

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Actividad de Citotoxicidad en células de mamíferos por  
sobrenadantes bacterias libres de células derivados de  
*Lactobacillus* spp.**

**Diego Andrés Villavicencio Pilacuan**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 18 de Diciembre de 2024

# UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

## HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Actividad de Citotoxicidad en células de mamíferos por  
sobrenadantes bacterias libres de células derivados de  
*Lactobacillus* spp.**

**Diego Andrés Villavicencio Pilacuan**

Nombre del profesor, Título académico  
Nombre del profesor, Título académico

Patricio Rojas Silva, M.D., Ph. D.  
Antonio Machado, Ph. D.

Quito, 18 de Diciembre de 2024

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Diego Andres Villavicencio Pilacuan

Código: 00321377

Cédula de identidad: 1750523951

Lugar y fecha: Quito, 13 de Diciembre de 2024

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La crisis global de resistencia a los antibióticos destaca la necesidad urgente de estrategias antimicrobianas alternativas. Los postbióticos, definidos como supernatantes libres de células (CFS) derivados de cepas de *Lactobacillus*, han demostrado actividad antimicrobiana sin requerir microorganismos vivos, lo que los convierte en candidatos prometedores para aplicaciones terapéuticas e industriales. Este estudio evaluó los efectos citotóxicos de CFS de *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. crispatus*, *L. acidophilus* y *L. iners* en células HEPG2, derivadas de hepatocarcinoma humano, y macrófagos RAW 264.7, derivados de ratón. Los CFS fueron ajustados a un pH neutro ( $7.0 \pm 0.2$ ) para reducir la toxicidad inducida por la acidez y probados a una concentración de 20 mg/mL, identificada previamente como la concentración mínima inhibitoria (MIC) efectiva contra patógenos. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo método de reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT).

Los resultados mostraron una citotoxicidad dependiente de la cepa, con *L. acidophilus* ATCC 4356T manteniendo la mayor viabilidad celular en HEPG2 (94.75%) y *L. gasseri* V254 induciendo la mayor reducción en la viabilidad de RAW 264.7 (23.42%). Las marcadas diferencias entre las líneas celulares sugieren que la citotoxicidad en los macrófagos podría involucrar mecanismos naturales de muerte celular regulada, mientras que los hepatocitos son más directamente afectados. Estos hallazgos destacan la importancia de formular postbióticos que equilibren la eficacia antimicrobiana con la seguridad celular. Las aplicaciones incluyen la modulación inmunológica y terapias antimicrobianas, requiriendo investigaciones adicionales para caracterizar los compuestos bioactivos y optimizar los perfiles de seguridad.

**Palabras clave:** Postbióticos, *Lactobacillus*, supernatantes libres de células, citotoxicidad, resistencia antimicrobiana, modulación inmunológica, compuestos bioactivos, ensayo MTT.

## ABSTRACT

The global antibiotic resistance crisis underscores the urgent need for alternative antimicrobial strategies. Postbiotics, defined as cell-free supernatants (CFS) from *Lactobacillus* strains, have shown antimicrobial activity without requiring live microorganisms, making them promising candidates for therapeutic and industrial applications. This study assessed the cytotoxic effects of CFS from *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, and *L. iners* on human hepatocyte-derived HEPG2 cells and mouse RAW 264.7 macrophages. CFS were adjusted to a neutral pH ( $7.0 \pm 0.2$ ) to reduce acidity-induced toxicity and tested at 20 mg/mL, the previously identified minimum inhibitory concentration (MIC) against pathogens. Cell viability was determined using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Results showed strain-dependent cytotoxicity, with *L. acidophilus* ATCC 4356T maintaining the highest cell viability in HEPG2 cells (94.75%) and *L. gasseri* V254 inducing the most significant reduction in RAW 264.7 viability (23.42%). The marked differences between cell lines suggest that cytotoxicity in macrophages may involve natural regulatory cell death mechanisms, whereas hepatocytes are more directly affected. These findings highlight the importance of tailoring postbiotic formulations to balance antimicrobial efficacy with host cell safety. Applications include immune modulation and antimicrobial therapies, with further research needed to characterize bioactive compounds and optimize safety profiles.

**Keywords:** Postbiotics, *Lactobacillus*, cell-free supernatants, cytotoxicity, antimicrobial resistance, HEPG2, RAW 264.7, MTT assay, bioactive compounds, immune modulation

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1. Introducción a los Postbióticos .....	11
1.2. Crisis de Resistencia a Antibióticos y el Papel de los Postbióticos .....	11
1.3. Composición y Mecanismos de Acción de los CFS .....	12
1.4. Problemas de Patógenos Multirresistentes y Uso de CFS .....	12
1.5. Importancia de la Evaluación de Citotoxicidad .....	13
1.6. Objetivos del Estudio.....	14
<b>2. MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
2.2. Tratamiento Antimicrobiano Previo de Líneas Celulares.....	15
2.1. Obtención previa de CFS .....	15
2.3. Mantenimiento celular .....	16
2.4. Evaluación de Citotoxicidad por MTT .....	16
2.5. Análisis estadístico.....	17
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Figura 1. Porcentaje de viabilidad celular de HEPG2 .....	18
3.2. Figura 2. Viabilidad celular RAW 264.7 .....	18
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>6. TABLAS</b> .....	<b>26</b>
<b>7. FIGURAS</b> .....	<b>27</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>32</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>6.1. Tabla 1.</b> Porcentaje de viabilidad promedio de HEPG2 ser expuestos a distintos CFS.....	27
<b>6.2 Tabla 2.</b> Porcentaje de viabilidad por promedio de RAW 264.7 ser expuestos a distintos CFS.....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>7.2 Figura 1.</b> Porcentaje de viabilidad celular de HEPG2.....	28
<b>7.2 Figura 2.</b> Porcentaje de viabilidad celular RAW 264.7.....	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Absorbancia y conversión de viabilidad en HEPG2.....	35
<b>Anexo 2.</b> Absorbancia y conversión de viabilidad en HEPG2.....	36

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Introducción a los Postbióticos

Los postbióticos, definidos como productos metabólicos de microorganismos probióticos, han ganado creciente interés en el ámbito biomédico debido a su potencial para combatir infecciones bacterianas y fúngicas (Liang & Xing, 2023). Entre estos, diversos estudios apuntan a que los medios libres de células (CFS) de bacterias ácido-lácticas (LAB) se han destacado por su capacidad antimicrobiana tanto para aplicaciones clínicas (Scillato et al., 2021), como conservantes para el sector alimenticio (Daniela Arrijoja-Bretón, 2021). No obstante, a pesar de su prometedor efecto antimicrobiano, la citotoxicidad de estos postbióticos en células de mamíferos plantea una limitación significativa para su aplicación clínica y como conservante de alimentos, ya que no solo se requiere que sean efectivos contra patógenos, sino que su efecto negativo para las células del hospedador sea mínimo. Esto resalta la necesidad de estudios enfocados en evaluar y reducir su toxicidad sin comprometer su efectividad terapéutica.

### 1.2. Crisis de Resistencia a Antibióticos y el Papel de los Postbióticos

La creciente crisis de resistencia a los antibióticos convencionales ha impulsado a la comunidad científica y al sistema de salud pública a explorar terapias alternativas que puedan superar las limitaciones de los tratamientos actuales (McKilip & Church, 2021). En este contexto, los postbióticos, en particular los medios libres de células (CFS), emergen como candidatos prometedores debido a su capacidad para ofrecer actividades antimicrobianas sin la necesidad de organismos vivos (Vinderola et al., 2022). A diferencia de los probióticos, que requieren la viabilidad de microorganismos para ejercer sus efectos beneficiosos, los postbióticos consisten en metabolitos secundarios, péptidos antimicrobianos, ácidos grasos de cadena corta y otras moléculas bioactivas producidas por microorganismos, los cuales pueden

inhibir la supervivencia y colonización de patógenos en el hospedador (Salminen et al., 2021). Aunque la composición exacta de los CFS es altamente variable y depende de factores como la cepa microbiana y las condiciones de cultivo, es posible realizar estudios de caracterización detallada para identificar las macromoléculas responsables de la actividad antimicrobiana y evaluar su seguridad en células humanas (Arrijoja-Bretón et al., 2020).

### **1.3. Composición y Mecanismos de Acción de los CFS**

Los CFS incluyen bacteriocinas, como las lantibióticas, que pueden insertarse en las membranas celulares de los patógenos, formando poros y provocando la lisis celular (McAuliffe et al., 2001). Además, los ácidos orgánicos producidos, como el ácido láctico y el ácido acético, pueden reducir el pH local y desestabilizar las membranas bacterianas (Özcelik et al., 2016; Omak & Yilmaz-Ersan, 2022). El uso de CFS ofrece ventajas significativas, como una mayor estabilidad, facilidad de estandarización y menor riesgo de transferencia de genes de resistencia o infección oportunista (Żółkiewicz et al., 2020). Asimismo, al no contener células viables, los CFS reducen el riesgo de respuestas inmunológicas adversas en el huésped, lo que es particularmente importante en pacientes inmunocomprometidos (Freitas et al., 2024).

### **1.4. Problemas de Patógenos Multirresistentes y Uso de CFS**

Patógenos multirresistentes como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Pseudomonas aeruginosa* representan una amenaza significativa en entornos hospitalarios y comunitarios debido a su capacidad para resistir múltiples clases de antibióticos (Nataraj & Mallappa, 2021). Se estima que las infecciones causadas por MRSA y *P. aeruginosa* multirresistentes y otras bacterias resistentes a los antibióticos contribuyen a más de 700,000 muertes al año a nivel mundial, y se proyecta que esta cifra podría aumentar a 10 millones para el año 2050 si no se implementan soluciones efectivas (O'Neill, 2016). En respuesta a esta problemática, estudios recientes han investigado el uso de CFS derivados de

cepas de *Lactobacillus* como alternativas terapéuticas. Para este trabajo de titulación, se utilizarán CFS obtenidos de cepas específicas como *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. crispatus*, *L. acidophilus* y *L. iners* a lo largo del trabajo doctoral de Pamela Cangui. Estos CFS han mostrado inhibir el crecimiento de patógenos a concentraciones tan bajas como 20 mg/mL, lo que indica una alta potencia biológica. No obstante, al ajustar el pH a  $7 \pm 0.2$ , se observa una disminución notable en la capacidad antimicrobiana, lo cual podría estar asociado con la inactivación de ácidos orgánicos y otros compuestos sensibles al pH neutro. Este ajuste es crucial para la realización de estudios de citotoxicidad que requieren condiciones fisiológicas neutras para mantener la viabilidad celular y obtener resultados relevantes. La evaluación de la citotoxicidad bajo estas condiciones permitirá comprender mejor el impacto de los CFS en células humanas y determinar su viabilidad como postbióticos en aplicaciones clínicas.

### **1.5. Importancia de la Evaluación de Citotoxicidad**

La evaluación de citotoxicidad es un paso crucial en el desarrollo de potenciales fármacos y compuestos bioactivos, ya que permite determinar la seguridad y tolerancia celular antes de su avance a estudios preclínicos y clínicos. Los ensayos de viabilidad celular, como el ensayo de método de reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT), son ampliamente utilizados para cuantificar la actividad metabólica de las células en respuesta a la exposición a un potencial fármaco, proporcionando una medida indirecta de la citotoxicidad (Tolosa et al., 2015). Estos ensayos se basan en la capacidad de las células viables para reducir el tetrazolio MTT, un compuesto amarillo, a formazán, un producto de color púrpura oscuro que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. La reducción del MTT a formazán ocurre gracias a la acción de enzimas oxidoreductasas metabólicamente activas, principalmente deshidrogenasas mitocondriales (Yuanbin Liu, 2002). Este proceso refleja la actividad metabólica y energética de las células, siendo proporcional al número de células viables presentes en la muestra. La

reducción de la viabilidad celular indica efectos tóxicos directos del compuesto en cuestión, reflejando daños en procesos metabólicos esenciales como la respiración mitocondrial o la síntesis de proteínas (van Meerloo et al., 2011). Además, la correlación entre la citotoxicidad in vitro y los efectos adversos en modelos animales subraya la importancia de estos ensayos en la evaluación inicial de la seguridad de los fármacos (Tonholo et al., 2020). Ensayos como el MTT, Lactato deshidrogenasa LDH y el ensayo de exclusión de azul de tripano, en conjunto con análisis moleculares complementarios, permiten una caracterización integral de los efectos tóxicos, ayudando a descartar compuestos que podrían causar daños significativos en tejidos humanos, lo que es fundamental para el desarrollo seguro y eficaz de nuevas terapias o, en su defecto, aditivos alimentarios (Niles et al., 2008; Twarużek et al., 2019).

### **1.6. Objetivos del Estudio**

Este estudio se centrará en analizar los efectos citotóxicos de los CFS bajo condiciones de pH ajustadas, comparando los 10 CFS más prometedores y los 5 menos efectivos en términos de actividad antimicrobiana empleando las líneas celulares de hepatocarcinoma derivado de humano, HEP-G2, y macrófagos inmortalizados derivados de ratón, RAW 264.7 generosamente donados por el Dr. Ilya Raskin de la Universidad de Rutgers.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Obtención previa de CFS

En base a los ensayos previos realizados por Pamela Canguí, en la que se probaron los CFS de 30 cepas diferentes de *Lactobacillus*. Y de estos se seleccionaron 10 tratamientos funcionales y 4 no funcionales. Previo al desarrollo de este trabajo de titulación las colonias aisladas de cada *Lactobacillus* se sembraron en 50 mL de caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) y se incubaron por 24 horas a 37°C en microaerofilia. Se separaron las células bacterias por filtración usando filtros con un poro de 0,22  $\mu$ m para posteriormente ser liofilizado.

Para su uso, los CFSs fueron rehidratados con agua destilada y el pH fue neutralizado usando NaOH a 1uM y HCl a 10Um, para conseguir un pH final de  $7 \pm 0.2$ . Los CFS rehidratados se almacenaron a -20 °C.

### 2.2. Tratamiento Antimicrobiano Previo de Líneas Celulares

Las líneas celulares fueron descongeladas y mantenidas en medio de cultivo suplementado con BM-Cyclin para asegurar la eliminación de cualquier posible contaminación bacteriana. Para preparar las soluciones de BM-Cyclin, se disolvieron 5 mg de BM-Cyclin-1 y 2.5 mg de BM-Cyclin-2 en 2 mL de solución salina tamponada PBS estéril o agua destilada estéril, obteniendo soluciones de stock con concentraciones de 2.5 mg/mL y 1.25 mg/mL, respectivamente. El medio de cultivo se suplementó con BM-Cyclin-1 a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL y con BM-Cyclin-2 a 5  $\mu$ g/mL, renovándose cada 3 días para BM-Cyclin-1 y cada 4 días para BM-Cyclin-2. Este tratamiento se realizó durante dos semanas siguiendo un estricto control de calidad para asegurar la correcta preparación y manejo de las soluciones.

### 2.3. Mantenimiento celular

Las líneas celulares HEP G2 y RAW 264.7 fueron descongeladas en el pase 14 y mantenidas en sus respectivos medios de cultivo. La línea HEP G2 se mantuvo en medio de

cultivo StableCell MEM (Medio Mínimo Esencial) de Sigma-Aldrich, suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % de piruvato de sodio, 1 % de aminoácidos esenciales y 1 % de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep). La línea RAW 264.7 se mantuvo en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de penicilina-estreptomicina (Pen-Strep). Las células de ambas líneas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas para asegurar condiciones óptimas de crecimiento celular. Los subcultivos de HEP G2 se llevaron a cabo al alcanzar una confluencia superior al 90 %, utilizando tripsina-EDTA para la disociación celular, asegurando así una correcta separación de las células adherentes del fondo del cultivo. Los subcultivos de RAW 264.7 se realizaron al alcanzar una confluencia superior al 90 %, utilizando resuspensión celular con cell scraper.

#### **2.4. Evaluación de Citotoxicidad por MTT**

La citotoxicidad de los tratamientos se evaluó mediante el ensayo de MTT siguiendo un protocolo estándar. Las células se sembraron en placas de 96 pocillo a una densidad de 20,000 células por pocillo y se incubaron a 37 °C, con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 14 horas para permitir su adhesión. Posteriormente, se añadieron los tratamientos a una concentración final de 20 mg/mL, la cuál previamente demostró ser la concentración más eficaz en términos de actividad antimicrobiana. Para cada pocillo, se añadieron 10 µL del tratamiento a 1600 mg/mL junto con 90 µL de medio, alcanzando un volumen final de 200 µL por pocillo. Los 15 tratamientos se probaron por triplicado, con tres réplicas biológicas de cada ensayo. Tras 72 horas de tratamiento, se añadieron 20 µL de la solución de MTT (5 mg/mL) a cada pozo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C, protegidas de la luz, para permitir la formación de cristales de formazán. Posteriormente, las placas fueron centrifugadas utilizando una centrífuga de placas a 4000 rpm durante 10 minutos para precipitar los cristales de

formazán. Se absorbió el medio cuidadosamente y los cristales se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO la absorbancia se midió a 570 nm, utilizando 630 nm como blanco, mediante un espectrofotómetro de placas. Luego, las absorbancias obtenidas a 570 nm se restaron de las de 630 nm para obtener las absorbancias finales. Este ensayo permitió cuantificar la viabilidad celular y evaluar la citotoxicidad inducida por los tratamientos.

## 2.5. Análisis estadístico

Una vez obtenido los datos de las réplicas, al ser no parámetros, se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis con el software bioinformático Rstudio (Das et.al, 2019) para determinar si existen diferencias significativas entre CFSs en los *Lactobacillus*. Una vez obtenido los resultados del test de Kruskal-Wallis, se realizó una prueba de Dunn con ayuda del paquete de rstudio FSA, con el fin de realizar un análisis post-hoc y realizar comparaciones y agrupar los tratamientos en base a su viabilidad celular, para determinar los grupos estadísticos.

La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo colorimétrico midiendo la absorbancia de las muestras a 570 nm y 630 nm. Para cada pozo, se calculó la absorbancia corregida restando el valor a 630 nm del valor a 570 nm, con el fin de eliminar interferencias. Posteriormente, la viabilidad se normalizó utilizando un control negativo (100% de viabilidad) y un control positivo (0% de viabilidad), aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular: } \frac{(\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia del control positivo})}{(\text{Absorbancia del control negativo} - \text{Absorbancia del control positivo})} * 100$$

Estos datos se presentados en el **Anexo 1** y **Anexo 2**. Finalmente, los valores porcentuales obtenidos de cada réplica se promediaron para generar un valor medio de viabilidad por tratamiento.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Viabilidad celular de HEPG2

Este diagrama de cajas y bigotes muestra el porcentaje de viabilidad celular de células HEPG2 tras la exposición a distintos CFS obtenidos de cepas/especies de *Lactobacillus*. En el eje vertical se indica la viabilidad celular (%), mientras que en el horizontal se representan los tratamientos: los primeros diez, en verde claro, corresponden a cepas funcionales con actividad antimicrobiana, y los restantes, en verde pantano, a cepas no funcionales sin dicha actividad. A la derecha se incluyen los controles (Eluyente, Negativo y Positivo). Cada caja representa el rango intercuartílico, la línea interna la mediana, y los bigotes el mínimo y máximo sin outliers. Las letras sobre las cajas indican grupos estadísticamente similares. En conjunto, se observa que las cepas funcionales suelen mantener mayor viabilidad celular, mientras que algunas cepas no funcionales muestran una reducción más marcada, lo que sugiere diferencias significativas en el efecto de los CFS sobre la supervivencia celular. Entre las cepas no funcionales se observa que *Lactobacillus gasseri* USFQ ejerce un marcado efecto citotóxico sobre las células HEPG2, reduciendo significativamente su viabilidad.

#### 3.2. Viabilidad celular RAW 264.7

La figura muestra el porcentaje de viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 tras la exposición a CFS de distintas cepas/especies de *Lactobacillus*. Las cajas y bigotes indican la distribución de la viabilidad para cada cepa y el control, marcando medianas, rangos intercuartílicos y posibles valores atípicos. En general, la mayoría de los tratamientos correspondientes a cepas funcionales (verde claro) presentan valores de viabilidad relativamente bajos, evidenciando un efecto más pronunciado sobre la supervivencia de estas células. En contraste, algunos tratamientos considerados no funcionales (tonos verde más oscuro) o los controles muestran porcentajes de viabilidad más elevados. De este modo, la

imagen sugiere diferencias importantes entre cepas con y sin actividad antimicrobiana respecto a su impacto en la viabilidad de macrófagos RAW 264.7.

### **3.3. Viabilidad de las células HEPG2 expuestas a distintos CFS**

La Tabla 1 presenta el porcentaje de viabilidad promedio de las células HEPG2, una línea celular derivada de hepatocarcinoma humano, al ser expuestas a diferentes supernatantes libres de células (CFS) producidos por distintas cepas de *Lactobacillus*. Entre los datos, se observa que el tratamiento con *L. acidophilus* ATCC 4356T mostró el mayor porcentaje de viabilidad celular (94.75%), indicando un bajo efecto citotóxico en estas células. En contraste, la cepa *L. gasseri* USFQ redujo significativamente la viabilidad celular, con un promedio de 47.15%, representando el efecto más citotóxico entre los tratamientos evaluados.

Otras cepas, como *L. crispatus* V217D y *L. gasseri* V140B, también presentaron altas viabilidades celulares, con promedios de 94.15% y 91.93%, respectivamente, valores que son comparables con los obtenidos por el control eluyente (89.36%). Por otro lado, *L. plantarum* NCCB 46043T mostró una viabilidad más baja (74.31%) en comparación con otras cepas como *L. plantarum* IM-USFQ (91.76%) y *L. acidophilus* USFQ (91.01%). Estas diferencias sugieren una variabilidad en la citotoxicidad de los CFS dependiendo de la cepa utilizada y su composición bioactiva.

### **3.4. Viabilidad de las células RAW 264.7 expuestas a distintos CFS**

La Tabla 2 muestra el porcentaje de viabilidad promedio de las células RAW 264.7, una línea celular de macrófagos derivados de ratón, expuestas a los mismos CFS utilizados en la Tabla 1. En este caso, el control eluyente registró el mayor porcentaje de viabilidad celular (75.33%), sugiriendo que los compuestos presentes en el eluyente tienen una toxicidad mínima en estas células inmunes.

El tratamiento con la cepa *L. gasseri* V254 resultó en el menor porcentaje de viabilidad celular (23.42%), evidenciando un impacto citotóxico significativo. Asimismo, otras cepas como *L. gasseri* V140B y *L. acidophilus* ATCC 4356T también mostraron bajas viabilidades, con promedios de 30.44% y 38.85%, respectivamente. En contraste, *L. reuteri* NCFB 2656T y *L. gasseri* V189D demostraron viabilidades más altas, con promedios de 49.48% y 62.24%, respectivamente, aunque aún por debajo del control.

*L. crispatus* V217D y *L. iners* ATCC 55195 presentaron viabilidades promedio de 46.25% y 48.85%, valores intermedios dentro del conjunto de datos. En general, las células RAW 264.7 mostraron una mayor susceptibilidad a los tratamientos con CFS en comparación con las HEPG2, ya que los porcentajes de viabilidad fueron consistentemente más bajos en esta línea celular. Esto podría reflejar una sensibilidad diferencial entre tipos celulares frente a los compuestos bioactivos presentes en los CFS.

#### 4. DISCUSIÓN

En el caso de las células HEPG2, observamos que cepas como *L. acidophilus* 26 y *L. crispatus* 11 mantuvieron una viabilidad celular cercana al 100%, lo que indica una ausencia de citotoxicidad significativa. Este hallazgo es relevante, ya que sugiere que estos CFS no afectan negativamente la integridad celular de los hepatocitos tumorales, posiblemente debido a una baja producción o ausencia de metabolitos citotóxicos en estas cepas (Xing et al., 2015). Por el contrario, cepas como *L. gasseri* USFQ y *L. plantarum* ATCC 4356T redujeron la viabilidad celular a valores entre el 30% y el 63%. Este efecto citotóxico pronunciado podría atribuirse a la producción de metabolitos bioactivos, tales como bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y otros compuestos con actividad antiproliferativa (Paiva et al., 2012).

La citotoxicidad observada en HEPG2 podría estar mediada por varios mecanismos moleculares. Estudios previos han demostrado que metabolitos de *Lactobacillus* pueden inducir apoptosis en células tumorales a través de la activación de vías intrínsecas, como la liberación de citocromo c y la activación de caspasas (Sharma et al., 2011). Además, el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede conducir a daños oxidativos en macromoléculas celulares, desencadenando procesos apoptóticos o necrotóficos (Circu & Aw, 2010). La modulación de proteínas clave del ciclo celular, como p53, p21 y ciclina D1, también puede contribuir a la detención del ciclo celular y a la inducción de muerte celular programada (Furumoto et al., 2016; Li et al., 2021). La capacidad selectiva de ciertas cepas para inducir citotoxicidad en células tumorales es de particular interés, ya que sugiere un potencial terapéutico en el tratamiento del carcinoma hepatocelular.

Las observaciones morfológicas mediante microscopía óptica corroboran estos hallazgos. Tras el tratamiento con *L. acidophilus* ATCC 4356T, se observaron alteraciones

morfológicas significativas, incluyendo células redondeadas y desprendimiento parcial de la superficie de cultivo. Estos cambios son indicativos de apoptosis o necrosis, lo que respalda la hipótesis de efectos citotóxicos mediados por los metabolitos presentes en los CFS (Behzadi et al., 2017; Sharma et al., 2011).

En cuanto a los macrófagos RAW 264.7, las cepas como *L. gasseri* V189D y el control eluyente presentaron viabilidades celulares altas, agrupándose en la familia E, con valores medios entre el 68% y el 83%. Sin embargo, la mayoría de las cepas funcionales mostraron una viabilidad celular significativamente reducida, con valores medios entre el 25% y el 54%. A diferencia de lo observado en HEPG2, esta disminución en la viabilidad celular no parece ser consecuencia de una citotoxicidad directa, sino más bien el resultado de la activación inmunológica de los macrófagos. La activación de macrófagos es un proceso complejo que implica cambios morfológicos y funcionales. Tras el tratamiento con los CFS, los macrófagos adoptaron una morfología alargada con múltiples filopodios y lamelipodios. Estas estructuras citoplasmáticas son indicativas de activación y están asociadas con una mayor capacidad de migración, fagocitosis y presentación de antígenos (Mei et al., 2023).

La interacción de componentes bacterianos presentes en los CFS con receptores tipo Toll (TLRs) en la superficie de los macrófagos, especialmente TLR2 y TLR4, podría desencadenar cascadas de señalización intracelular que conducen a la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Zheng et al., 2022). Estos factores promueven la transcripción de genes proinflamatorios, incluyendo citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, y moléculas coestimuladoras (Jang et al., 2006). La producción excesiva de estas citocinas puede conducir a la muerte celular inducida por activación (AICD) como mecanismo de regulación negativa para prevenir una respuesta inflamatoria descontrolada (Janssen et al., 2000).

La comparación de los efectos en ambas líneas celulares resalta la selectividad y especificidad de respuesta de los CFS. Mientras que ciertas cepas muestran citotoxicidad en

células tumorales hepáticas, no inducen una reducción significativa en la viabilidad de macrófagos, o lo hacen a través de mecanismos distintos a la citotoxicidad directa. Por ejemplo, *L. gasseri* USFQ mostró efectos citotóxicos en HEPG2, pero no afectó de manera adversa a los macrófagos, lo que podría indicar una selectividad hacia células tumorales hepáticas. Esta selectividad es de suma importancia, ya que un agente terapéutico ideal debe ser capaz de eliminar células malignas sin dañar a las células sanas del sistema inmunitario (Leamon & Low, 1994).

Las respuestas diferenciales pueden atribuirse a las características intrínsecas de cada línea celular. Las células HEPG2, al ser células tumorales, pueden tener una mayor susceptibilidad a la inducción de apoptosis por compuestos bioactivos debido a alteraciones en sus vías de señalización y mecanismos de reparación del ADN (Zhang et al., 2022). Por otro lado, los macrófagos son células altamente dinámicas que responden a estímulos externos con cambios funcionales y fenotípicos. La capacidad de los CFS para activar macrófagos podría ser aprovechada para potenciar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, lo cual es relevante en contextos de inmunodeficiencia o terapia antitumoral (Taverniti & Guglielmetti, 2011).

Estos hallazgos están en concordancia con investigaciones previas que reportan las propiedades antitumorales e inmunomoduladoras de metabolitos de *Lactobacillus*. Por ejemplo, estudios han demostrado que bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos pueden inducir apoptosis en células cancerígenas a través de la despolarización de la membrana mitocondrial y la activación de caspasas (Wang et al., 2022). Desde una perspectiva terapéutica, los CFS con capacidad para activar macrófagos podrían ser utilizados como inmunopotenciadores en pacientes inmunodeprimidos, tales como aquellos con infecciones crónicas, cáncer o sometidos a quimioterapia. La activación controlada de macrófagos puede mejorar la eliminación de patógenos, la presentación de antígenos y la activación de células T,

fortaleciendo así la respuesta inmunitaria global (Hou et al., 2019). Además, la citotoxicidad selectiva hacia células tumorales abre la posibilidad de aislar y caracterizar compuestos con actividad anticancerígena, contribuyendo al desarrollo de nuevos fármacos que puedan superar las limitaciones de las terapias actuales, como la resistencia a quimioterapéuticos y los efectos secundarios sistémicos (Shapira et al., 2011). Asimismo, dada la actividad antimicrobiana inherente de los CFS, existen oportunidades para su aplicación en la formulación de antibióticos tópicos o en la industria alimentaria como agentes conservantes naturales.

No obstante, es fundamental reconocer las limitaciones del presente estudio y las consideraciones necesarias para futuras investigaciones. La extrapolación de resultados *in vitro* a escenarios *in vivo* debe realizarse con cautela, ya que el entorno fisiológico es mucho más complejo y puede influir en la biodisponibilidad y actividad de los compuestos. Los mecanismos moleculares específicos son desconocidos. Técnicas como la espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución y análisis transcriptómicos y proteómicos podrían emplearse para identificar y cuantificar los metabolitos bioactivos y comprender sus interacciones con las células objetivo (Griffiths & Wang, 2009). Para avanzar en este campo, se recomienda profundizar en la caracterización de los metabolitos bioactivos presentes en los CFS y evaluar sus efectos en modelos animales y eventualmente en estudios clínicos.

## 5. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados presentados evidencian la capacidad diferenciada de los metabolitos presentes en los CFS de diversas cepas de *Lactobacillus* para influir en células tumorales hepáticas y macrófagos murinos, sugiriendo una compleja interacción dependiente del tipo celular y de las características intrínsecas de cada cepa. En las células HEPG2, ciertas cepas mostraron una marcada citotoxicidad asociada a posibles mecanismos apoptóticos, producción de ROS y modulación de proteínas reguladoras del ciclo celular, mientras que otras no afectaron su viabilidad. Por el contrario, en macrófagos RAW 264.7, la reducción de la viabilidad celular pareció relacionarse con la activación inmunológica más que con una citotoxicidad directa, reflejada en cambios morfológicos y la posible activación de vías de señalización proinflamatorias. Estas diferencias selectivas resaltan el potencial terapéutico de los CFS, tanto en la promoción de una respuesta inmunitaria más eficiente como en la inducción de muerte selectiva de células tumorales, sin comprometer la funcionalidad de las células inmunes. Sin embargo, se requiere mayor investigación para caracterizar en detalle los metabolitos bioactivos, sus mecanismos moleculares y su comportamiento en contextos fisiológicos más complejos, con miras a su futura aplicación clínica y el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales e inmunomoduladoras.

## 6. TABLAS

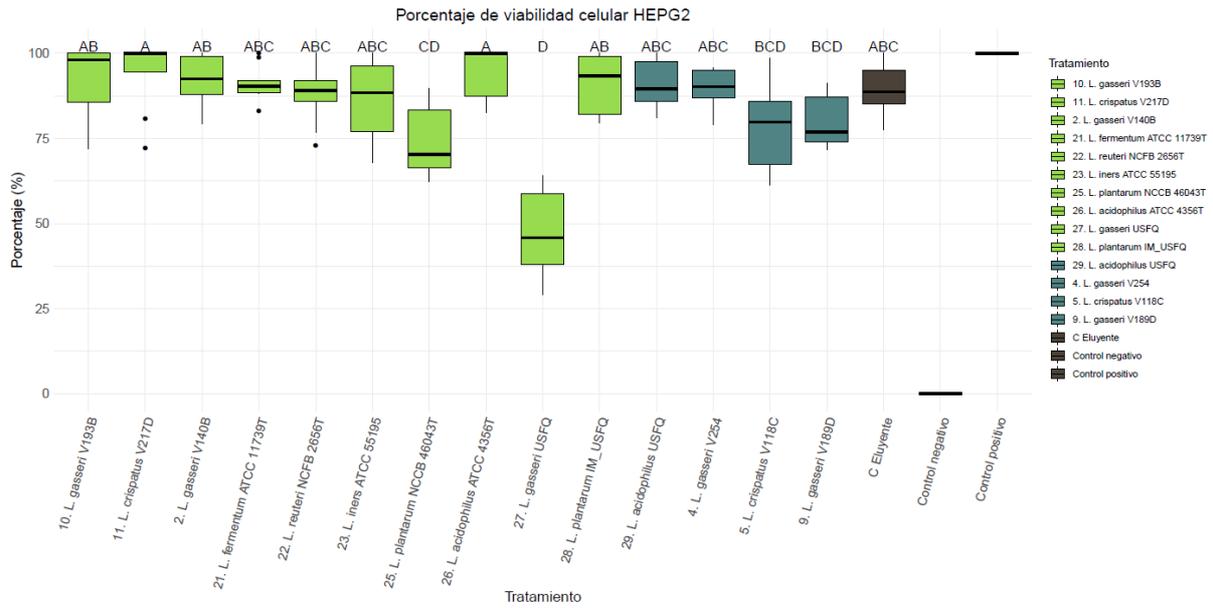
Tabla 1. Porcentaje de viabilidad promedio de HEPG2 al ser expuestos a distintos CFS.

Cepa/especie de <i>Lactobacillus</i>	Promedio de Viabilidad
28. <i>L. plantarum</i> IM-USFQ	91.76
25. <i>L. plantarum</i> NCCB 46043T	74.31
29. <i>L. acidophilus</i> USFQ	91.01
26. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356T	94.75
27. <i>L. gasseri</i> USFQ	47.15
4. <i>L. gasseri</i> V254	89.19
2. <i>L. gasseri</i> V140B	91.93
5. <i>L. crispatus</i> V118C	78.55
23. <i>L. iners</i> ATCC 55195	87.17
22. <i>L. reuteri</i> NCFB 2656T	87.64
9. <i>L. gasseri</i> V189D	79.53
10. <i>L. gasseri</i> V193B	91.73
11. <i>L. crispatus</i> V217D	94.15
21. <i>L. fermentum</i> ATCC 11739T	91.26
C Eluyente	89.36

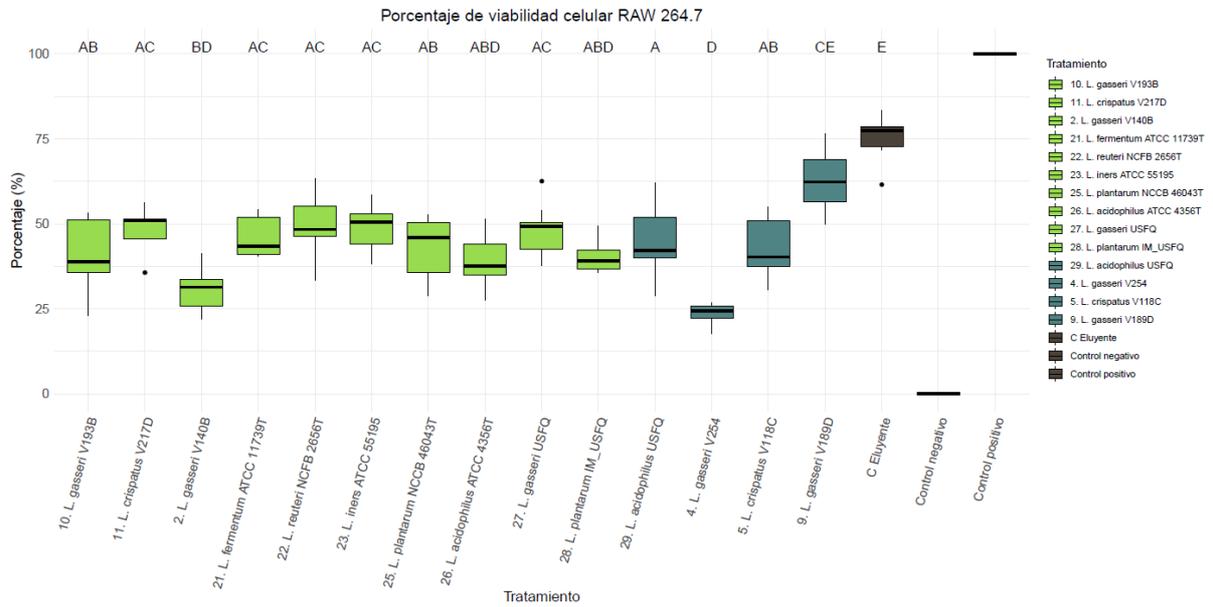
Tabla 2. Porcentaje de viabilidad promedio de RAW 264.7 al ser expuestos a distintos CFS.

Cepa/especie de <i>Lactobacillus</i>	Promedio de Viabilidad
28. <i>L. plantarum</i> IM-USFQ	40.44
25. <i>L. plantarum</i> NCCB 46043T	43.62
29. <i>L. acidophilus</i> USFQ	45.11
26. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356T	38.85
27. <i>L. gasseri</i> USFQ	48.32
4. <i>L. gasseri</i> V254	23.42
2. <i>L. gasseri</i> V140B	30.44
5. <i>L. crispatus</i> V118C	43.06
23. <i>L. iners</i> ATCC 55195	48.85
22. <i>L. reuteri</i> NCFB 2656T	49.48
9. <i>L. gasseri</i> V189D	62.24
10. <i>L. gasseri</i> V193B	40.80
11. <i>L. crispatus</i> V217D	48.88
21. <i>L. fermentum</i> ATCC 11739T	46.25
C Eluyente	75.33

### 7. FIGURAS



**Figura 1. Porcentaje de viabilidad celular de HEPG2.**



**Figura 2. Viabilidad celular RAW 264.7.**

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Bach, H., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity of protein-containing fractions isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1289–1296. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>
- Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2021). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), 2404–2429. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>
- Behzadi, E., Hosseini, M., & Rahimi, F. (2017). The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* metabolites on apoptosis pathways. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 856–867. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12729>
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Das, U., Hasan, M. A. M., & Rahman, J. (2019, February). Influential gene identification for cancer classification. In *2019 International Conference on Electrical, Computer and Communication Engineering (ECCE)* (pp. 1-6). IEEE. <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8679492>
- Freitas, A. D. S., Barroso, F. A. L., Campos, G. M., Américo, M. F., Viegas, R. C. D. S., Gomes, G. C., Vital, K. D., Fernandes, S. O. A., Carvalho, R. D. D. O., Jardim, J., Miranda, A. P. G. D. S., Ferreira, E., Martins, F. S., Laguna, J. G., Jan, G., Azevedo, V., & De Jesus, L. C. L. (2024). Exploring the anti-inflammatory effects of postbiotic

- proteins from *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA 133 on inflammatory bowel disease model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134216>
- Furumoto, K., Nanthirudjanar, T., & Shinohara, M. (2016). 10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid generated from linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* protects against oxidative stress. *Food Chemistry*, 213, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.091>
- Griffiths, W., & Wang, Y. (2009). Mass spectrometry: From proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society Reviews*, 38(7), 1882-1896. <https://doi.org/10.1039/b618553n>
- Hou, F., Li, G., & Wu, Z. (2019). Transcriptomic responses of macrophages to *Lactobacillus* components. *Cellular Immunology*, 334, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.01.003>
- Jang, C., Choi, J. H., & Byun, M. (2006). Chloroquine inhibits production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. *Rheumatology*, 45(6), 703-710. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel080>
- Janssen, O., Sanzenbacher, R., & Kabelitz, D. (2000). Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell and Tissue Research*, 301, 85-99. <https://doi.org/10.1007/s004419900155>
- Leamon, C. P., & Low, P. S. (1994). Selective targeting of malignant cells with receptor-specific ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 328-334. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74668-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74668-9)

- Li, T., Zhao, Y., & Zhang, H. (2021). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* mediate enhanced antioxidant effects. *Antioxidants*, *10*(3), Article 552. <https://doi.org/10.3390/antiox10030552>
- Liang, B., & Xing, D. (2023). The Current and Future Perspectives of Postbiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *15*(6), 1626–1643. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10045-x>
- McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(3), 285–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>
- McKillip, J. L., & Clancy, N. A. (2021). Antibiotic resistance crisis: Challenges and imperatives. *Biologia*, *76*, 2929–2940. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00697-x>
- Mei, Y., Huang, J., & Li, Z. (2023). Cytoskeleton network participates in the anti-infection immune response and macrophage activation. *Cellular and Molecular Immunology*, *20*(2), 345-355. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00993-8>
- Nataraj, B. H., & Mallappa, R. H. (2021). Antibiotic Resistance Crisis: An Update on Antagonistic Interactions between Probiotics and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Current Microbiology*, *78*(6), 2194–2211. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02442-8>
- Niles, A. L., Moravec, R. A., & Riss, T. L. (2008). Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *3*(6), 655–669. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.6.655>

- Omak, G., & Yilmaz-Ersan, L. (2022). Effect of *Cordyceps militaris* on formation of short-chain fatty acids as postbiotic metabolites. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(10), 1142–1150. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2033992>
- Özcelik, S., Kuley, E., & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT*, 73, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>
- Paiva, A. D., de Oliveira, M. D., de Paula, S. O., Baracat-Pereira, M. C., Breukink, E., & Mantovani, H. C. (2012). Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. *Microbiology*, 158(11), 2851–2858. <https://locus.ufv.br/items/5e95a7b3-7b3c-4944-99c4-6c0539e95cf6>
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649–667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Scillato, M., Spitale, A., Mongelli, G., Privitera, G. F., Mangano, K., Cianci, A., Stefani, S., & Santagati, M. (2021). Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1173. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>
- Sharma, R., Singh, R., & Saini, A. (2011). Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during apoptosis in cancer cells. *Journal of Oncology Research*, 24(2), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2011.02.008>

- Shapira, A., Livney, Y., Broxterman, H., & Assaraf, Y. (2011). Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 14(3), 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.003>
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics): Impact on innate and adaptive immune responses. *Beneficial Microbes*, 2(1), 17–30. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0031>
- Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. En M. Vinken & V. Rogiers (Eds.), *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 333–348). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26)
- Tonholo, D. R., Maltarollo, V. G., Kronenberger, T., Silva, I. R., Azevedo, P. O., Oliveira, R. B., Souza, L. C. R., & Tagliati, C. A. (2020). Preclinical toxicity of innovative molecules: In vitro, in vivo and metabolism prediction. *Chemico-Biological Interactions*, 315, 108896. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108896>
- Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszczyńska, E., & Ałtyn, I. (2019). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biologica (Praha)*, 67(2), 58–64. <https://doi.org/10.1515/fobio-2017-0006>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 731, 237–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
- Vinderola, G., Sanders, M. E., & Salminen, S. (2022). The Concept of Postbiotics. *Foods*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/foods11081077>

- Wang, H., Zhang, C., Li, M., Liu, C., Wang, J., Ou, X., & Han, Y. (2022). Antimicrobial peptides mediate apoptosis by changing mitochondrial membrane permeability. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), Article 12732. <https://doi.org/10.3390/ijms232112732>
- Xing, J., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Gu, Z., Zhang, H., ... & Chen, W. (2015). Determining antioxidant activities of lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: a comparison with traditional methods. *PloS one*, 10(3), e0119058. <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0119058&type=printable>
- Yuanbin Liu. (2002). Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 581–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
- Zhang, L., Yu, L., & Wang, X. (2022). Advances in bioactive compounds from natural sources for therapeutic applications. *Journal of Cellular Biochemistry*, 123(4), 654-672. <https://doi.org/10.1002/jcb.123456>
- Zheng, H., Ahmad, S., & Lee, C. H. (2022). *Lactobacillus rhamnosus* CY12 enhances macrophage activation via TLR pathways. *Immunology Letters*, 214, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2022.06.004>
- Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>

## ANEXOS

## Anexo 1: Absorbancia y conversión de viabilidad en HEPG2.

28. <i>L. plantarum</i> IM-USFQ					
OD			% Viability		
0.929	0.793	1.060	93.379	79.525	100.000
0.594	0.587	0.702	82.116	81.120	97.486
1.281	1.145	1.077	100.000	99.082	93.137

25. <i>L. plantarum</i> NCCB 46043T					
OD			% Viability		
1.454	1.022		89.050	62.279	
1.048	1.331	1.466	63.898	81.395	89.794
1.108	1.103	1.197	67.616	67.310	73.128

29. <i>L. acidophilus</i> USFQ					
OD			% Viability		
1.071	0.884	0.855	100.000	88.795	85.840
0.594	0.587	0.702	82.116	81.120	97.486
1.089	1.262	1.036	94.186	100.000	89.553

26. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356T					
OD			% Viability		
1.665	1.713	1.919	100.000	100.000	100.000
0.632	0.598	0.597	87.524	82.685	82.543
1.184	1.233	1.151	100.000	100.000	100.000

27. <i>L. gasseri</i> USFQ					
OD			% Viability		
0.484	1.049		29.034	63.985	
0.993	0.874		60.486	53.137	
	0.624	0.638		37.696	38.570

4. <i>L. gasseri</i> V254					
OD			% Viability		
1.292	1.555	1.552	79.033	95.262	95.087
1.431	1.473	1.526	87.607	90.187	93.468
1.565	1.298	1.418	95.874	79.383	86.819

2. <i>L. gasseri</i> V140B					
OD			% Viability		
0.984	0.889	0.876	98.981	89.304	87.980
0.667	0.813	0.574	92.505	81.562	79.269
1.275	1.330	1.130	100.000	100.000	97.771

5. <i>L. crispatus</i> V118C					
OD			% Viability		
1.007	1.304	1.565	61.361	79.777	95.918
1.608	1.011	1.329	98.586	61.623	81.308
1.405	1.103	1.228	85.988	67.310	75.052

23. <i>L. iners</i> ATCC 55195					
OD			% Viability		
0.881	0.764	0.680	88.489	76.570	68.014
0.688	0.559	0.597	95.493	77.135	82.543
1.113	1.164	1.223	96.284	100.000	100.000

22. <i>L. reuteri</i> NCFB 2656T					
OD			% Viability		
0.765	0.871	0.892	76.672	87.470	89.610
0.620	0.529	0.663	85.816	72.865	91.935
1.190	1.030	1.102	100.000	89.028	95.323

9. <i>L. gasseri</i> V189D					
OD			% Viability		
1.173	1.258	1.488	71.640	76.890	91.150
1.468	1.177	1.423	89.881	71.903	87.125
1.292	1.210	1.215	79.033	73.915	74.221

10. <i>L. gasseri</i> V193B					
OD			% Viability		
0.933	1.528	0.853	93.786	100.000	85.637
0.551	0.523	1.014	75.996	72.011	100.000
1.269	1.134	1.230	100.000	98.120	100.000

11. <i>L. crispatus</i> V217D					
OD			% Viability		
1.991	2.096	2.238	100.000	100.000	100.000
1.216	1.270	1.148	100.000	100.000	100.000
0.935	1.093	0.836	80.723	94.536	72.068

21. <i>L. fermentum</i> ATCC 11739T					
OD			% Viability		
0.900	0.900	0.880	90.424	90.424	88.387
0.600	0.650	0.663	82.970	90.085	91.935
1.021	1.143	1.198	88.241	98.907	100.000

OD C eluyente					
OD			% Viability		
0.930	0.898	0.868	93.480	90.221	87.165
0.892	0.575	1.254	100.000	79.412	100.000
1.007	0.899		87.017	77.575	

Control Positivo			Control negativo		
OD			OD		
0.904	1.117	0.961	0.016	0.011	0.010
0.729	0.759	0.671	0.014	0.016	0.021
0.712	1.183	1.128	0.011	0.012	0.012

## Anexo 2: Absorbancia y conversión de viabilidad en raw 264.7.

28. <i>L. plantarum</i> IM-USFQ					
OD			% Viability		
0.72	0.76	0.69	37.36	39.06	35.56
0.67	0.57	0.76	42.23	35.60	48.22
0.71	0.88	0.66	39.85	49.33	36.73

25. <i>L. plantarum</i> NCCB 46043T					
OD			% Viability		
0.88	0.70	0.57	45.90	35.78	28.88
0.78	0.83	0.83	49.52	52.78	52.58
0.62	0.90	0.76	34.60	50.37	42.22

29. <i>L. acidophilus</i> USFQ					
OD			% Viability		
0.57	0.75	0.99	28.94	38.95	51.86
0.85	0.67	0.98	53.95	42.17	62.15
0.83	0.72	0.74	46.50	39.97	41.47

26. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356T					
OD			% Viability		
0.55	0.69	0.59	27.63	35.56	30.03
0.81	0.76	0.70	51.34	48.03	44.12
0.63	0.73	0.67	34.89	40.49	37.54

27. <i>L. gasseri</i> USFQ					
OD			% Viability		
0.95	0.91	0.96	49.67	47.59	50.27
0.66	0.60	0.78	41.52	37.68	49.33
0.76	1.11	0.96	42.51	62.50	53.83

4. <i>L. gasseri</i> V254					
OD			% Viability		
0.16	0.13	0.15	26.91	22.61	25.90
0.15	0.15	0.13	25.90	25.57	22.16
0.12	0.11	0.14	19.59	17.69	24.45

2. <i>L. gasseri</i> V140B					
OD			% Viability		
	0.19	0.18		34.01	31.38
0.15	0.23	0.15	26.13	41.28	25.34
0.13	0.19		21.88	33.06	

5. <i>L. crispatus</i> V118C					
OD			% Viability		
0.66	0.73	0.97	33.75	37.42	50.88
0.81	0.64	0.49	51.15	40.22	30.72
0.98	0.90	0.68	54.93	50.60	37.89

23. <i>L. iners</i> ATCC 55195					
OD			% Viability		
1.01	0.96	0.94	53.12	50.49	49.12
0.70	0.67	0.61	43.99	42.43	38.33
1.04	0.90	0.94	58.63	50.54	53.02

22. <i>L. reuteri</i> NCFB 2656T					
OD			% Viability		
0.86	1.05	0.89	44.75	55.31	46.23
0.81	0.53	0.74	51.15	33.38	46.79
1.12	0.99	0.86	63.30	55.97	48.40

9. <i>L. gasseri</i> V189D					
OD			% Viability		
1.30	1.44	1.32	68.93	76.48	69.80
0.89	0.92	0.98	56.49	58.76	62.34
0.91	0.89	1.18	50.89	49.85	66.60

10. <i>L. gasseri</i> V193B					
OD			% Viability		
0.75	0.69	0.97	38.89	35.67	51.04
0.83	0.84	0.76	52.39	53.30	48.22
0.42	0.47	0.69	23.10	25.93	38.64

11. <i>L. crispatus</i> V217D					
-------------------------------	--	--	--	--	--

21. <i>L. fermentum</i> ATCC 11739T					
-------------------------------------	--	--	--	--	--

OD			% Viability		
0.98	0.88	0.88	51.31	45.68	45.68
0.88	0.83	0.80	56.16	52.71	50.95
0.90	0.92	0.64	50.37	51.52	35.52

C eluyente					
OD			% Viability		
0.45	0.42	0.34	83.43	77.95	61.62
0.42	0.39	0.40	76.77	71.69	73.08
0.43	0.43		79.90	78.23	

OD			% Viability		
0.23	0.30		41.05	54.13	
0.29	0.23	0.23	52.90	50.89	40.61
0.24	0.28		43.46	40.72	

Control positivo			Control negativo		
OD			OD		
0.79	2.43	2.39	0.03	0.04	0.05
1.69	1.43	1.56	0.02	0.02	0.03
1.89	1.70	1.67	0.03	0.02	0.02