



Evaluación de los efectos intestinales y cambios en la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* cepa mutante AXI410 y cepa silvestre N2 expuestas a la acción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

Autores

Dayana Solano Meneses

Everth David Marmolejo González

Asesora Interna

Esp MSc Martha Gómez Jiménez

Asesora

MSc PhD Ruth Mélida Sánchez Mora

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ, 2022



Evaluación de los efectos intestinales y cambios en la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* cepa mutante AX1410 y cepa silvestre N2 expuestas a la acción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*

Laureada: _____

Meritoria: _____

Aprobada: _____

Jurados: Ana Isabel Oliver Pavajeau

José Arturo Gutiérrez Triana

Asesora interna: Esp MSc Martha Gómez Jiménez

Asesora: MSc PhD Ruth Mélida Sánchez Mora

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ, 2022

DEDICATORIA

Dedicamos el presente trabajo a nuestros familiares, amigos y docentes que contribuyeron en la realización y culminación de este proyecto, ya que sin ellos no hubiera sido posible llegar hasta este punto; reconocemos que el camino no fue fácil, pero gracias a su apoyo y comprensión incondicional los resultados fueron satisfactorios.

Cada uno de ustedes, fue una parte clave en el desarrollo de nuestra tesis, no solo por las contribuciones intelectuales sino también en las palabras que cada día nos ayudaban a no rendirnos a pesar de las adversidades.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a Dios, por abrir caminos en nuestra tesis y darnos la sabiduría para poder tomar decisiones en todo el transcurso de nuestra tesis lo que permitió culminar satisfactoriamente nuestro proyecto.

En segundo lugar, queremos agradecer a nuestras mamás, Luz Marina y Sandra Gonzalez, las cuales nos dieron apoyo en todo momento, al igual que a Julio Cesar Solano, Paula Solano y Natalia Solano que en cada tropiezo nos dieron una voz de aliento para llegar a nuestra meta.

Finalmente, agradecemos a nuestras asesoras de tesis y demás docentes que nunca dudaron en ayudarnos a llevar el desarrollo del trabajo por un mejor camino, obteniendo como resultado nuestro trabajo de investigación, esperamos que sea de agrado y logre reflejar el buen camino de aprendizaje que nos ha brindado la universidad en estos años.

TABLA DE CONTENIDO

Índice de figuras

Índice de gráficas

Índice de tablas

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. ANTECEDENTES
2. MARCO REFERENCIAL
 - 2.1. Probióticos
 - 2.2. Selección de probióticos
 - 2.3. *Lactobacillus spp* uno de los principales géneros probióticos
 - 2.4. Viabilidad y probióticos
 - 2.5. Modelos para el estudio de probióticos
 - 2.5.1. *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio en diferentes enfermedades.
3. DISEÑO METODOLÓGICO
 - 3.1. Cultivo y mantenimiento del nematodo
 - 3.2. Cultivo y mantenimiento de bacterias probióticas
 - 3.3. Sincronización del nematodo
 - 3.4. Determinación de la concentración ideal del probiótico
 - 3.5. Ensayo de preferencia alimentaria
 - 3.6. Determinación de la vida útil del nematodo frente al tratamiento probiótico
 - 3.7. Observación de cambios a nivel intestinal del nematodo frente al probiótico
 - 3.8. Análisis estadístico
4. RESULTADOS
 - 4.1. Identificación de los estadios larvarios de *C. elegans*
 - 4.2. Concentración óptima de *L. rhamnosus* y *L. plantarum* incorporados en la dieta de *C. elegans*
 - 4.3. Preferencia de *C. elegans* por el estado de la dieta
 - 4.4. Longevidad de *C. elegans* tras el consumo de concentraciones seleccionadas del probiótico
 - 4.5. Supervivencia al estrés térmico tras el consumo de *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.
 - 4.6. Evaluación cualitativa de la grasa intestinal en *C. elegans* tras el consumo de *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.
5. DISCUSIÓN
6. CONCLUSIONES
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
8. ANEXOS

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de *Lactobacillus* según el tipo de fermentación.

Figura 2. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus*, mediante la recuperación bacteriana de probiótico multicanal comercial.

Figura 3. Flujograma del protocolo de sincronización utilizado en la investigación.

Figura 4. Flujograma para el ensayo de concentración ideal del probiótico, en base a la normativa establecida por la FAO/OMS.

Figura 5. Procedimiento de longevidad para *C. elegans* cepas N2 y AX1410.

Figura 6. Ensayo de resistencia al estrés térmico.

Figura 7. Protocolo tinción de lípidos intestinales con rojo de Nilo.

Figura 8. Ciclo de vida de *C. elegans* cepa silvestre N2

Figura 9. Diferencias morfológicas entre las cepas AX1410 y N2 del nematodo *C. elegans*.

Figura 10. Evaluación cualitativa de la acumulación de lípidos intestinales en la cepa N2 de *C. elegans* tras el consumo de cepas probióticas.

Figura 11. Evaluación cualitativa de la acumulación de lípidos intestinales en la cepa mutante AX1410 de *C. elegans* tras el consumo de cepas probióticas.

Índice de gráficas

Gráfica 1. Diferencias entre tiempos de duración de los estadios larvarios de la cepa N2 y AX1410.

Gráfica 2. Evaluación de los parámetros de reproducción, movilidad, longitud y grosor de la cepa N2 de *C. elegans* a diferentes concentraciones del probiótico.

Gráfica 3. Evaluación de los parámetros de reproducción, movilidad, longitud y grosor de la cepa AX1410 de *C. elegans* a diferentes concentraciones del probiótico.

Gráfica 4. Longevidad de *C. elegans* N2 tras la exposición a dieta probiótica.

Gráfica 5. Longevidad de la cepa mutante AX1410 de *C. elegans* frente a la exposición con probióticos.

Gráfica 6. Supervivencia al estrés térmico en la cepa N2 tras la exposición con *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.

Gráfica 7. Supervivencia al estrés térmico en la cepa AX1410 tras la exposición con *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.

Índice de tablas

Tabla 1. Tabla nutricional del probiótico Jarro-Dophilus EPS. La tabla muestra la composición microbiológica del probiótico Jarro-Dophilus EPS.

Tabla 2. Consolidación de artículos para la determinación de posibles concentraciones en el tratamiento probiótico.



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

*Evaluación de los efectos intestinales y cambios en la longevidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* cepa mutante AX1410 y cepa silvestre N2 expuestas a la acción de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum**

RESUMEN

Al ser una puerta de entrada de diferentes agentes biológicos, el sistema digestivo alberga gran cantidad de bacterias, correspondiente aproximadamente a un 90% de la flora general del intestino, considerándose uno de los lugares en donde estos microorganismos tienen mayor impacto; de hecho, se ha visto que dicha influencia tiene un efecto positivo en otros sistemas al intervenir en procesos metabólicos, de estimulación celular o protección a infecciones, por lo que en la actualidad este sistema es considerado un blanco terapéutico prometedor para diversas enfermedades y garantizar su estabilidad es un reto para los investigadores.

Con respecto a esto, los probióticos resultan ser una herramienta efectiva para el mantenimiento de este sistema, ya que contribuyen a la estabilización y recuperación de la flora intestinal, siendo *Lactobacillus* uno de los géneros con mayor cantidad de cepas implementadas. A pesar de esto y de su potencial como herramienta terapéutica, requieren de mayores estudios que esclarezcan los mecanismos por los cuales actúan, lo que puede realizarse por medio de la exposición de modelos biológicos de estudio a diferentes cepas de este género (1).

Por lo anterior, en el presente estudio se evaluaron dos cepas de *Lactobacillus*, usando *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio por sus características morfológicas a nivel intestinal, ventajas en el costo de mantenimiento y facilidad de monitoreo, con el fin de ampliar los conocimientos ante el microorganismo probiótico y proponer al mismo como herramienta terapéutica ante patologías relacionadas con el eje intestinal.

Palabras clave: Probióticos, modelo de estudio, sistema digestivo, herramientas terapéuticas.

Introducción

Actualmente el interés por estudiar microorganismos como alternativas terapéuticas ha ido en aumento, ya que muchos de ellos proporcionan condiciones más seguras para el organismo y disminuyen efectos adversos que los medicamentos pueden causar a mediano y largo plazo; dentro de este importante grupo de microorganismos se encuentran los probióticos, los cuales proporcionan beneficios en la industria alimentaria y en el campo médico (2), teniendo un gran potencial como herramientas terapéuticas en enfermedades como la diabetes, esclerosis múltiple (EM) y disbiosis causada por antibióticos, en donde puede verse comprometida la salud intestinal. Estos microorganismos tienen la capacidad de regular y estabilizar la microbiota intestinal y por consiguiente pueden influir sobre funciones metabólicas e inmunológicas que contribuyen al mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes (3)(4).

Dentro del grupo de los probióticos, el *Lactobacillus* es uno de los géneros más estudiados y con mayor cantidad de cepas implementadas, estas bacterias Gram positivas tienen la capacidad de adherirse a la pared intestinal mejorando la mucosa y evitando la colonización de patógenos, además de estimular la respuesta inmune celular por medio de la influencia sobre macrófagos y células epiteliales (5). Es por esta razón, que en la actualidad se comercializan productos que contienen *Lactobacillus* o liofilizados del mismo, usándolos como complemento terapéutico en enfermedades intestinales o como suplemento en la dieta con el fin de mejorar la flora intestinal (2). Sin embargo, aún no se conoce claramente el mecanismo de acción de estos microorganismos, lo que hace que no se puedan implementar como terapia establecida sino como un complemento de estas (6).

Con respecto a esto, es importante mencionar que para el estudio de probióticos es necesario, en una primera etapa, tener un modelo adecuado y con similitudes moleculares y celulares al ser humano que permitan un análisis aproximado de lo que podría llegar a realizar el microorganismo dentro del cuerpo (7); es así, que en la actualidad el uso de nuevos modelos de investigación contribuyen a la formulación de proyectos de investigación que impactan en la salud humana, entre ellos *Caenorhabditis elegans*, ha tomado gran importancia debido a que fue el primer organismo multicelular cuyo genoma se secuenció por completo, se han identificado homólogos en *C. elegans* para 60-80% de genes humanos. Por otro lado, la diversidad de cepas mutantes y mutante que pueden encontrarse hoy en día, así como las cualidades morfológicas permiten fácilmente la observación de la acción de los microorganismos dentro del intestino del nematodo (4).

A raíz de esto, el presente estudio realizó un análisis de cómo *Lactobacillus spp* podía influir en la longevidad y calidad de vida de larvas de *C. elegans* cepa silvestre y mutante AX1410, esta última proviene de la modificación del genoma en *flp-18*, un gen que codifica para el neuropéptido relacionado con la FMR familia FLP-18 ; dicho estudio, se realizó mediante la implementación del probiótico en la dieta del nematodo y la observación de parámetros como longevidad, acumulación de grasas y resistencia al estrés térmico, con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de este género bacteriano, así como determinar su efectividad y en un futuro

poder implementarlo como una terapia más amigable con el organismo ante enfermedades que comprometen al sistema digestivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos intestinales y cambios de longevidad producidos en *Caenorhabditis elegans* cepa mutante AX1410 y cepa silvestre N2 tras la exposición con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir la concentración óptima de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* incorporados en la dieta de *C. elegans* AX1410 y N2 por medio de la evaluación de reproducción, movilidad, longitud y grosor, teniendo en cuenta el principio establecido por la FAO/OMS.

Identificar cambios en la longevidad y supervivencia al estrés térmico de *C. elegans* AX1410 y N2 tras el consumo de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*.

Determinar cambios en la acumulación de grasas a nivel intestinal en *C. elegans* AX1410 y N2 tras la alimentación con *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*.

1. ANTECEDENTES

En la actualidad el prolongar la vida en diferentes especies ha tomado un gran interés, es así como el ser humano, ha intentado mejorar sus condiciones de salud y estas impactan directamente en la longevidad, esto se evidencia en diferentes investigaciones y un ejemplo más concreto, se encuentra en una serie de estudios planteados por Muñoz MJ. (1) en donde evalúa la longevidad del nematodo *C. elegans* y qué mecanismos podrían estar implicados en la extensión de su vida, en el mismo se puede ver la relación con la resistencia al estrés térmico y las vías activadas en el mismo. Cabe resaltar que, en la búsqueda de estrategias para el alargamiento de la vida y el esclarecimiento de mecanismos usados por los organismos, los investigadores se han interesado en los probióticos, ya que son microorganismos prometedores para el mantenimiento de la salud.

La palabra probióticos proviene del griego pro-vida y actualmente se sabe que son aquellos microorganismos que contribuyen a un buen funcionamiento del organismo, mejorando la calidad de la vida e interviniendo en funciones de regulación y control de diferentes procesos metabólicos, lo cual se ha demostrado mediante diversos estudios y acontecimientos a través de la historia; aunque el término prebiótico fue introducido hace algunos años, su papel como microorganismos benéficos ha tenido gran importancia, evidenciándose en textos antiguos como la biblia, en pocas palabras se puede decir que su uso data de hace más de 1000 años (2). A través de los años los probióticos han sido usados en diferentes procesos como en la producción de alimentos (queso, yogur, vinagre, licores entre otros), debido al potencial regulador que se ha reportado sobre la microbiota intestinal; igualmente se han usado como ayuda terapéutica ante enfermedades como la diarrea y disminuyendo la disbiosis desarrollada en las mismas, lo que denota una gran importancia y utilidad de estos microorganismos. Al mismo tiempo, la regulación del microbiota podría relacionarse con problemas metabólicos, entre los que se destaca la obesidad, la cual puede desencadenar a largo plazo problemas como diabetes tipo II, enfermedad coronaria e hipertensión arterial (3)(4).

Cabe resaltar, que al ser importantes contribuyentes en procesos industriales, en especial en fermentación, dichos microorganismos han sido nombrados como ácido lácticos en donde los principales exponentes son bacterias Gram positivas, cocoides o bacilares y generalmente anaerobias facultativas, siendo *Lactobacillus* uno de los géneros más utilizados y caracterizados, de hecho un artículo publicado en 2008 por Sáenz et al. menciona la clasificación del mismo según el tipo de fermentación que realiza, lo que resulta muy útil para la identificación de especies (5). Así mismo, en 2012 Salvetti et al, publican un artículo en donde se evidencia una actualización taxonómica del género, usando métodos moleculares, lo que es de vital importancia en la evaluación y establecimiento de probióticos, ya que se ha visto que no todas las cepas tienen el mismo mecanismo de acción, aun si estas son del mismo género y especie (6)(7). Agregando a lo anterior, Kim Y y Mylonakis E. en 2012 publican un artículo titulado “*C. elegans* Immune Conditioning with the Probiotic Bacterium *Lactobacillus acidophilus* Strain NCFM Enhances Gram-Positive Immune Responses”, en donde mencionan cómo *Lactobacillus* contribuye al desarrollo inmunológico de *C. elegans*, evidenciado por la resistencia a bacterias

patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis*, a través de la estimulación de vías de señalización (8).

Específicamente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los probióticos como “aquellos microorganismos vivos que administrados en una cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped” (2), lo que implica una serie de acciones para el cumplimiento de esta definición;

Adicionalmente, diferentes investigaciones hasta el momento han demostrado que dentro de este importante grupo pueden encontrarse hongos, levaduras y bacterias, siendo el último, el grupo más utilizado dentro de los probióticos (9); los microorganismos bacterianos permiten un desarrollo en el equilibrio del organismo, de manera que ejercen efectos positivos en el mismo y tales hallazgos se han probado en modelos de estudio como moscas, nematodos y ratones, los cuales permiten identificar efectos similares que se presentarán en el humano, sobre todo los datos relacionados con la reproducción, el metabolismo de grasas y la duración de la vida (10)(11). Lo anterior está relacionado con que gran parte de los microorganismos integrantes de la microflora normal del cuerpo, lo constituyen las bacterias, cumpliendo un papel fundamental como barrera protectora a lo largo del organismo, en especial en el tracto digestivo bajo (12).

Como se mencionó anteriormente, dentro del proceso de seleccionar un organismo probiótico, hay que tener en cuenta una serie de características que se determinan en el laboratorio con la finalidad de elaborar un producto inocuo, dentro de ellas se encuentran: la caracterización detallada de la cepa potencialmente probiótica, la tolerancia a diferentes ácidos gástricos, una concentración adecuada de la misma que se determina por medio de ensayos in vitro e in vivo y la carencia de factores de virulencia o producción de toxinas, siendo esta última la característica más importante en el proceso (12).

Por otra parte, uno de los primeros científicos interesados en estos microorganismos fue el microbiólogo y zoólogo Élie Metchnikoff, el cual introdujo conceptos relacionados con la inflamación intestinal y el papel de bacterias ácido lácticas en los procesos de regulación, al igual que el papel de la flora intestinal en el desarrollo de condiciones médicas relacionadas con la edad(13); aunque en su momento las premisas propuestas por Metchnikoff no fueron tomadas en serio, hoy en día muchas industrias multimillonarias tanto a nivel alimenticio como médico, las toman como base en sus procesos de producción e igualmente como ya lo planteaba el reconocido microbiólogo, son necesarios estudios que esclarezcan la relación entre las bacterias y el organismo con el fin de entender su papel en procesos metabólicos, desarrollo de enfermedades y prolongación de la vida (9). A raíz de lo anterior, en la actualidad existe todo un proyecto dedicado al estudio de estos microorganismos y su relación con el cuerpo humano, conocido como Human Microbiome Project, iniciativa de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos lanzado en el 2007 (3); a partir del mismo, muchos grupos de investigación han venido estudiando la amplia gama de microorganismos encontrados en la flora intestinal e igual se han analizado otros géneros que son considerados probióticos o con características potenciales, junto con técnicas que ayuden a observar y evaluar los efectos producidos por estos en el organismo (4)(5)(7).

Con respecto a esto, es importante resaltar el papel que *Lactobacillus* tiene actualmente, siendo utilizado no solo en el área industrial sino también en el área clínica, interviniendo en diferentes procesos mejorando las condiciones de vida en personas con enfermedades neurológicas, digestivas, cognitivas e infecciosas, probados mediante diferentes estudios clínicos (14); con respecto a los estudios anteriormente citados, Azat R et al. en 2016 publica un artículo titulado “Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese”, en donde exponen que mediante el aislamiento de cepas probióticas en alimentos, también es posible estudiar el potencial de los mismos en la salud de los seres vivos (15). A pesar de esto, aún la lista de probióticos es muy limitada, por lo que es necesario el estudio de otras especies que amplíen la gama de opciones terapéuticas amigables con el organismo.

Estos microorganismos del género *Lactobacillus* ya hoy en día son sometidos a ensayos para evaluar su participación en la longevidad de diferentes organismos como *C. elegans* y ratones, tal es el caso de un estudio desarrollado en Japón en el cual utilizaron *Lactobacillus gasseri* SBT2055, para analizar los mecanismos bacterianos utilizados en la extensión de vida de nematodos, tras un previo consumo del probiótico y para este caso llevaron a cabo un control sobre la vida, acumulación de grasas y la resistencia al estrés de *C. elegans*. Por lo que se concluye que *Lactobacillus Gasseri* SBT2055 tiene efectos benéficos sobre el nematodo, en donde al final concluyen que la concentración del probiótico influye en la longevidad y en aspectos funcionales como la locomoción (11).

Uno de los criterios que se estudia, es el papel de los probióticos frente al estrés. En este sentido, Smolentseva O et al, publicó en 2017 un artículo titulado “Mechanism of biofilm-mediated stress resistance and lifespan extension in *C. elegans*”, en donde se observa la utilidad de los biofilms en *C. elegans*, al exponerlos a tres cepas bacterianas; dentro de los beneficios encontrados está la resistencia al estrés oxidativo y térmico, la extensión de la vida útil del nematodo y la disminución de infecciones. Una de las bacterias estudiadas fue *Lactobacillus rhamnosus*, la cual mostró una gran utilidad frente al estrés térmico desarrollado por *C. elegans* en comparación con las otras especies bacterianas en estudio (16).

Con el fin de conocer otros efectos atribuidos a los probióticos en el intestino, se han realizado estudios que muestran información sobre el metabolismo del nematodo, dichas investigaciones analizan criterios genéticos, así como sustancias que intervienen en el gasto de energía, por ejemplo, el análisis del perfil lipídico. Para entender el porqué de este enfoque investigativo, se debe conocer cómo funciona el metabolismo en *C. elegans*; Este nematodo de manera general se alimenta de carbohidratos, proteínas y lípidos (conjunto heterogéneo de biomoléculas orgánicas no polares, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos que desempeñan diferentes funciones biológicas), componentes principales de estructuras bacterianas, las cuales al ser digeridas

se descomponen y aportan los nutrientes necesarios para su supervivencia (17) .

Es importante tener en cuenta que el estudio de estos parámetros requiere también de una metodología a implementar con el fin de garantizar que los resultados sean confiables. Con relación a esto Yoon DS, et al. proponen en el artículo “Measurement of Intracellular ROS in *C. elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate”, el uso de H2DCF-DA para la determinación de especies reactivas de oxígeno en *C. elegans*, el cual mostró un alto nivel de rendimiento y permitió evaluar una curva de tendencia que ayudó a tener una predicción sobre el comportamiento del estrés oxidativo desarrollado por el nematodo (18). El estrés oxidativo es un parámetro que permite evaluar la eficiencia de un probiótico al ser consumido e incluso es un ensayo que se analiza frente a partículas como el rotavirus, ya que se requiere conocer si un microorganismo contribuye a disminuir el estrés desarrollado por un organismo y los probióticos parecen estar involucrados en este proceso de disminución (19).

Ciertamente, uno de los sistemas que más se ve beneficiado con el consumo de probióticos es el digestivo, en especial cuando se tiene una patología de base o se realiza un consumo constante de medicamentos como lo son los antibióticos. Esta información es apoyada por el artículo publicado en Pharmacol Res 2018 realizado por Mantegazza C et al, en donde se evalúa el efecto producido por *L. rhamnosus* en pacientes que consumían antibióticos, al igual que el análisis del efecto producido por el microorganismo sobre el trastorno diarreico tras el consumo de dichos medicamentos; en la revisión se puede evidenciar la reducción de efectos secundarios a nivel intestinal producidos por el consumo de medicamentos, tras el uso de probióticos dentro del tratamiento antimicrobiano e igualmente se mencionan algunas recomendaciones que se deben tener en cuenta al momento de usar probióticos como ayuda terapéutica en estas enfermedades (20).

Este tipo de ensayos han sido probados también en *C. elegans*, demostrando su capacidad para ser un buen modelo de estudio, lo que implica también investigar técnicas para el manejo del nematodo y así mismo escoger el tipo de ensayo más adecuado según la investigación a realizar; Park H et al. publicó en 2018 un artículo titulado “Survival assays using *C. elegans*”, en el que se realiza una comparación de diferentes métodos de análisis para ensayos de supervivencia, de igual manera, menciona que los medios líquidos son adecuados para detectar los efectos de los componentes de la dieta y los tratamientos químicos en los gusanos, debido a la naturaleza homogénea del medio; sin embargo, también menciona que estos presentan un inconveniente en la manipulación de los nematodos, dichas comparaciones son útiles al momento de determinar qué medios de cultivo y que metodología usar, según la investigación requerida (21).

Adicionalmente, existe una gran variedad de mutaciones genéticas en el nematodo, que son útiles al momento de probar la efectividad del probiótico frente a condiciones desfavorables para el nematodo, es decir, condiciones en donde el nematodo posea una “enfermedad” que tratar. Este es el caso de la AX1410, la cual posee una mutación en el gen flp-18, codificante para el neuropéptido flp-18 que participa en la movilidad del nematodo y búsqueda de alimento (22); dicha cepa es útil para el estudio de la influencia de la dieta en el nematodo y

teniendo en cuenta que *C. elegans* se alimenta de bacterias, resulta ser una buena opción para estudiar probióticos.

Por otro lado, la regulación del microbiota no solo va a beneficiar al sistema digestivo, sino que también va a repercutir en la funcionalidad de otros sistemas que están íntimamente relacionados con el mismo; un ejemplo de esto, se ve en la esclerosis múltiple, en la que se evidencia una disbiosis que empeora la condición médica de los pacientes, por lo que un microorganismo que ayude en la regulación de este desbalance sería de gran ayuda en el mejoramiento de la calidad de vida. Con respecto a esto, Tankou SK et al. en su artículo “A probiotic modulates the microbiome and immunity in Multiple Sclerosis (EM)”, evalúa la acción que tiene un probiótico que contiene más de una cepa (multicanal) sobre un grupo de pacientes con esclerosis múltiple, dicho estudio concluye que este producto tiene un gran potencial como ayuda terapéutica en EM, ya que se observó una disminución en el número de recaídas de pacientes con tratamiento en comparación con aquellos que no lo tenían, además de una regulación del sistema inmune disminuyendo la inflamación que se presentaba (23).

Igualmente, es importante mencionar la interacción que tiene el sistema digestivo con otras partes del cuerpo, por ejemplo, el sistema nervioso central. Muchos estudios denominan esta relación como el eje intestino - cerebro. Estos estudios demuestran como la biomasa presente en el intestino, afecta la permeabilidad intestinal influyendo directamente con la barrera hemato-encefálica, la estimulación inmunológica y la producción de señales neurológicas, entre otras. En el artículo titulado “New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis” publicado en J Microbiol. 2018, Liu YW et al. muestra el papel potencial que tendría *L. plantarum* en la regulación de la microflora y su repercusión con la salud de sistemas como el neurológico (24).

Aunque se ha visto que los probióticos tienen un gran potencial como terapia sobre todo en enfermedades intestinales, existen algunas cepas bacterianas que aún presentan inconsistencias en algunos estudios, un ejemplo de ello es la evaluación realizada *L. rhamnosus* GG frente a la gastroenteritis aguda en niños, realizada por Schnadower D et al. y publicado en N Engl J Med en 2018, donde se no se observa una mejoría significativa en el consumo del probiótico en comparación con la administración de un placebo, lo que difiere de algunos estudios que se han realizado a baja escala en donde se observan resultados contrarios (25).

Es pertinente destacar que, dentro del estudio de probióticos, también se realiza la búsqueda de un modelo de estudio que permita evaluar los efectos que con antelación se han mencionado, lo que quiere decir que dicho modelo debe presentar características intestinales similares a las encontradas en el ser humano. Dimov I y Maduro MF presentan en el artículo “The *C. elegans* intestine: organogénesis, digestion, and physiology”, de 2019 una revisión de *C. elegans* sobre sus características intestinales y el desarrollo que tienen las mismas durante el ciclo de vida, concluyendo el potencial que este nematodo tiene frente a estudios de salud humana, ya que presente una alta homología con genes humanos (26). Cabe resaltar que *C. elegans* no es el único modelo en el estudio de probióticos, esto puede verse en el estudio de 2019 realizado por Meng Y et al titulado

“*Lactobacillus plantarum* KLDS1.0318 Ameliorates Impaired Intestinal Immunity and Metabolic Disorders in Cyclophosphamide-Treated Miceen”, donde se administró *L. plantarum* a ratones, evidenciando efectos benéficos a nivel inmunológico, neurológico e intestinal. En el mismo, se puede evidenciar como *L. plantarum* contribuye a la disminución de efectos nocivos producidos en el intestino de ratones a raíz del consumo de Ciclofosfamida (27).

Adicionalmente, Zimmermann J et al en el artículo de 2019 The functional repertoire contained within the native microbiota of the model nematode *C. elegans* analizó la flora intestinal nativa y su relación con la alimentación del nematodo. Según este estudio, en la microbiota se destacaban especies de la clase Gammaproteobacteria, de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Xanthomonadaceae*, el filo de los Bacteroidetes y como familias representativas *Sphingobacteriaceae*, *Weeksellaceae*, *Flavobacteriaceae* (28).

C. elegans es un modelo de estudio apropiado y según los hallazgos también es un modelo para investigaciones sobre los probióticos, siendo blanco importante en la búsqueda de nuevas terapias, especialmente en enfermedades en la que ocurre disbiosis, como se evidencia en la infección por microorganismos como el *Rotavirus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile* y *Helicobacter pylori*. En este tipo de infecciones normalmente se implementan tratamientos para la sintomatología presentada, por ejemplo, en casos de diarrea se recurre a rehidratación oral que solo abarca el tratamiento para esa situación en específico y en contraparte, los probióticos parecen tener un efecto beneficioso en la diarrea infecciosa aguda y en la Diarrea Aguda asociada a los Antibióticos (DAA), sin embargo, los mecanismos de acción por parte de los probióticos aún siguen sin estar claros, ya que se cree que la acción tiende a ser específica según el microorganismo implementado, como lo plantea un estudio publicado por Plaza-Díaz J et al titulado “Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases”, en donde se realiza una revisión de los mecanismos de acción bioquímicos y moleculares de los probióticos, relacionándolos con el papel que tienen frente a la regulación intestinal y su importancia con el sistema inmune (19). Del mismo modo, Sharma K et al. en 2019 el artículo Multivariate analysis of the increase in life expectancy of *C. elegans* through intestinal colonization by indigenous probiotic strains, demuestra los beneficios en relación a la longevidad, la capacidad de colonización y la respuesta fisiológicas del gusano, frente a diferentes condiciones de cultivo (29).

Junto con el análisis de estrés oxidativo, un aspecto que es de gran importancia y ha sido una de las mayores razones para el estudio de los probióticos, es la influencia que tiene la microbiota en la extensión de la vida, en tal sentido se ha evidenciado que el consumo de probióticos aumenta la esperanza de vida de los organismos que lo consumen. Roselli M et al (30). en su artículo *C. elegans* and Probiotics Interactions from a Prolongevity Perspective, realiza una revisión de los posibles mecanismos por los cuales los probióticos pueden interactuar con el huésped para aumentar la esperanza de vida como lo son la vía de la insulina o P38 MAPK (30). Adicionalmente, Zeng L et al, en el artículo titulado “Antiaging effect of a Jianpi-yangwei formula in *C.*

elegans”, relaciona a *C. elegans* en ensayos de longevidad mediados por una medicina tradicional china a base de microorganismos (probióticos), en donde muestra un aumento en la supervivencia del nematodo en condiciones de alto estrés cuando fue tratado en comparación con aquellos nematodos sin tratamiento (31).

Haciendo alusión a los parámetros evaluados respecto a los probióticos, uno de los aspectos que se afecta cuando hay un desbalance de la flora intestinal es la permeabilidad, que a mediano plazo puede causar que bacterias o sustancias pasen al torrente sanguíneo y esto cause enfermedades mucho más graves que el solo aumento de la permeabilidad, es por ello que muchos estudios también se han centrado en la búsqueda de estrategias para el análisis de este aspecto, Le T et al. en el artículo *Measuring the Effects of Bacteria and Chemicals on the Intestinal Permeability of C. elegans* 2019, propone la utilización de fluoresceína (FITC) -dextrano para la determinar la permeabilidad intestinal en *C. elegans*. Este reactivo evita sesgos que presentan comúnmente otras tinciones, tal es el caso del rojo de Nilo, una coloración que tiene fuerte afinidad por las moléculas lipídicas y que mostraría con gran efectividad la acumulación de grasas en el nematodo tras el consumo de bacterias probióticas (32).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, los beneficios que traen los probióticos a nivel intestinal repercuten también en el mantenimiento y mejoramiento de otros sistemas, otro ejemplo de esto se observa en el artículo *Probiotic Bacillus subtilis Protects against α -Synuclein Aggregation in C. elegans* realizado por Goya ME et al , en donde se alimentó *C. elegans* que presentaba alteraciones genéticas relacionadas con α -sinucleína, con cepas probióticas de *Bacillus subtilis* en donde se observó una reducción en la acumulación de α -sinucleína y con ello un aumento en la esperanza de vida de los nematodos afectados (33). De igual manera, un artículo publicado en 2020 por Wieërs G et al, menciona una serie de estudios en donde especies del género *Lactobacillus* y otros microorganismos han contribuido al mejoramiento de diversas condiciones clínicas como: la reducción de efectos secundarios tras la ingesta de antibióticos, alivio de condiciones psicopatológicas y el mejoramiento a largo plazo de condiciones asociadas a otros sistemas mediante la interacción en procesos de permeabilidad intestinal (34).

A Pesar de la fuerte relación que existe entre el microbiota intestinal con la respuesta inmune y la viabilidad de organismos, el mecanismo por el cual dichos microorganismos intervienen, aún requiere de estudios; sin embargo, se piensa que esos efectos beneficiosos, van dirigidos hacia el estrés oxidativo y abiótico o sobre toda la respuesta inmune. Lo anterior es mencionado en el artículo *C. elegans, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms* Propuesto por Poupet et al. en el cual se establece la utilidad del modelo *C. elegans* en estudios de probióticos gracias a la amplia gama de cualidades que posee el nematodo no solo en cuestión de mantenimiento y economía, sino también de facilidad de análisis (35).

Con respecto a la información que se tenía sobre cómo este nematodo distribuye su energía para vivir y reproducirse, diversos estudios impusieron la relación entre reproducción, longevidad y metabolismo de grasas; a diferencia de los mamíferos, (organismos que acumulan grasa a nivel de los adipocitos) *C. elegans* acumula

lípidos a través de las células intestinales e hipodérmicas, lugar al que recurre al iniciar su reproducción, debido al alto gasto energético que dicho proceso requiere, al mismo tiempo este se relaciona con la longevidad, ya que una pérdida elevada de energía limita la extensión de la vida (4). En cuanto a las vías de señalización involucradas, se destaca la vía de señalización similar a la insulina / IGF-1, que lleva a la activación de genes relacionados con el envejecimiento y el estrés del nematodo (7). De manera particular se ha encontrado que la vía de señalización similar a la insulina se conserva en el nematodo y el humano (31).

Por último, cabe resaltar la importancia que tendría el uso de *C. elegans* en el estudio de nuevas cepas probióticas y el conocimiento sobre los procesos que se llevan a cabo dentro de este organismo, puesto que ya se conoce sobre el gran número de similitudes con los seres humanos, lo que es útil al momento de llevar estos resultados a una escala clínica. Lo anterior es apoyado igualmente por Liu H et al mediante el artículo titulado “Lipid metabolic sensors of MDT-15 and SBP-1 regulated the response to simulated microgravity in the intestine of *C. elegans*” en donde se usa el nematodo como modelo de microgravedad en relación con sensores metabólicos lipídicos que también son relevantes en la investigación de los efectos intestinales dados por los probióticos, lo anterior refuerza la idea de que la dieta de *C. elegans* influye de manera contundente sobre su desarrollo (36).

MARCO REFERENCIAL

1.1. Probióticos

El término probiótico significa a favor de la vida, es decir, se les conoce como probióticos a aquellos microorganismos que pueden atribuir beneficios al consumidor y aunque en un principio se reconocieron sólo a las bacterias como probióticos, con el pasar del tiempo se reconocieron otros microorganismos que al igual que estas cumplían una función importante dentro del mantenimiento de la vida. Eli Metchnikoff, fue el primer investigador en darse cuenta del beneficio de estos microorganismos (científicamente hablando, ya que en la antigüedad ya eran utilizados los probióticos para la producción de alimentos), afirmando que la relación dependiente que teníamos con los microorganismos intestinales hacía posible adoptar medidas que ayudaran a modificar la flora intestinal en caso de que esta no fuera útil en el cuerpo (2), lo que llevó, años después, a pensar en cómo utilizar terapéuticamente estos microorganismos.

2.2 Selección de probióticos

Como se mencionó anteriormente los probióticos son un grupo de microorganismos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para el huésped, por lo que es necesario que se le realicen estudios donde se muestre la utilidad y los requerimientos necesarios para la implementación de los mismos en un tratamiento humano, con el fin de asegurar la inocuidad del producto al momento de ser suministrado; es por ello

que la Food and Agriculture Organization (FAO) y la OMS recomiendan una serie de directrices para la selección de probióticos, al igual que la selección de los alimentos que los van a transportar o el medio en que se van a consumir, ya que estos son importantes en la acción que el microorganismo desarrollaran al momento de entrar al organismo, lo que se menciona en un artículo publicado en 2006 por la FAO (2). Los requerimientos para la implementación de un microorganismo como probiótico se mencionan en el artículo en Farmacia abierta en 2017 (12), en el que cabe resaltar los siguientes puntos:

1. **Identificación:** Una buena identificación es necesaria, ya que no todas las cepas de una misma especie tienen el mismo funcionamiento por lo tanto no todas podrán ser consideradas como probióticas.
2. **Factor de virulencia:** Uno de los parámetros más importantes al momento de establecer un microorganismo probiótico es garantizar que este no posea mecanismos de virulencia o que produzca sustancias dañinas para el huésped, lo que es importante al momento de considerar la microbiota normal como potencial probiótica, debido a que como se han visto en diferentes estudios algunos organismos de la flora normal pueden llegar a desarrollar infecciones en caso de disbiosis o déficit en el sistema inmune.
3. **Géneros reconocidos:** según la Food and Drug Administration (FDA) y la European Food Safety Authority (EFSA) los géneros más representativos dentro del grupo de probióticos son los lactobacilos y las bifidobacterias, ya que poseen una gran cantidad de cepas sin actividad virulenta; sin embargo, estudios recientes muestran otro tipo de microorganismo que también tiene una actividad probiótica potencial (35).
4. **Evaluación clínica:** A pesar de que los ensayos in vitro son necesarios para la evaluación del mecanismo de acción de los probióticos siempre será necesaria la evaluación del microorganismo en el ser humano, sin olvidar que este punto de la investigación sólo será posible luego de ensayos en otros modelos de estudio que garanticen o aporten una visión más amplia de la posible reacción del producto en el organismo.
5. **Tolerancia al medio:** Al ser un producto consumible vía oral es importante que el probiótico sobreviva a las sustancias intestinales presentes en el tracto digestivo, con el fin de garantizar que el microorganismo prolifere y llegue a la diana terapéutica cumpliendo así el objetivo esperado.
6. **Concentración adecuada:** Por último, es importante resaltar el concepto de probiótico establecido por la OMS donde menciona que el microorganismo causara beneficio al huésped, si se administra una cantidad adecuada del producto, esto debido a que una cantidad muy pequeña podría no cumplir con el objetivo del probiótico y una cantidad muy elevada podría llegar a desequilibrar la composición normal de la flora intestinal; cabe resaltar que estas concentraciones por lo general rondan en el orden de cien a mil millones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (13).

2.3 *Lactobacillus spp* uno principales géneros probiótico

Uno de los géneros bacterianos con mayor diversidad de cepas benéficas y de gran importancia clínica en la actualidad es *Lactobacillus*, corresponde a $\leq 1\%$ de las bacterias que colonizan el intestino humano y hasta un 6% del microorganismo en el duodeno. Se ha visto que diferentes cepas de *Lactobacillus* han tenido una influencia significativa no solo en enfermedades intestinales, sino también en la modulación del sistema inmune e incluso en el mejoramiento de las condiciones presentadas en algunas enfermedades neurodegenerativas, esto gracias a su mecanismo de acción que se resume en adhesión intestinal y producción de bacteriocinas que contribuyen a la eliminación de patógenos en el intestino, además también pueden intervenir en la síntesis de vitaminas, metabolismo de sales biliares y síntesis de interleucinas o linfocitos Th – 17 (12)(14).

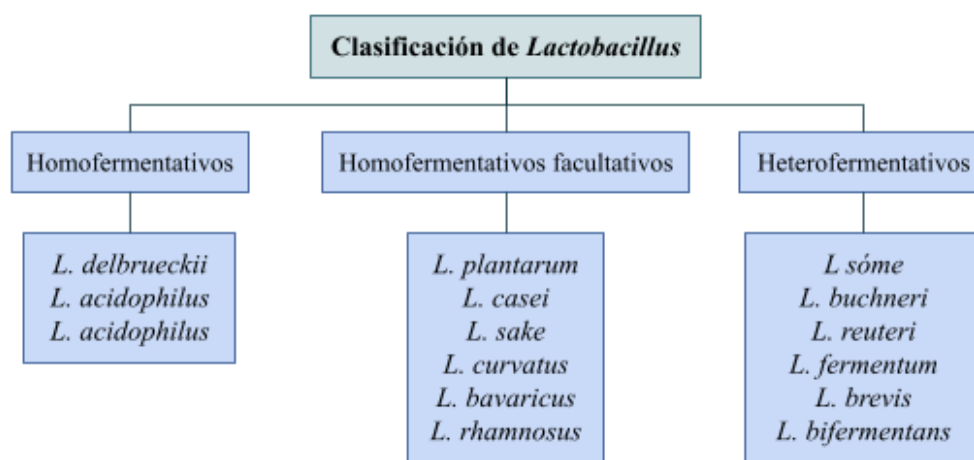


Figura 1. Clasificación de *Lactobacillus* según el tipo de fermentación. Se muestra la clasificación de las especies de *Lactobacillus* dependiendo del tipo de fermentación. Tomado de Sáenz, et al. (5)

El género *Lactobacillus* se caracteriza por ser bacilos cortos o cocobacilos Gram positivos, catalasa negativa, aerotolerantes, productores de ácido láctico a través de la fermentación de azúcares, característica de gran utilidad en la industria de alimentos y por la cual se realiza la identificación de especies, ya que la fermentación de los azúcares es diferente entre algunas de ellas; Además, para la identificación de especies se usan pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, supervivencia a pH definido o resistencia a diferentes concentraciones de NaCl. Cabe resaltar que en 2009 Hammes y Hertel dividieron el grupo de *Lactobacillus* en tres subgrupos (como se ve en la figura 1); homofermentativos, aquellos que fermentan únicamente hexosa; heterofermentativo facultativo, fermentan hexosas a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) al igual que el grupo anterior, pero son capaces de degradar pentosas y gluconato a través de la vía de las pentosas fosfato; por último, los heterofermentativos obligados, que son aquellos que fermentan hexosas obteniendo ácido láctico, acético, (o

etanol) y CO₂ (5)(6).

Es importante mencionar que, si bien una sola especie de *Lactobacillus* proporciona buenos resultados en diferentes estudios, la acción conjunta de varias cepas ha demostrado mayores beneficios, ya que la sinergia entre ciertos microorganismos, aumenta la respuesta metabólica y fisiológica del cuerpo para obtener efectos más efectivos (10).

2.4 Longevidad de *C. elegans* y probióticos

Como ya hemos visto *C. elegans*, resulta ser un modelo prometedor en el estudio de probióticos y con ello la investigación dirigida a la extensión de la vida útil por medio de estos microorganismos; uno de los ensayos más comunes en viabilidad es la longevidad, la cual, es una prueba en la que se mide el tiempo de vida del nematodo bajo una determinada situación (en el presente caso la longevidad frente al tratamiento probiótico); con respecto a esto, una de las ventajas que tiene *C. elegans*, es que la mayor parte de su población es hemafrodita, lo que permite la obtención de poblaciones isogénicas. Cabe mencionar, que en los ensayos en donde se evalúan los efectos de la dieta en el nematodo, los medios líquidos son ideales debido a la homogeneidad que proporcionan, sin embargo, presentan un inconveniente en la manipulación de las larvas por lo que es recomendable el uso de medios de cultivo sólidos, pero alimentación líquida y no por medio de siembra en botón (Inoculación de la dieta bacteriana en forma sólida) (12).

Otro aspecto importante en la longevidad de *C. elegans*, es la determinación de muerte de las larvas, una de las técnicas que más se usa es muerte por inactividad, lo que se hace es tocar las larvas con un “pic” (objeto similar a un asa bacteriológica, pero más pequeña y hecha de alambre delgado o de vidrio) y aquellas que no se muevan se clasifican como muertas, sin embargo, puede existir la posibilidad de un estadio dauer que sesgue los resultados del análisis usando esta técnica (24); otra técnica, que también es recomendada es el uso de tintes fluorescentes, como SYTOX, que tiñen los gusanos muertos al penetrar en la membrana celular y emiten señales fluorescentes para facilitar el recuento (12).

2.5 Modelos para el estudio de probióticos

En la actualidad se conocen diferentes alternativas para el estudio de los probióticos, como nematodos, moscas y polillas, que proporcionan ventajas frente a los animales vertebrados usados en las primeras etapas de la investigación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, con respecto a los probióticos, un aspecto de relevancia serán las estructuras intestinales y la dieta del modelo a elegir; con respecto a esto, los nematodos, específicamente *C. elegans* posee características más útiles en comparación a los demás modelos (23).

2.5.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio en diferentes enfermedades.

El nematodo *C. elegans* pertenece al reino animal, vive normalmente en tierra, mide aproximadamente 1 mm de longitud y su ciclo de vida para llegar a la cuarta etapa larvaria es de alrededor de 2 días, anatómicamente está conformado por estoma (boca), faringe, intestinos, ovarios, oviductos, útero y una cutícula de colágeno; su cepa (organismos que provienen de la misma especie pero que comparten al menos una característica o variante genética) de referencia es conocida como Bristol, N2 o silvestre, la cual presenta miembros hermafroditas autofecundación y machos (35). Este nematodo se alimenta de bacterias, las cuales influyen en la fisiología del nematodo por medio de los metabolitos, lo que resulta ser una ventaja al momento de estudiar una cepa probiótica; además de ello, la transparencia de su cuerpo facilita el monitoreo de las bacterias ingeridas y la observación de marcadores de envejecimiento, así como de acúmulos de grasa mediante coloraciones intra o extra intestinales.

Es importante destacar que el manejo y/o cambio en la dieta de *C. elegans* no va a comprender un reto sencillo, pues al igual que el ser humano, estos organismos varían según su entorno y preferencia alimenticia. Es por esto que algunos estudios tienen por objeto eliminar completamente o parcialmente la proliferación de las bacterias que sirven de alimento para los nemátodos, con el fin de evaluar el efecto que esto tendría sobre la salud y comportamiento de los mismos. De hecho, en algunos casos no solamente disminuyen la replicación de las bacterias, sino que también evalúan la afinidad que tienen por bacterias que han sido metabólicamente inactivadas con diferentes tratamientos como el paraformaldehído y la diferencia que tendría cuando el alimento consiste en microorganismos con capacidad proliferativa (37). En este trabajo como ensayo menor, se determinó la preferencia de los nematodos por el estado de las bacterias que se implementaron en la dieta.

Por otro lado, *C. elegans* posee un gran panel de mutantes que contribuyen al estudio de diferentes enfermedades. En el presente estudio se utilizó la cepa mutante AX1410, la cual posee una mutación en el cromosoma X, alelo db99, gen que codifica para el neuropéptido FLP-18 el cual interviene en funciones motoras y de búsqueda de alimento del nematodo, dicha mutación causa un acumulo excesivo de grasa el cual reduce notablemente su desplazamiento y con esto, se afecta su calidad de vida y la prolongación de la misma (22). Debido a esto, la cepa mutante AX410 es útil para evaluar el efecto que tendrían los probióticos a nivel intestinal, ya que nos permite evaluar a *Lactobacillus* en condiciones patológicas o desfavorables para el desarrollo del nematodo. Lo anterior debido a que se ha evidenciado que diferentes cepas probióticas tienen la capacidad de influir sobre el metabolismo de los lípidos y a su vez en aquellas funciones biológicas que requiere un alto gasto energético (11).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

Con base en el problema planteado y cumpliendo con los objetivos propuestos, en el presente estudio se

realizaron una serie de ensayos; en primer lugar se realizó la obtención y mantenimiento de las cepas de trabajo, es decir, cepas de *Lactobacillus* y de *C. elegans* obtenidas en Caenorhabditis Genetics Center (CGC por sus siglas en ingles); luego se realizó la determinación de la concentración ideal del probiótico, es decir, aquella en la que el nematodo puede crecer en condiciones óptimas sin causarle daño y con base en ello, se establecieron las diferentes dietas a las que fue expuesto el nematodo.

Grupo 1: Cepa AX1410 de *Caenorhabditis elegans*

Subgrupo A: Control, placas de agar Medio de Crecimiento de Nematodos (NGM) con *C. elegans* alimentados con *E. coli OP50*

Subgrupo B: Dieta desde larvas L1 con *L. rhamnosus* (L.r)

Subgrupo C: Dieta desde larvas L1 con *L. plantarum* (L.p)

Subgrupo D: Dieta mixta, desde etapa L1 alimentación con *E. coli OP50* y cambio de dieta en etapa L4 *L. rhamnosus* (Lr Mx)

Subgrupo E: Dieta mixta, desde etapa L1 alimentación con *E. coli OP50* y cambio de dieta en etapa L4 a *L.plantarum* (Lp Mx)

Grupo 2: Cepa N2 de *Caenorhabditis elegans*

Los subgrupos fueron los mismos a los mencionados con anterioridad, con la diferencia que en este grupo se usa una cepa silvestre.

3.1 Cultivo y mantenimiento del nematodo

C. elegans AX1410 y N2 se cultivaron en medio NGM inoculado con *E. coli OP50* (Dieta estándar), a temperatura ambiente (25°C aproximadamente), realizando pases cada ocho días por corte de pluck o pase individual.

3.2 Cultivo y mantenimiento de bacterias probióticas

Se inició con el aislamiento de cepas de *Lactobacillus* del probiótico comercial Jarro-Dophilus EPS de la farmacéutica Jarrow formulas; su presentación en cápsulas de 48 mg, contiene 5×10^9 de microorganismos de por unidad, en la misma se integran 5 especies de *Lactobacillus*, 2 especies de *Bifidobacterium* y 1 cepa de *Lactococcus*.

Del producto comercial, se procedió a realizar restablecimiento de biomasa en medio Brain heart infusion (BHI)

con tres quintas partes de una cápsula del producto, durante 24 horas a 37 °C y en agitación, posteriormente se procedió a realizar coloración de Gram de caldo BHI y del mismo cultivo en tres placas petri con agar sangre, tres placas con agar nutritivo, dos placas con agar MacConkey, dos placas con agar Mueller-Hinton, dos caldos de medio Mueller-Hinton, tres placas con agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y un tubo con agar MRS sembrado por técnica pico de flauta.

Tabla Nutricional	
Porción diaria: 1 cápsula	Porciones por envase: 15
Mezcla de bacterias probióticos (5 millones células viales)	48 mg
Integrado por las siguientes cepas	
- <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Ro011	- <i>Lactobacillus casei</i> Ro215
- <i>Lactobacillus helveticus</i> (<i>L. acidophilus</i>) Ro052	- <i>Lactobacillus bulgaricus</i> Ro1009
- <i>Lactobacillus plantarum</i> Ro1012	- <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i> R1058
- <i>Bifidobacterium longum</i> BB536	- <i>Bifidobacterium breve</i> Ro070

Tabla 1. Tabla nutricional del probiótico Jarro-Dophilus EPS. La tabla muestra la composición microbiológica del probiótico Jarro-Dophilus EPS.

Con el fin de recuperar y aislar cepas de *Lactobacillus*, se identificaron y seleccionaron macroscópicamente por morfología de colonias y microscópicamente por coloración de Gram los microorganismos de interés, de igual forma se realizaron repiques cada dos días en medio MRS incubado a 37°C por 48 hrs, almacenando cada repique a 4°C aproximadamente, para el aislamiento total de las cepas.

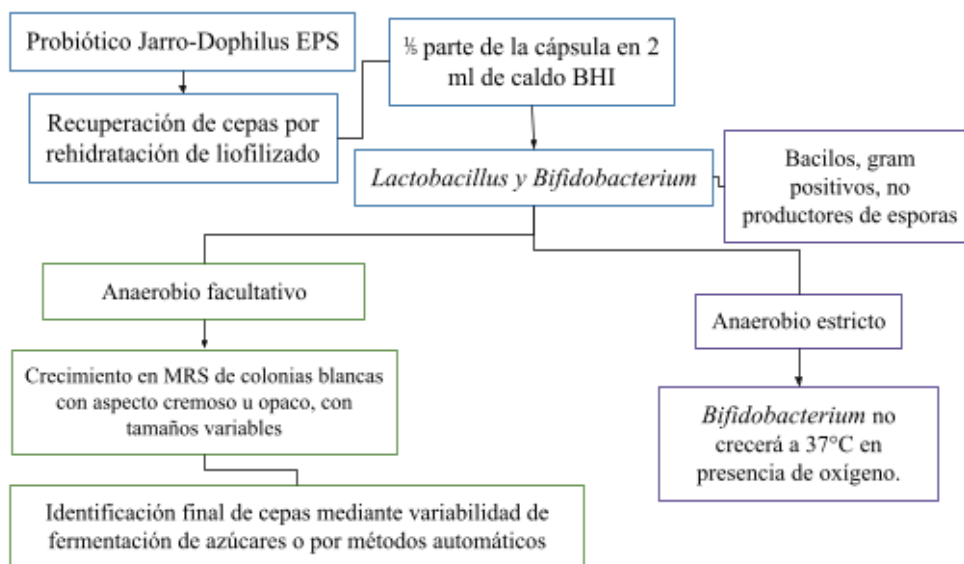


Figura 2. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus*, mediante la recuperación bacteriana de probiótico multicanal comercial. Se observa el protocolo realizado para el aislamiento de cepas probióticas de interés en el probiótico Jarro-Dophilus EPS, cuyo resultado se encuentra en el anexo 1.

Por otro lado, a causa de la difícil recuperación y aislamiento de bacterias en el proceso anterior, en el presente estudio se decidió utilizar cepas ATCC donadas al grupo de investigación de biotecnología y genética congeladas en crioviales. Para los ensayos se descongelaron y se mantuvieron en agar MRS, se realizó una verificación taxonómica mediante Vitek y control de pureza mediante tinción de Gram. Las cepas fueron congeladas en caldo MRS con 20% de glicerol a una temperatura de -80°C .

3.3 Sincronización del nematodo

Para empezar el tratamiento y análisis del nematodo se sincronizó a *C. elegans* en etapa larvaria L1 - L2, de esta manera, se tomó una placa de agar NGM que contiene larvas grávidas de *C. elegans* y se lavaron con 2 ml de tampón M9; luego se centrifugó a 4000 rpm durante 3 min en un tubo de microcentrífuga y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 100 μl de solución blanqueadora y se agitó de forma manual durante 4 min, luego se centrifugó 3 min a 4000 rpm descartando el sobrenadante. Después, se realizaron dos lavados con tampón M9, seguido de centrifugación a 4000 rpm durante 3 min; finalmente, se transfirió el pellet del último lavado en un medio NGM sembrado con dos botones de la bacteria según el grupo y subgrupo de estudio.

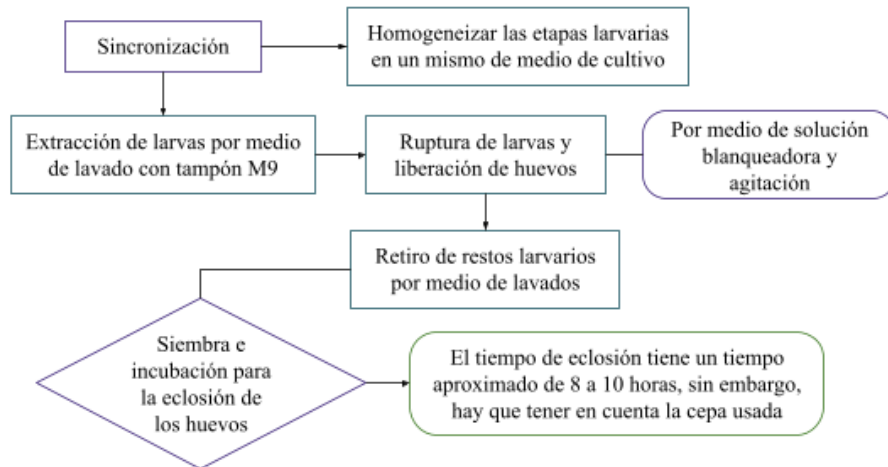


Figura 3. Flujograma del protocolo de sincronización utilizado en la investigación. Se observa el protocolo usado en la sincronización del nematodo.

3.4 Determinación de la concentración ideal del probiótico.

Para determinar la concentración ideal del probiótico, en primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica de artículos que mencionan la administración de diferentes cepas probióticas al nematodo *C. elegans*, con el fin de determinar concentraciones posibles en el tratamiento.

Autor	Concentración probiótica
Grompone, G et al. 2012	4 x 10 ⁶ células / ml
Kim Y. y Mylonakis E. 2012.	2,0 x 10 ⁹ UFC / ml = 500 µl
Kamaladevi A, Balamurugan K. 2016	3 x 10 ⁶ UFC / ml
Azat R, et al. 2016	1 x 10 ⁸ UFC / ml
Pluta R, et al 2017	1 x 10 ⁸ UFC / ml
Sharma K, et al. 2019	1 x 10 ⁸ UFC / ml
Meng Y, et al. 2019	5 x 10 ⁸ UFC / ml

Tabla 2. Consolidación de artículos para la determinación de posibles concentraciones en el tratamiento probiótico.

Posterior a esto, se determinaron 3 concentraciones posibles en el tratamiento basadas en la frecuencia y en los resultados observados en cada artículo, realizando posteriormente las suspensiones en agua destilada teniendo como referencia escalas McFarland 0.5, 0.7 y 1 que corresponden a $1.5 \cdot 10^8$ UFC/ml, $2.25 \cdot 10^8$ UFC/ml y $3 \cdot 10^8$ UFC/ml respectivamente, dichas suspensiones se confirmaron en VITEK DENSICHEK de BioMérieux.

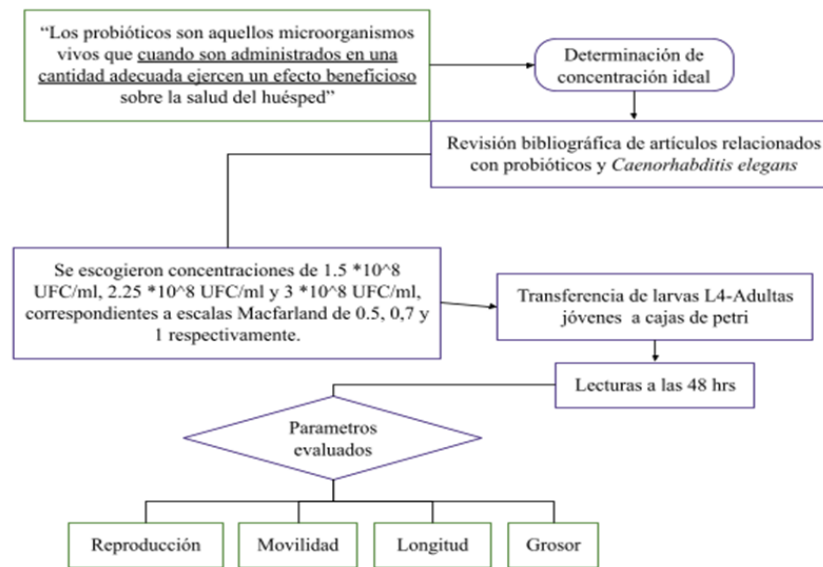


Figura 4. Flujograma para el ensayo de concentración ideal del probiótico, en base a la normativa establecida por la FAO/OMS. Se detalla el protocolo realizado en el ensayo de concentraciones, especificando los parámetros evaluados.

La determinación de la concentración ideal del probiótico, se realizó mediante la observación de cuatro parámetros, importantes en el desarrollo óptimo del nematodo, como lo fueron, longitud, grosor, reproducción y movilidad. La exposición con probióticos duró 48 hrs, partiendo de 5 larvas en etapa L4 por caja, con el fin de evaluarlos en etapa reproductiva.

Para evaluar la reproducción se realizó un conteo (por duplicado) de larvas utilizando una cuadrícula realizada en el exterior de caja de la caja petri. La movilidad del nematodo se determinó contando ondas por minuto, es decir un movimiento ondulatorio completo de las larvas observadas en un estereoscopio EUROTECH en objetivo 10X; finalmente, se midió el ancho y largo de tres larvas por cada dieta mediante la observación en microscopio de retícula en objetivo 10x.

3.5 ENSAYO DE PREFERENCIA ALIMENTARIA

Una vez en mantenimiento las bacterias y los nematodos, se llevó a cabo un ensayo menor, para determinar en qué estado se incorpora la dieta, para esto:

- 1) A partir de agar MRS, se inoculó 1 colonia de *L. rhamnosus* y *L. plantarum* en 3 mL de caldo MRS,

posteriormente se incubaron a 37°C por 48 horas.

- 2) Se llevó a la autoclave (3.5 kg/cm², 147 °C)
- 3) Después se centrifugó 3 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante
- 4) Se realizaron las escalas McFarland establecidas para cada cepa de nematodo a partir del sedimento, utilizando VITEK DENSICHEK de BioMérieux. En paralelo se realizaron escalas McFarland con los microorganismos vivos de cultivos recientes.
- 5) Sobre la base de cajas petri de 6 ml, se realizó una cuadrícula de manera que se observen 4 cuadrantes iguales y se calculó el punto medio de cada cuadrante.
- 6) Sobre cada punto medio se sembró un césped de 20µL en cada cuadrante, así, en los cuadrantes 1 y 3 se inoculó *L. rhamnosus* metabólicamente activo y en los cuadrantes 2 y 4, con la bacteria muerta, así mismo para *L. plantarum* en cajas petri con el microorganismo vivo y muerto. De esta manera se obtuvo para *C. elegans* AX1410 6 cajas petri (3 para *L. rhamnosus* y 3 para *L. plantarum*) y de la misma forma para N2. El ensayo se realizó por triplicado.

3.6 Determinación de la vida útil del nematodo frente al tratamiento probiótico

Para la determinación de la vida útil de *C. elegans* se toma en cuenta la literatura consultada, en donde se evidencia que la misma está relacionada con el nivel de estrés oxidativo que se presente y a su vez se determina la longevidad del mismo frente al tratamiento probiótico.

A. Ensayo de longevidad en *C. elegans* expuesto a *Lactobacillus* spp.

Con relación a la longevidad del nematodo se usa el protocolo establecido por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, donde se establecen los siguientes pasos:

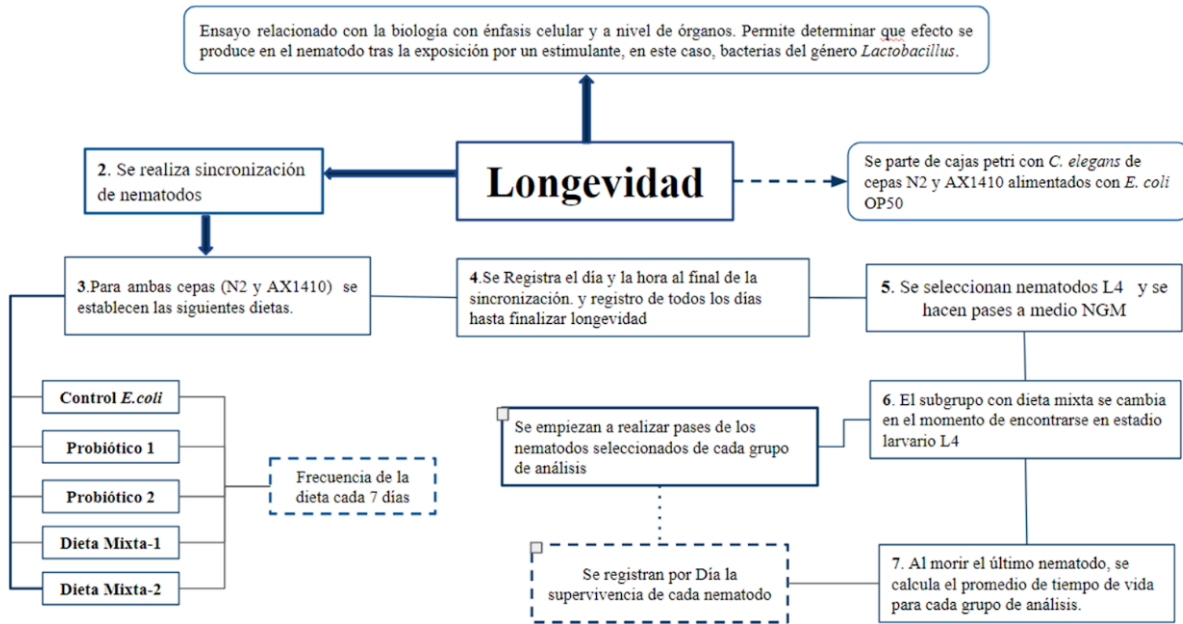


Figura 5. Procedimiento de longevidad para *C. elegans* cepas N2 y AX1410. Se muestra el protocolo usado en el ensayo de longevidad, en donde se inició con una sincronización de las larvas, posteriormente se establecieron los grupos de análisis y se inició dieta según fue el caso, finalmente se transfirieron diariamente los nematodos hasta la muerte, realizando la respectiva consignación de los datos.

Por otro lado, se evaluó la resistencia al estrés térmico, con el fin de evidenciar la efectividad del tratamiento con probiótico en comparación con una dieta estándar; dicho ensayo se realizó mediante la exposición de larvas L4 a las diferentes cepas de *Lactobacillus* hasta llegar a un estadio adulto, posteriormente se expusieron a 37°C por 8 hrs, realizando lecturas cada hora.

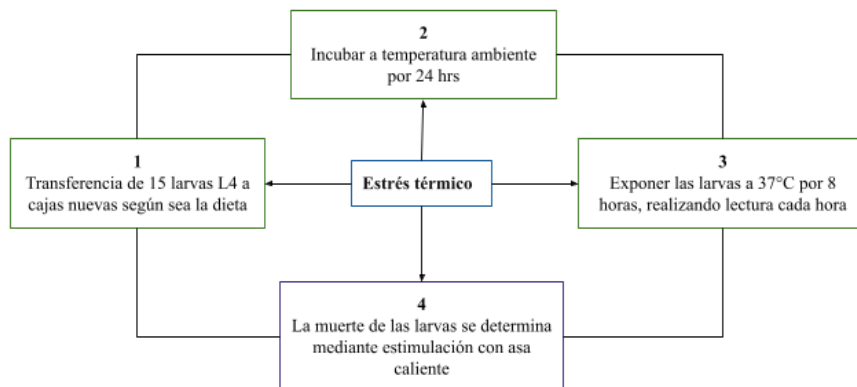


Figura 6. Ensayo de resistencia al estrés térmico. Se observa el procedimiento realizado para la evaluación de estrés térmico en las diferentes cepas del nematodo tras la exposición de larvas en el sexto día de adultez con los probióticos evaluados.

3.7 Observación de cambios a nivel intestinal del nematodo frente al probiótico

Con respecto a los cambios intestinales se evaluó la acumulación de grasas, para lo cual se propuso la siguiente tinción:

- A. Acumulación de grasas:** Se pretende usar la tinción de rojo de Nilo para determinar la cantidad de grasa acumulada en el nematodo tras la exposición con el probiótico. Dicha tinción consiste en tener nematodos *C.elegans* en cultivo, en este caso medio NGM, posteriormente al llegar todos los grupos de análisis al estadio larvario L4 y etapa adulta, se suplemento su dieta con rojo de Nilo con el fin de teñir las gotitas de lípidos presentes en las células intestinales observadas bajo un microscopio de fluorescencia y comparando los nematodos alimentados con probióticos respecto al control que indica cómo se debe observar la acumulación de grasas y correlacionar estos resultados con el ensayo de longevidad.

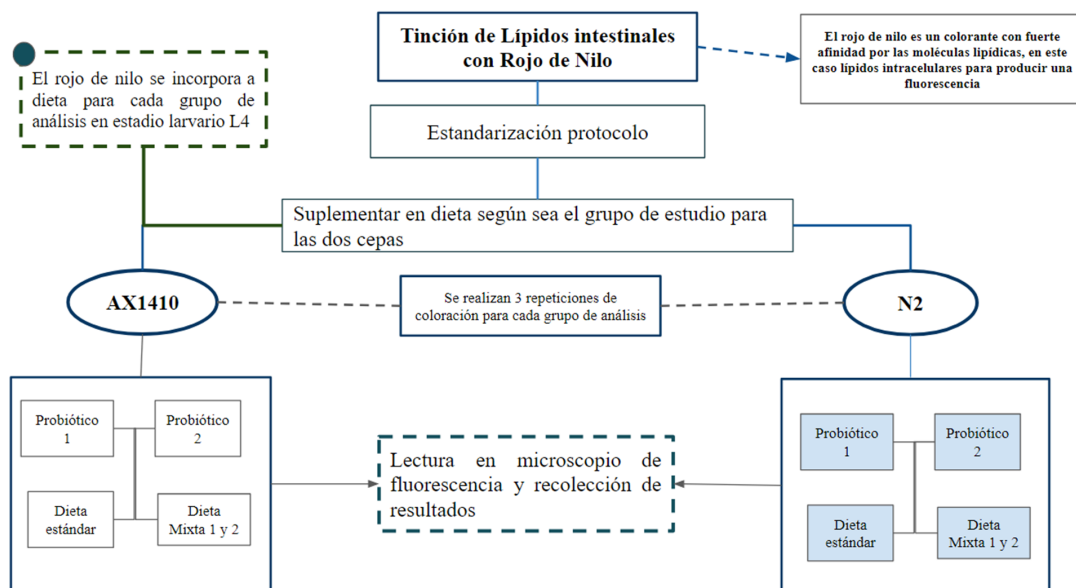


Figura 7. Protocolo tinción de lípidos intestinales con rojo de Nilo. Se observa el protocolo realizado para la evaluación cualitativa de la acumulación de grasa en *C. elegans*; se tomaron nematodos que se encontraban en su sexto día de adultez, seguidamente se tiñeron con el colorante rojo de Nilo, para su observación las muestras fueron llevadas a lectura por microscopio de fluorescencia (495 nm) y se recolectaron la evidencias en fotografías de alta resolución. Este ensayo se realizó por triplicado.

3.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente en el programa GraphPad Prims Version 9.3.1, en el cual se realizaron dos tipos de test, el primero One-Way Anova para comparar los datos obtenidos entre las dietas. Y el segundo, Gehan-Breslow-Wilcoxon test para el análisis de supervivencia como longevidad y estrés térmico. La significancia estadística fue determinada por un $p= 0.05$ en el primer test y un $p= 0.6132$ en el segundo, siendo

significativo si el valor de **p** era menor o igual según sea el caso a evaluar.

4. RESULTADOS

Con el fin de evaluar los efectos intestinales y cambios de longevidad producidos en *C. elegans* cepa mutante AX1410 y cepa silvestre N2 tras la exposición con *L. rhamnosus* y *L. plantarum* se realizó el reconocimiento de los diferentes estadios larvarios de las dos cepas y se realizó una comparación, seguida de la definición de la concentración ideal, identificación de cambios en la vida de los nematodos y la resistencia al estrés térmico, para finalizar con la evaluación cualitativa de la acumulación de grasas intestinales. Cabe mencionar que, en el proceso de aislamiento bacteriano proveniente del producto comercial, los microorganismos fueron susceptibles a contaminación e inestables en cuanto al mantenimiento, por lo cual, se usaron cepas ATCC probióticas evaluadas en el estudio en este estudio fueron donaciones al proyecto y entregadas en crioviales conservados a -80°C. Una vez obtenidas, fueron caracterizadas taxonómicamente en el laboratorio y se realizaron tinciones de Gram, como un control de calidad de pureza.

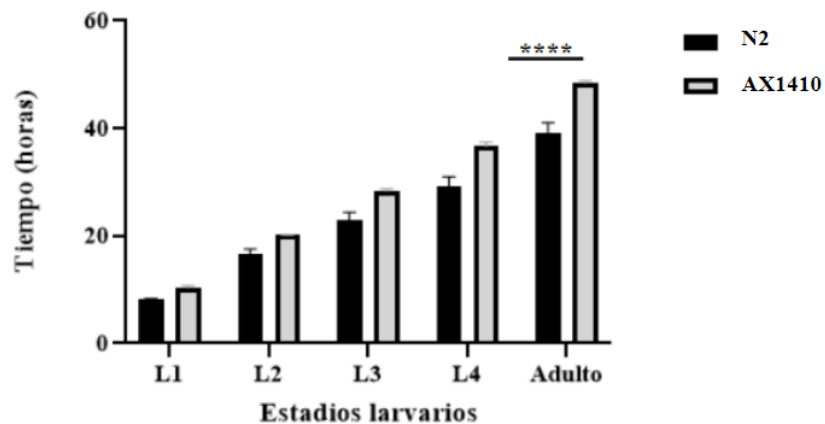
4.1 Identificación de los estadios larvarios de *C. elegans*

Dentro del proceso de cultivo y mantenimiento de los nematodos, se realizó la diferenciación de estadios larvarios de las cepas N2 y AX1410 con el fin de caracterizar fisiológica y fenotípicamente las dos cepas antes de realizar los ensayos. Una vez realizada la sincronización, los huevos se colocaron en medio NGM con *E coli OP50*, a las 8 horas eclosionan los huevos llegando a etapa larvaria L1, en donde se observó una larva de aproximadamente 250 µm que no permite diferenciar ningún órgano interno; 8 horas después se alcanzó el estadio larvario L2 con un alargamiento del cuerpo y se empiezan a diferenciar los órganos internos; luego de 6 horas el nematodo se encontró más grande con complejidad interna más detallada, es decir, que se encontraba en etapa larvaria L3; posteriormente, al pasar 6 horas se observaron larvas de mayor tamaño, así mismo, se aprecian estructuras internas desarrolladas como la vulva y el esófago por lo cual se determina el estadio L4, fase donde inicia el ciclo reproductivo en el que se alcanza un tamaño aproximado de 1,5 mm, llegando al estadio adulto joven 10 horas después, lo que se puede observar en la figura 8.



Figura 8. Ciclo de vida de *C. elegans* cepa silvestre N2. Después de la sincronización, las cepas fueron cultivadas en agar NGM con *E. coli OP50* a temperatura ambiente (25°C aproximadamente). Se observan los diferentes estadios larvarios de la cepa silvestre *C. elegans* N2 en un aumento de 10X. Elaboración propia.

Al comparar los tiempos de duración de cada una de las etapas larvarias se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa entre ambas cepas; se logró evidenciar que los huevos de la cepa mutante AX1410 prolongan su tiempo de eclosión alrededor de 2 horas en comparación con la cepa silvestre N2, tiempo que se mantiene en las etapas larvarias posteriores, lo que quiere decir que demora 10 horas más en llegar a su etapa reproductiva (Gráfica 1).



Gráfica 1. Diferencias entre tiempos de duración de los estadios larvarios de la cepa N2 y AX1410. Se observa la duración de los estadios larvarios de la cepa Bristol N2 (barra color negro) y cepa mutante AX1410 (barra color gris). Se observa una diferencia estadísticamente significativa de 2 hrs en cada estadio larvario finalizando con una acumulada de 10 hrs al terminar el ciclo (**** p = 0.0001). El ensayo se realizó por duplicado y fue evaluado mediante la prueba 2 way ANOVA.

Por otra parte, al comparar la morfología de las cepas del nematodo, siendo observadas bajo un microscopio con retícula, las larvas adultas de la cepa AX1410 presentan el doble de diámetro (aproximadamente 1 mm) al de las cepas adultas de N2 (0.5 mm aproximadamente), lo que puede asociarse a la acumulación excesiva de grasa que posee la cepa mutante.

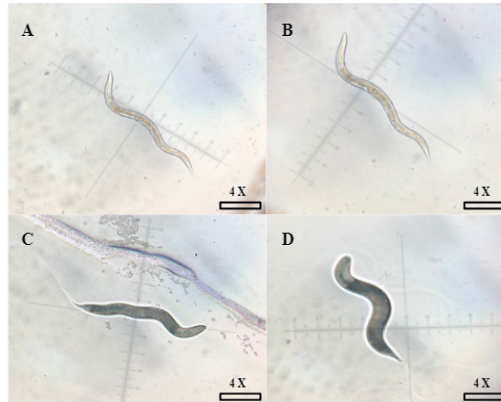


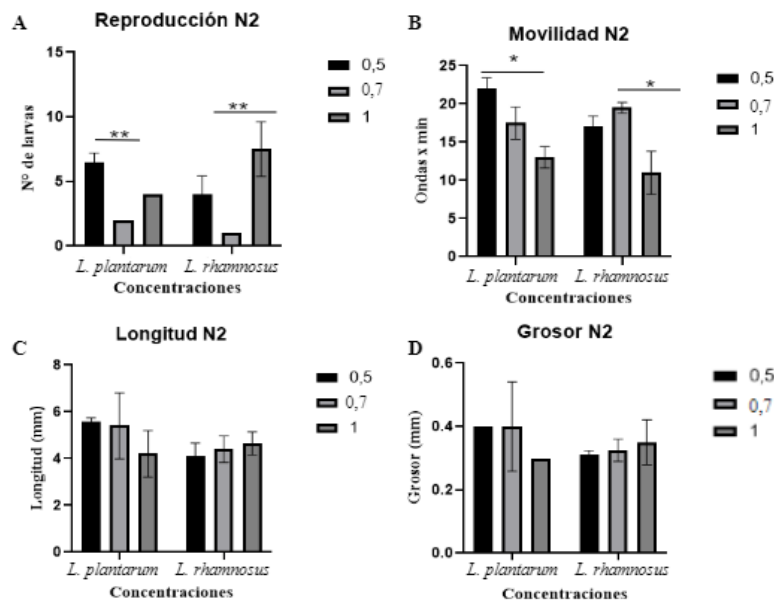
Figura 9. Diferencias morfológicas entre las cepas AX1410 y N2 del nematodo *C. elegans*. Se observan larvas adultas de la cepa silvestre N2 que muestran un grosor de aproximadamente 0.5 mm (A-B). Las larvas adultas de la cepa mutante AX1410 presentan un grosor de aproximadamente 1 mm (C-D). Imágenes observadas en un aumento de 100x, microscopio óptico con reglilla.

4.2 Concentración óptima de *L. rhamnosus* y *L. plantarum* incorporados en la dieta de *C. elegans*

Para evaluar si *L. rhamnosus* y *L. plantarum* afectaban la vida útil del nematodo se determinó la concentración óptima que se debe administrar a los nematodos, siguiendo el principio establecido por la FAO/OMS que establece que los probióticos “son microorganismos administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al huésped”. Inicialmente, se realizó la activación de las cepas y mantenimiento en medio MRS. La evaluación fue realizada por medio de cuatro parámetros importantes en la vida útil de los nematodos (reproducción, movilidad, longitud y grosor). Los nematodos de las dos cepas de *C. elegans* fueron expuestos a tres concentraciones de probióticos representadas según la escala de McFarland (0.5-0.7-1.0).

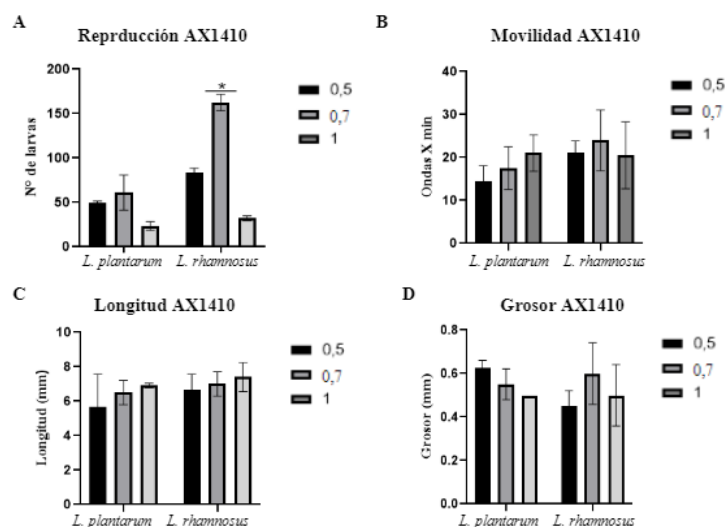
Es así, como se observó que para *L. plantarum*, la concentración ideal para N2 fue de 0.5, según la escala de McFarland, ya que se evidenció una mayor reproducción (aproximadamente 7 larvas) y movilidad (aproximadamente 21-22 ondas por minuto). Sin embargo, la longitud y grosor no mostraron diferencias estadísticamente significativas Figura 5C-5D. Para *L. rhamnosus* a pesar de que tuvo una mayor reproducción en la escala 1 estadísticamente significativa, al analizar los demás parámetros en esta concentración los cambios no fueron significativos, por el contrario, la movilidad y la reproducción de N2 con *L. rhamnosus* mostraron menor

variabilidad en 0.5 McFarland.



Gráfica 2. Evaluación de los parámetros de reproducción, movilidad, longitud y grosor de la cepa N2 de *C. elegans* a diferentes concentraciones del probiótico. (A) Reproducción de la cepa luego de 48 hrs de exposición a los dos probióticos, se observó una aumento estadísticamente significativo en la reproducción, en la concentración 0.5 McFarland con la dieta de *L. plantarum* (* p = 0,0034); (B) Movilidad, se observó una mayor movilidad en la concentración 0,5 estadísticamente significativa en cepa de *L. plantarum* (p= 0,0209); (C-D) en los parámetros de longitud y grosor del cuerpo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los ensayos se realizaron por duplicado y se evaluaron mediante una prueba 2 way ANOVA.

Para la cepa AX1410 se observó que la concentración ideal fue de 0.7 escala Mcfarland, mostrando una mayor reproducción en comparación a las demás concentraciones, teniendo resultados estadísticamente significativos en la dieta con *L. plantarum* (en promedio 150 larvas) y *L. rhamnosus* (55 larvas aproximadamente) después de la alimentación con el probiótico, y una mayor movilidad (en promedio 21-22 ondas por minuto) cuando fueron alimentados con *L. plantarum*. Sin embargo, la longitud y el grosor no mostraron diferencias estadísticamente significativas Figura 5C-5D.



Gráfica 3. Evaluación de los parámetros de reproducción, movilidad, longitud y grosor de la cepa AX1410 de *C. elegans* a diferentes concentraciones del probiótico. (A) Reproducción de la cepa mutante luego de 48 hrs de exposición a los dos probióticos, en donde se observa una mayor reproducción en la concentración McFarland 0.7 (IM), siendo estadísticamente significativo en la dieta de *L. plantarum* (* p = 0.0421); (B) Movilidad, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; (C-D) Longitud y Grosor del cuerpo; se observó una mayor longitud y grosor cuando la dieta se encontraba en concentraciones de 1 y 0,7, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los ensayos se realizaron por duplicado y se evaluó mediante una prueba 2 way NOVA.

4.3 Preferencia de *C. elegans* por el estado de la dieta

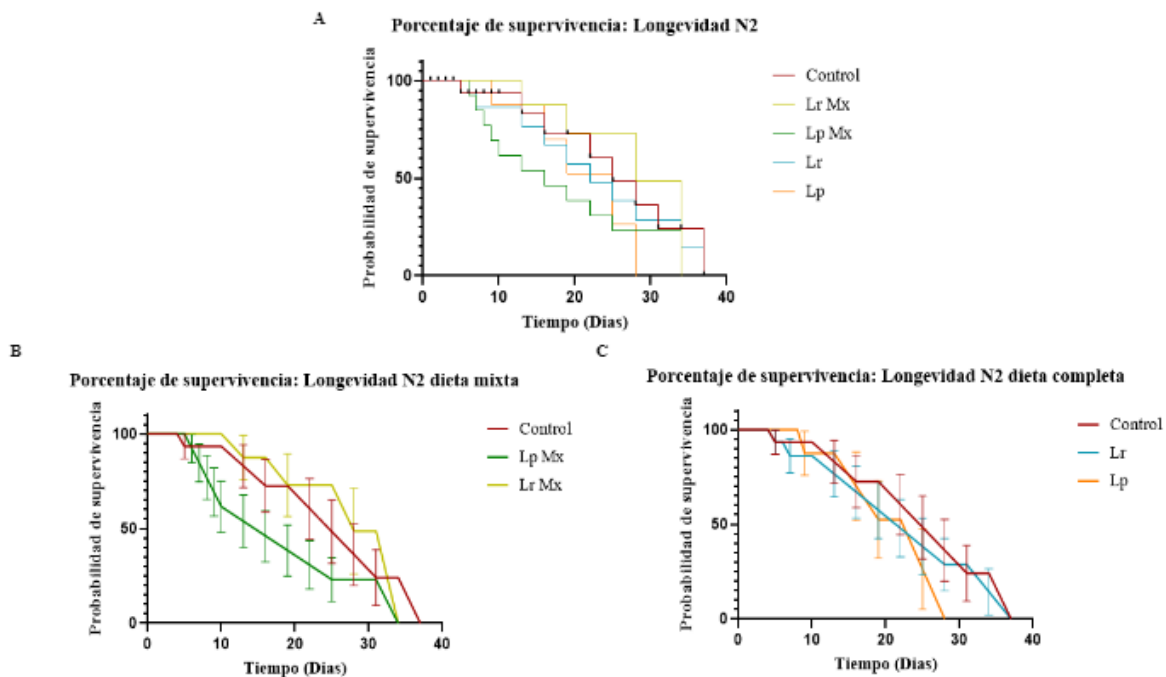
Habiendo establecido el protocolo para determinar la afinidad de los nematodos por el estado de su alimentación, se evidenció que pasadas 24 horas de incubación a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), la cepa AX1410 con dieta por *L. rhamnosus* tenía preferencia en todas las réplicas por bacteria metabólicamente activa, en promedio el 86.67% y en el caso de *L. plantarum*, el 93,33%.

Para la cepa N2 con *L. rhamnosus*, el 77,77% de larvas se encontraban en césped con bacteria viva, de manera similar para la dieta con *L. plantarum* el 79,44% de nematodos fueron encontrados en césped con el microorganismo vivo. Estos resultados de preferencia alimentaria podrían estar relacionados con el comportamiento fisiológico de ambas cepas, es decir, inicialmente durante el mantenimiento y diferenciación de *C. elegans*, se observó que la cepa AX1410 tenía un movimiento más lento comparado a la cepa silvestre N2 debido a su mutación, como lo reporta el CGC. En este sentido se sugiere que el nematodo prefiere alcanzar un microorganismo metabólicamente activo que uno inactivo.

4.4 Longevidad de *C.elegans* tras el consumo de concentraciones seleccionadas del probiótico.

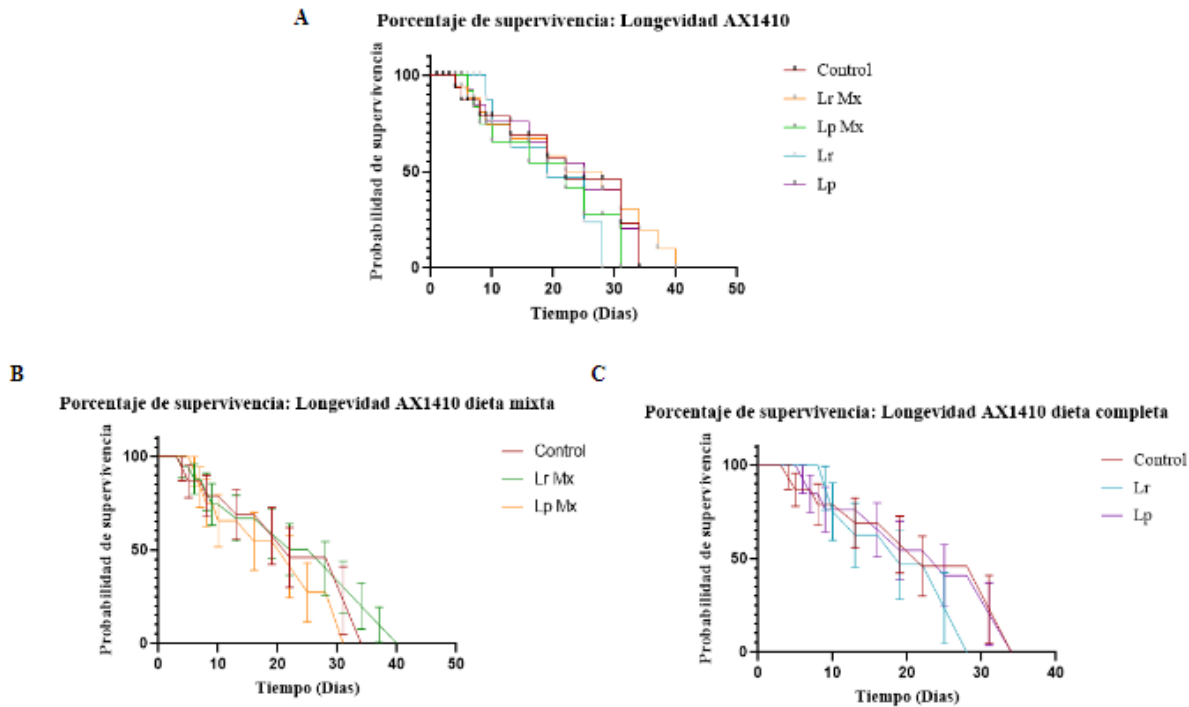
Una vez seleccionada la concentración de los probióticos, se realizó la identificación de cambios en la longevidad del nematodo, sometidos a una dieta completa (desde el inicio del ciclo), y una dieta mixta (hasta etapa L4, *E. coli* OP50 y a partir de esta el probiótico), teniendo como control una dieta con *E. coli* OP50 durante todo el ensayo. Inicialmente, se realiza una sincronización de las larvas y se finaliza el ensayo con la muerte de la última larva que se comprueba por estimulación con asa o capilar.

En el caso de la cepa N2, se observó que tanto en la exposición a dietas mixtas como a dietas completas las larvas vivieron un tiempo menor (en promedio 28 días) en comparación con el control, que tenía únicamente *E.coli* OP50 (37 días), siendo estadísticamente significativo el tiempo en la dieta mixta con *L. plantarum* (Lp Mx) (34 días, figura 6B). Por otro lado, a pesar de que en la dieta completa con *L. plantarum* (Lp), las larvas vivieron 27 días (figura 6C), el descenso en el porcentaje de supervivencia fue similar a las demás dietas completas, por lo que el análisis estadístico no mostró significancia para este caso.



Gráfica 4. Longevidad de *C. elegans* N2 tras la exposición a dieta probiótica. Se observa la probabilidad de supervivencia de la cepa N2 frente a la dieta con probióticos. (A) Totalidad de las dietas implementadas en N2, en donde se observa que ninguna de las dietas el nematodo supera el tiempo de vida con respecto al control ($p=0.1640$). El comportamiento del nematodo con las dietas por separado se muestra en (B) dietas mixtas ($p=0.0466$) y (C) dietas completas ($p=0,8258$). El ensayo se realizó por triplicado y se evaluó mediante Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

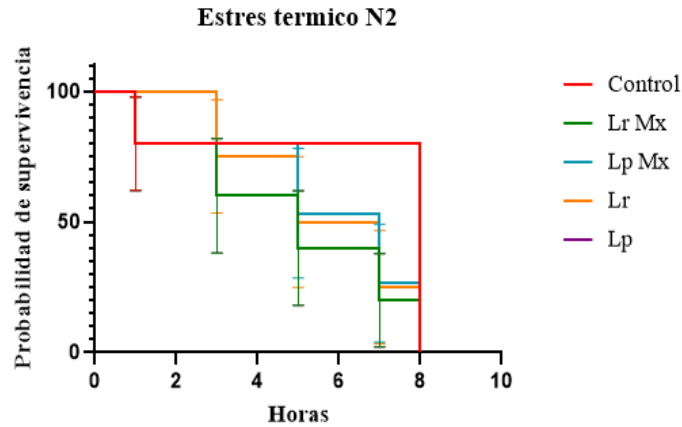
A diferencia de la cepa N2, en la cepa AX1410 expuesta a la dieta mixta con *L. rhamnosus*, las larvas vivieron un tiempo mayor (39 días, figura 7B), comparado con control con *E. coli OP50* (36 días). Sin embargo, ningún resultado fue estadísticamente significativo.



Gráfica 5. Longevidad de la cepa mutante AX1410 de *C. elegans* frente a la exposición con probióticos. Se observa la probabilidad de supervivencia de la cepa AX1410 frente a las dietas. (A) Totalidad de las dietas implementadas, se observa que la dieta mixta con *L. rhamnosus* y la dieta completa con *L. plantarum* superaron el tiempo de vida con respecto al control ($p=0,9866$). El comportamiento de las dietas por separado no fue estadísticamente significativo, en (B) se observan dietas mixtas ($p=0,9237$) y en (C) dietas completas ($p=0,9632$). El ensayo se realizó por triplicado y se evaluó por medio de Gehan-Breslow-Wilcoxon test.

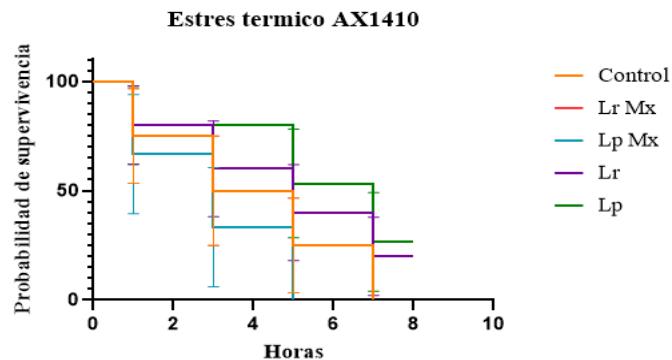
4.5 Supervivencia al estrés térmico tras el consumo de *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.

Dentro de la comprensión de la longevidad de las larvas, se realizó el ensayo de resistencia al estrés térmico con el fin de evaluar si las cepas probióticas ejercían un efecto positivo sobre la adaptación del nematodo a posibles cambios de ambiente, en este caso la capacidad de activar mecanismos de termotolerancia. Así pues, en el caso de los nematodos N2 se observó que ninguno de los grupos incrementó su resistencia frente al estrés térmico en comparación al control, teniendo en promedio más del 50% de las larvas muertas a las 5 horas en todas las dietas probióticas, lo que se correlaciona con la poca variabilidad de las dietas frente al control en el ensayo de longevidad.



Gráfica 6. Supervivencia al estrés térmico en la cepa N2 tras la exposición con *L. rhamnosus* y *L. plantarum*. Se observa la probabilidad de supervivencia durante 8 horas a 37°C en la cepa silvestre de *C. elegans* después de 48 hrs de exposición al probiótico. La probabilidad de supervivencia del nematodo no fue estadísticamente significativa ($p= 0.4508$), sin embargo, se muestra una disminución con todas las dietas tras el estrés térmico con respecto al control. Las dietas de *L. plantarum* y mixta *L. rhamnosus*, se muestran en una misma línea, ya que tuvieron el mismo comportamiento. El ensayo se realizó por duplicado y evaluados por medio del test de supervivencia Log- rank Mantel - Cox.

Por otro lado, en el caso de AX1410 las dietas completas con los probióticos presentaron una mayor resistencia al estrés térmico en comparación al control, ya que transcurridas 8 horas de exposición aún se observan larvas vivas, lo que podría sugerir una mayor capacidad de adaptación en estas dietas, que en una dieta estándar con *E.coli OP50*; sin embargo, cabe aclarar que dichos resultados no fueron estadísticamente significativos.



Gráfica 7. Supervivencia al estrés térmico en la cepa AX1410 tras la exposición con *L. rhamnosus* y *L. plantarum*. Se observa la probabilidad de supervivencia en la cepa mutante de *C. elegans* durante 8 horas a una

temperatura de 37°C después de 48 hrs de exposición al probiótico. La probabilidad de supervivencia del nematodo no fue estadísticamente significativa ($p= 0.395$). Sin embargo, en el caso de las dietas completas se observó que los nematodos superaron el tiempo de vida con respecto al control. La dieta de *L. plantarum* mixta y control se muestran en una misma línea, debido a que tuvieron el mismo comportamiento. El ensayo se realizó por duplicado y evaluados por medio del test de supervivencia Log- rank Mantel - Cox.

4.6 Evaluación cualitativa de lípidos intestinales en *C. elegans* tras el consumo de *L. rhamnosus* y *L.plantarum*.

Con el fin de determinar cambios en la acumulación de lípidos intestinales tras el consumo de probióticos, se realizó la tinción de larvas adultas jóvenes por medio del colorante rojo de Nilo y visualizadas por microscopía; en donde se analizó de forma cualitativa la cantidad de fluorescencia emitida en el intestino de los nematodos.

En el caso de la cepa N2, se puede observar un aumento de la fluorescencia en comparación al control en todas las dietas probióticas, en especial en las dietas de *L.plantarum* completa y dieta mixta con *L.rhamnosus* (figura 8D- 8F), lo que se podría correlacionar con la disminución de las características fisiológicas, como el movimiento de dichas larvas.

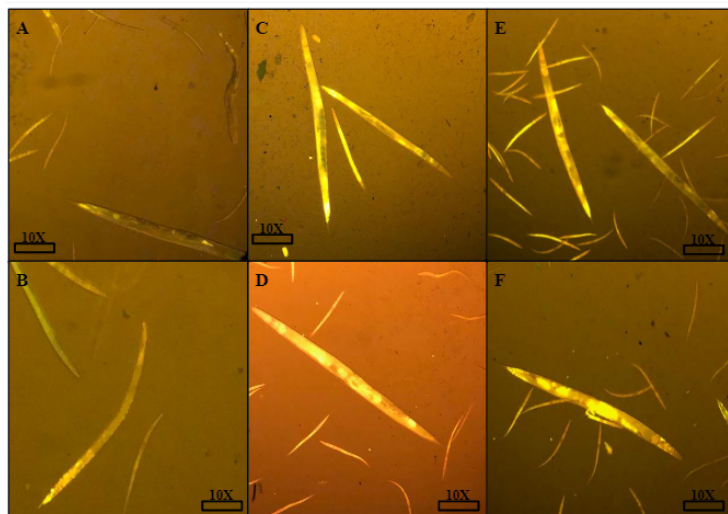


Figura 10. Evaluación cualitativa de la acumulación de lípidos intestinales en la cepa N2 de *C. elegans* tras el consumo de cepas probióticas. La acumulación de lípidos intestinales en el nematodo fue evaluada mediante la coloración de rojo Nilo. (A-B) Nematodos con dieta control, se observa una baja acumulación de grasa intestinal, evidenciada por fluorescencia. Contrario a lo observado en las dietas probióticas en donde evidencia un aumento en la acumulación de grasa a nivel intestinal, debido a una mayor fluorescencia en comparación al control. (C) Dieta mixta con *L. plantarum*, (D) Dieta completa con *L. plantarum*, (E) Dieta completa con *L. rhamnosus* y (F) Dieta mixta con *L.rhamnosus*. Fotografías tomadas en microscopio de

fluorescencia a una longitud de onda de 495 nm. (Elaboración por autores).

Por el contrario, cuando se observa la cepa mutante AX1410 los niveles de fluorescencia a nivel intestinal disminuyen notoriamente en los grupos con dieta probiótica, especialmente en el caso de la dieta mixta con *L.rhamnosus*, reduciendo los acumulados de grasa en comparación a los observados en el control; lo anterior, también puede correlacionarse con un mayor tiempo de vida de las larvas como se observó en la figura 7B.

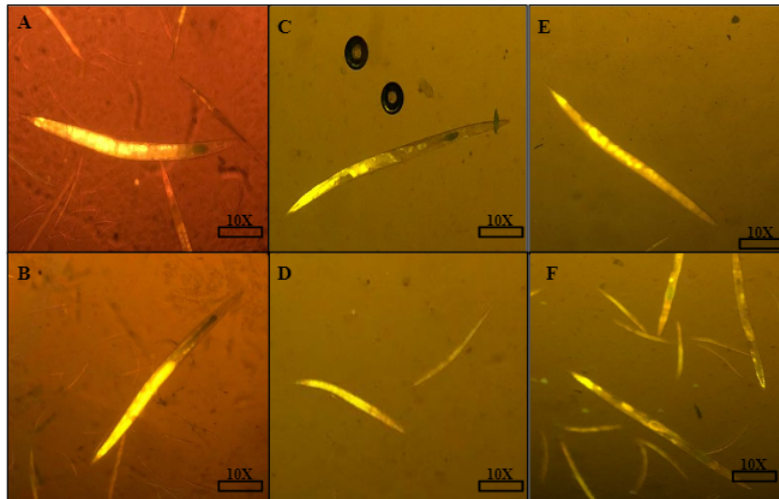


Figura 11. Evaluación cualitativa de la acumulación de lípidos intestinales en la cepa mutante AX1410 de *C. elegans* tras el consumo de cepas probióticas. La acumulación de grasa intestinal en el nematodo fue evaluada por medio de la coloración con rojo de Nilo. (A-B) Nematodos con dieta control, se observa una alta fluorescencia a nivel intestinal, lo que demuestra acúmulos de grasa. Opuesto a lo observado en las dietas probióticas en donde se evidencia una disminución en los acumulados de grasa a nivel intestinal en comparación a la dieta control. (C) Dieta mixta con *L.plantarum*, (D) Dieta completa de *L.plantarum*, (E) Dieta completa de *L.rhamnosus*, (F) Dieta mixta con *L.rhamnosus*. Fotografías tomadas en microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 495 nm. (Elaboración por autores).

5. DISCUSIÓN

La salud intestinal ha sido un tema de interés en los últimos años, mantener su estabilidad es un reto para la sociedad actual, más aún cuando se ha visto que puede llegar a influir significativamente en la evolución de ciertas enfermedades, regulando procesos inmunológicos o estimulando la producción de enzimas de importancia (22). Es por ello, que los probióticos resultan ser una herramienta prometedora en la recuperación de condiciones intestinales ideales y en el mantenimiento de las mismas cuando se ven afectadas por procesos patológicos o por el consumo de sustancias; sin embargo, como se pudo observar en los resultados del presente estudio, una implementación inadecuada o innecesaria de los probióticos puede resultar en una disminución de la calidad de vida de modelos biológicos, como se evidenció en el caso de la cepa silvestre N2, al verse disminuidos aspectos como longevidad, reproducción y resistencia al estrés térmico, contrario a los resultados

reportados por Nakawaga, et al. (11)

Por otro lado, las cepas de los nematodos tuvieron comportamientos fisiológicamente diferentes, se observó una diferencia estadísticamente significativa cuando se evaluó el tiempo transcurrido en las etapas larvianas, lo que sugiere un alargamiento en el ciclo de vida inducido por la mutación presentada en la cepa AX1410. Esta diferencia se tuvo en cuenta durante este estudio. Es así, como al momento sincronizar el primer pase de AX1410 se realiza posterior al pase de N2, con el fin de llegar a una misma etapa larvaria y que no haya sesgos entre los dos grupos de estudio.

Por lo anterior, es importante evaluar y ampliar los conocimientos ante los mecanismos de acción que los diferentes probióticos realizan en el organismo para no caer en el error de incorporar cepas que puedan afectar las características fisiológicas del mismo; adicionalmente, esto puede facilitar la implementación del probiótico como terapia completa y no solo como un apoyo terapéutico, como se ha venido trabajando.

El estado de la dieta en este caso, parece ser un parámetro importante, ya que más del 70% de las larvas en el ensayo de preferencia alimenticia tanto para N2, como para AX1410 tenían mayor afinidad por las bacterias metabólicamente activas, particularmente en la cepa N2, cuya movilidad es mayor, ya que su contracción muscular no se ve afectada y esto le permite mayor desplazamiento y eficiencia en la búsqueda de alimento ³⁶.

Se sugiere que los probióticos evaluados pueden estar desencadenando efectos benéficos en los nematodos AX1410, tanto en la composición de grasa intestinal como en la extensión de la vida útil, esto puede estar relacionado con la reproducción, pues se evidenció que los nematodos con una longevidad más corta respecto al control, tenían una reproducción más activa que los nematodos que prolongaron su vida tras el consumo con *Lactobacillus*, estas observaciones similares ya han sido reportadas con anterioridad y actualmente se sabe que la reproducción, al ser un proceso energéticamente costoso para *C. elegans*, también afecta la longevidad del mismo, tanto así, que por estimulación de probióticos se van a activar vías de señalización de antienvjecimiento como la señalización de insulina/IGF-1, esto obedece a lo discutido por Malene, et at.

Por último, es importante destacar que, en la implementación de cepas probióticas como terapia de enfermedades intestinales, se deben considerar los mecanismos de acción que poseen las cepas empleadas; de hecho, el género *Lactobacillus* posee la ventaja de producir algunos metabolitos reguladores, que permiten que la interacción entre los nematodos y las bacterias sea efectiva y por lo tanto, facilitar la observación del efecto de los probiótico.

Adicionalmente, *C. elegans* no parece ser un organismo selectivo en cuanto a su alimentación, ya que se ha observado que, aunque los nutrientes no estén fácilmente disponibles posee una gran capacidad de adaptación al ambiente, por lo cual sus características morfológicas permiten la observación de los efectos desencadenados por *Lactobacillus*, sugiriendo que el nematodo es un modelo efectivo para el

estudio de probióticos como lo reporta Roselli M et al (30).

CONCLUSIONES

1. Los efectos producidos en las cepa N2 de *C.elegans* tras el consumo de probióticos evidenciaron una disminución en el desarrollo general del nematodo con respecto al control, caso contrario a lo observado en la cepa AX1410.
2. Las concentraciones óptimas de las dietas de *L. rhamnosus* y *L. plantarum* fueron de 0,5 y 0,7 McFarland para N2 y AX1410 respectivamente (con un $p= 0,0034$ para N2 y un $p = 0.04212$ para AX1410), en donde se observó una mayor reproducción y movilidad en comparación con las demás concentraciones, lo que indica un mejor desarrollo de los nematodo, cumpliendo lo establecido por la FAO/OMS.
3. Con respecto al ensayo de longevidad no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. Los nematodos N2 disminuyeron su tiempo de vida al consumir *L. plantarum* y *L. rhamnosus* presentando un $p= 0.0466$; contrario a lo observado en la cepa mutante AX1410, donde los nematodos tuvieron una vida media similar al control, incluso dos de las dietas (mixta *L. rhamnosus* y completa *L. plantarum*) mostraron un leve incremento en su vida útil.
4. En el ensayo de resistencia al estrés térmico los nematodos N2 con dietas probióticas, mostraron una disminución con respecto al control, sin embargo, en la cepa AX1410, se evidenció una mayor resistencia respecto al control (presentando un $p < 0.05$), por lo que se puede deducir la activación de mecanismos de termotolerancia.
5. La acumulación de grasa intestinal tras la alimentación con las cepas probióticas mostró para la cepa N2 un aumento, evidenciada por un aumento en la fluorescencia a nivel intestinal, a diferencia de la cepa mutante AX1410 donde se observó una disminución en la fluorescencia a nivel intestinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz MJ. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans* [Internet]2003;124(1):43-8. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0047637402001689?via%3Dihub>
2. FAO, OMS. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudios FAO alimentación y nutrición [Internet]. 2006;85:52. Available from:
file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf
3. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. Nature [Internet]. 2007;449(7164):804–10. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nature06244#citeas>
4. Kaveh Ashraf. Obesity and the regulation of fat metabolism. WormBook [Internet]. 2007;1–20. Available from:
http://www.wormbook.org/chapters/www_obesity/obesity.pdf
5. Sáenz, Tomás Agurto RJ. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS : BIOPRESERVANTE DE LOS ALIMENTOS. 2008;8:54–64. Available from: file:///C:/Users/Admsoporte/Downloads/865-Texto del artículo-1883-1-10-20170902.pdf
6. Salvetti E, Torriani S, Felis GE. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. Probiotics and Antimicrobial Proteins [Internet]. 2012;4(4):217–26. Available from:
<https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/article/10.1007/s12602-012-9117-8>
7. Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, et al. Anti-Inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE. 2012;7(12).
8. Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. Infection and Immunity [Internet]. 2012;80(7):2500–8. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416467/pdf/zii2500.pdf>
9. Mackowiak PA. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. Frontiers in Public Health. 2013;1(NOV):1–3.
10. Oliveira G, González-molero I. Endocrinología y Nutrición Actualización de probióticos , prebióticos y simbióticos. 2016;63(9):482–94. Available from:
<https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-actualizacion-probioticos-prebioticos-simbioticos-nutricion-S1575092216301139>
11. Nakagawa, Hisako et al. “Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*.” Aging cell vol. 15,2 (2016): 227-36. doi:10.1111/accel.12431
12. Garrote A BR. Probioticos. Farmacia Abierta [Internet]. 2017;31(5):13–6. Available from:
<https://www.enfermeriaaps.com/portal/probioticos-farmacia-profesional-2017>

13. Heeney D, Gareau M MM. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Physiol Behav* [Internet]. 2017;176(12):139–48. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5808898/>
14. Kamaladevi A, Balamurugan K. *Lactobacillus casei* triggers a TLR mediated RACK-1 dependent p38 MAPK pathway in *Caenorhabditis elegans* to resist *Klebsiella pneumoniae* infection. *Food and Function* [Internet]. 2016;7(7):3211–23. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/FO/C6FO00510A>
15. Azat R, Liu Y, Li W, Kayir A, Lin D bo, Zhou W wen, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *Journal of Zhejiang University: Science B* [Internet]. 2016;17(8):597–609. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4980438/pdf/JZUSB17-0597.pdf>
16. Smolentseva O, Gusarov I, Gautier L, Shamovsky I, Defrancesco AS, Losick R, et al. Mechanism of biofilm-mediated stress resistance and lifespan extension in *C. elegans*. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(1):1–16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5540977/> %0A
17. Watts JL, Ristow M. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* [Internet]. 2017;207(2):413–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5629314/pdf/413.pdf>
18. Yoon D, Lee M-H, Cha D. Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. *Bio-Protocol* [Internet]. 2018;8(6):1–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937271/>
19. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients* [Internet]. 2018;10(1):1–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793270/>
20. Mantegazza C, Molinari P, D'Auria E, Sonnino M, Morelli L, Zuccotti GV. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacological Research* [Internet]. 2018;128:63–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.001>
21. Park HEH, Jung Y, Lee SJ v. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells* [Internet]. 2018;40(2):90–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5339508/pdf/molce-40-2-90.pdf>
22. Bhardwaj A, Thapliyal S, Dahiya Y, Babu K. FLP-18 functions through the G-protein-coupled receptors NPR-1 and NPR-4 to modulate reversal length in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*. 2018 May 16;38(20):4641–54.
23. Tankou SK, Regev K, Healy BC, Tjon E, Laghi L, Cox LM, et al. A probiotic modulates the microbiome and immunity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* [Internet]. 2018;83(6):1147–61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6181139/>
24. Liu YW, Liong MT, Tsai YC. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *Journal of Microbiology* [Internet]. 2018;56(9):601–13. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-018-8079-2>

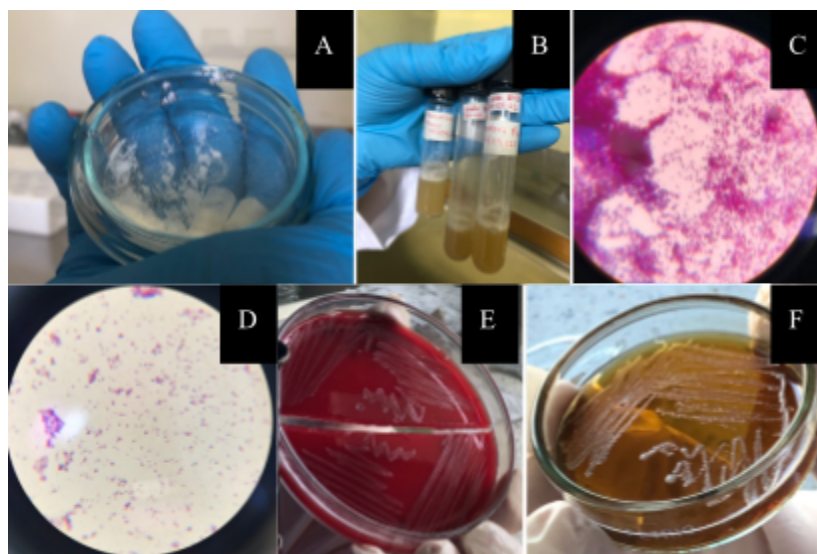
25. Schnadower D, Tarr PI, Casper TC, Gorelick MH, Dean JM OK et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG versus Placebo for Acute Gastroenteritis in Children. *Physiol Behav* [Internet]. 2017;176(12):139–48. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6358014/>
26. Dimov I, Maduro MF. The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell and Tissue Research* [Internet]. 2019;377(3):383–96. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/content/pdf/10.1007/s00441-019-03036-4.pdf>
27. Meng Y, Wang J, Wang Z, Zhang G, Liu L, Huo G, et al. *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0318 ameliorates impaired intestinal immunity and metabolic disorders in cyclophosphamide-treated mice. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2019;10(APR). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00731/full>
28. Zimmermann J, Obeng N, Yang W, Pees B, Petersen C, Waschina S, et al. The functional repertoire contained within the native microbiota of the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *ISME Journal* [Internet]. 2020;14(1):26–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-019-0504-y>
29. Sharma K, Pooranachithra M, Balamurugan K, Goel G. Multivariate Analysis of Increase in Life Span of *Caenorhabditis elegans* Through Intestinal Colonization by Indigenous Probiotic Strains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* [Internet]. 2019;11(3):865–73. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/content/pdf/10.1007/s12602-018-9420-0.pdf>
30. Roselli M, Schifano E, Guantario B, Zinno P, Uccelletti D, Devirgiliis C. *Caenorhabditis elegans* and probiotics interactions from a prolongevity perspective. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019;20(20):1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6834311/pdf/ijms-20-05020.pdf>
31. Zeng L, Yang Z, Yun T, Fan S, Pei Z, Chen Z, et al. Antiaging effect of a Jianpi-yangwei formula in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [Internet]. 2019;19(1):1–10. Available from: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-019-2704-4>
32. Le TAN, Selvaraj B, Lee JW, Kang K. Measuring the effects of bacteria and chemicals on the intestinal permeability of *caenorhabditis elegans*. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2019;2019(154):1–10. Available from: <https://www.jove.com/t/60419/measuring-effects-bacteria-chemicals-on-intestinal-permeability>
33. Goya E, C, Ball KL, Stanley-wall NR, Xue F, Sampedro-torres-quevedo C, et al. Probiotic *Bacillus subtilis* Protects against a -Synuclein Aggregation in *C. elegans* Article Probiotic *Bacillus subtilis* Protects against a -Synuclein Aggregation in *C. elegans*. 2020;367–80. Available from: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2211-1247%2819%2931743-7>
34. Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart de Foy JM, Dequenne I, et al. How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;9(January).
35. Poupet C, Chassard C, Nivoliez A, Bornes S. *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Nutrition* [Internet]. 2020;7(August):1–22. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2020.00135/full>
36. Liu H, Li D, Zhang R, Sun L, Wang D. Lipid metabolic sensors of MDT-15 and SBP-1 regulated the response to simulated microgravity in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 2020;528(1):28–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.099>

37. Beydoun S, Choi H, Dela-Cruz G, Kruempel J, Huang S, Bazopoulou D, Miller H. An alternative food source for metabolism and longevity studies in *Caenorhabditis elegans*. *Commun Biol* 4, 258 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01764-4>

ANEXOS

Paralelo a los ensayos con el nematodo, se procedió a realizar el aislamiento de las cepas de interés del probiótico comercial Jarro - Dophilus, donde se realizaron diferentes repiques en agar selectivo MRS, con el fin de garantizar una mejor separación de las cepas interés del resto de bacterias encontradas dentro del producto comercial.

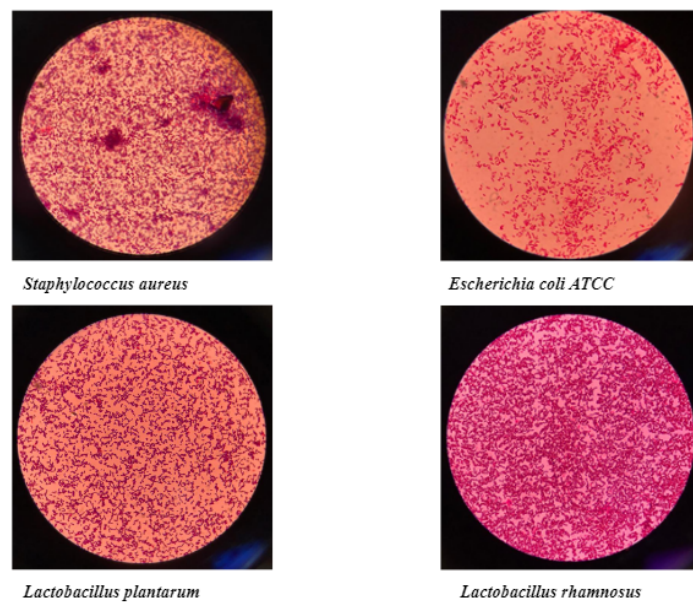
Sin embargo, como se pudo observar en la tabla 1. Jarro - Dophilus contiene cepas de *Lactococcus*, las cuales también van a crecer en medio MRS, lo que causó inconvenientes en el proceso de aislamiento de las cepas de interés; uno de los inconvenientes radica en la facilidad de crecer de este microorganismo y la similitud de las colonias en comparación con *Lactobacillus*. Debido a esto, las cepas utilizadas en el estudio fueron cepas ATCC donadas al grupo de investigación de Biotecnología y genética, correspondientes a *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.



Anexo 1. Aislamiento de cepas de *Lactobacillus* del producto comercial Jarro-Dophilus Se pueden observar

medios de cultivo y tinción de gram realizados en las diferentes etapas del aislamiento de *Lactobacillus*; (A) Contenido liofilizado del producto jarro-Dophilus (B) Caldo BHI a las 24 horas de incubación a 37 °C después de agregar 3/5 partes de una cápsula liofilizada de 48 mg del probiótico, se observó turbidez en los tres caldos y en la parte inferior restos del producto; (C) tinción de gram del primer cultivo del liofilizado, donde se puede ver la variedad de bacterias encontradas en el liofilizado (cocos gram positivos y bacilos gram positivos); (D) tinción de gram del segundo repique del liofilizado, donde se escogieron colonias medianas y cremosas, compatibles con el género *Lactobacillus*; (E) colonias, presuntamente de *Lactobacillus* en agar sangre, proveniente del segundo repique del producto comercial; (F) tercer repique del producto comercial, realizado en agar MRS.

Tinciones de aislados provenientes de las donaciones de cepas ATCC de *L. rhamnosus* y *L. plantarum*.



Anexo 2. Controles de calidad, tinción de Gram



Anexo 3. Participación en eventos de investigación