resazurina. También se halló que las respuestas de porcentaje de supervivencia obtenidas fueron semejantes al evaluar los diferentes compuestos.⁽⁵⁾

Es importante que los biopreparados para aplicaciones inmunonutricionales no muestren citotoxicidad. Este estudio garantiza que los extractos de *Pleurotus* puedan aplicarse en investigaciones sucesivas, sin riesgos de posibles efectos adversos. Sin embargo, una probable limitación, es la utilización de un solo método para la evaluación de la viabilidad celular.

CONCLUSIONES

Los extractos de *Pleurotus ostreatus* evaluados no afectaron la viabilidad de las células humanas (leucocitos y epiteliales intestinales), así como la de células inmunitarias murinas (macrófagos). Estos resultados avalan su empleo como posibles candidatos prebióticos y garantizan su seguridad para estudios inmunonutricionales posteriores, como pueden ser los ensayos de cocultivos entre leucocitos, células epiteliales y bacterias beneficiosas o patogénicas.



Recomendaciones

Evaluar la actividad de estos extractos ensayados sobre la función inmunológica de células leucocitarias, así como el posible efecto inhibitorio sobre los mecanismos de adherencia de bacterias patogénicas y beneficiosas.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio Cubano de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente (Proyecto Territorial PT241SC003-003 del Programa “Desarrollo de Productos y Servicios de Salud”) por su aporte monetario. Así como, a la Cooperación Belga para el Desarrollo (Proyecto VLIR-UO, Consejo Interuniversitario Flamenco-Cooperación Universitaria para el Desarrollo) del Programa de Cooperación Universitaria Institucional con la Universidad de Oriente. El mismo propició una estancia de investigación y garantizó recursos materiales para la realización de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morris-Quevedo HJ, Llauradó-Maury G, Bermúdez-Savón RC, Cos P, Lebeque-Pérez Y, Beltrán-Delgado Y, *et al.* Evaluación de la Actividad Inmunomoduladora de bioproductos obtenidos de la seta comestible-medicinal *Pleurotus ostreatus*. An Acad Cienc Cuba [Internet]. 2018 [citado 26 Jun 2023]; 8(1):1-10. Disponible en: <https://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/436/428>
2. Rathore H, Prasad Sh, Kapri M, Tiwari A, Sharma S. Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. J Funct Foods [Internet]. 2019 [citado 2 Mar 2023]; 56(2019):182-193. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.016>
3. Martin KR, Pence JC, Bloomer RJ. Vitamin D - enhanced Mushrooms as Dietary Supplements and Nutraceuticals: A Nutritionally Sensible Trade-off for the Consumer. Clin J Nutr Diet [Internet]. 2020 [citado 10 Mar 2023]; 3(1):1-7. Disponible en: https://www.memphis.edu/healthsciences/pdfs/pdfs2020/2020_cjnd_mushrooms.pdf
4. Montoya EL, Juárez E. El Cultivo Celular en la búsqueda de nuevas estrategias de Combate contra el Cáncer. Rev Méd U Ver [Internet]. 2022 [citado 10 Mar 2023]; 22(1):39-44. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2022/muv221d.pdf>
5. Escobar L, Rivera A, Aristizábal F. A. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. Vitae [Internet]. 2010 [citado 10 Mar 2023]; 17(1):67-74. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v17n1/v17n1a09.pdf>
6. Lebeque-Pérez Y, Fong-Lores O, Rodríguez-Leblanch E, Llauradó-Maury G, Serrat-Díaz MJ. Evaluación *in vivo* de la pirogenicidad de bioproductos fúngicos con potencial prebiótico. Rev Inf Cient [Internet]. 2022 [citado 15 Mar 2023]; 101(3):e3791. Disponible en: <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/3791>
7. Llauradó G, Morris HJ, Heykers A, Lanckacker E, Cappoen D, Delputte P, *et al.*



- Differential Induction Pattern Towards Classically Activated Macrophages in Response to an Immunomodulatory Extract from *Pleurotus ostreatus* Mycelium. J Fungi [Internet]. 2021 [citado 15 Mar 2023]; 7:206. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7030206>
8. Morris HJ, Llauradó G, Beltrán Y, Bermúdez RC, García N, Lebeque Y. Biotecnología de hongos comestibles: fuente de alimentos funcionales/nutraceuticos en sistemas agroalimentarios sostenibles de origen microbiano. Rev Congreso Univ [Internet]. 2020 [citado 15 Mar 2023]; 9(3).
 9. Lebeque Y, Morris HJ, Beltrán Y, Llauradó G, Gaime-Perraud I, Meneses M, *et al.* Proximal Composition, Nutraceutical Properties, and Acute Toxicity Study of Culinary-Medicinal Oyster Mushroom Powder, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes). Int J Med Mushrooms [Internet]. 2018 [citado 15 Mar 2023]; 20(12):1185-1195. DOI: <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v20.i12.60>
 10. Beltrán-Delgado Y, Morris-Quevedo HJ, Llauradó-Maury G, Bermúdez-Savón RC, García-Oduardo N. Procedimientos para la producción de setas del género *Pleurotus* con potencial aplicación farmacológica. Rev Cubana Quím [Internet]. 2020 [citado 15 Mar 2023]; 32(2):245-261. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212020000200245
 11. Beltrán Y, Morris H, Domínguez O, Batista P, Llauradó G. Composición micoquímica y actividad antioxidante de la seta *Pleurotus ostreatus* en diferentes estados de crecimiento. Acta Biol Colomb [Internet]. 2021 [citado 15 Mar 2023]; 26(1):89-98. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v26n1.84519>
 12. Arezki Y, Cornacchia J, Rapp M, Lebeau L, Pons F, Ronzani C. A Co-Culture Model of the Human Respiratory Tract to Discriminate the Toxicological Profile of Cationic Nanoparticles According to Their Surface Charge Density. Toxics [Internet]. 2021 [citado 4 Jul 2023]; 9(210). DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics9090210>
 13. De Rudder Ch, Calatayud M, Lebeer S, Van de Wielea T. Dual and Triple Epithelial Coculture Model Systems with Donor-Derived Microbiota and THP-1 Macrophages To Mimic Host-Microbe Interactions in the Human Sinonasal Cavities. mSphere. 2020 [citado 4 Jul 2023]; 5(1):e00916-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00916-19>
 14. Lundý ME, Joyce A, O'Brien BA, Donnelly S. La elección del protocolo de diferenciación de forbol 12-miristato 13-acetato influye en la respuesta de los macrófagos THP-1 a un estímulo proinflamatorio. Rev Mét Inmunol [Internet]. 2016 [citado 15 Mar 2023]; 430(2016):64-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.0120022-1759/>
 15. Rodríguez P. Estrategias para mitigar la toxicidad asociada a la exposición crónica al mercurio a través de la dieta [Tesis Doctoral]. España: Universitat Politècnica de València; 2023. [citado 25 Ago 2023]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/192865>
 16. Ferrer-Salas D, Llauradó-Maury G, Fernández-Duarte G, Lebeque-Pérez Y. Antimicrobial evaluation of the aqueous extract of the biomass of the microalga *Phorphyridium cruentum*. Rev Cubana Quím [Internet]. 2023 [citado 15 Mar 2023]; 35(1):83-99. Disponible en: <https://cubanaquimica.uo.edu.cu/index.php/cq/article/view/5303>

Declaración de conflictos de intereses:

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.



Contribución de los autores:

Conceptualización: Gabriel Llauradó Maury, Guillermo Antonio Barreto Argilagos.

Curación de datos: Yamila Lebeque-Pérez.

Análisis formal: Yamila Lebeque Pérez, Gabriel Llauradó-Maury.

Investigación: Yamila Lebeque Pérez, Manuel de Jesús Serrat Díaz.

Metodología: Manuel de Jesús Serrat Díaz, Paul Cos, Guillermo Antonio Barreto Argilagos.

Administración del proyecto: Paul Cos, Gabriel Llauradó Maury, Yamila Lebeque Pérez.

Recursos: Paul Cos.

Supervisión: Gabriel Llauradó-Maury.

Validación: Yamila Lebeque-Pérez, Gabriel Llauradó-Maury.

Visualización: Yamila Lebeque-Pérez.

Redacción borrador original: Yamila Lebeque Pérez.

Redacción-revisión y edición: Yamila Lebeque Pérez, Gabriel Llauradó-Maury, Manuel de Jesús Serrat-Díaz, Paul Cos, Guillermo Antonio Barreto Argilagos.

Financiación:

Se recibió financiamiento del Proyecto VLIR-UO "Natural Products and Pharmaceutical Services to improve the patient quality of life in Eastern Cuban Hospital's". Auspiciado por la Cooperación Belga para el Desarrollo, a través del Laboratorio de Microbiología, Parasitología e Higiene (LMPH), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias de la Universidad de Amberes, Bélgica.

Archivo complementario (Open Data):

[Base de datos sobre ensayo de citotoxicidad de extractos de *Pleurotus ostreatus* en diferentes líneas celulares para aplicaciones inmunonutricionales](#)

