Plataformas preclínicas *in vitro* - *in vivo* para validar aislados de la microbiota humana como probióticos de nueva generación: un acercamiento a través de la vigilancia tecnológica

Geraldinne Ruiz Crespo y Susana Arteaga Arango

Proyecto de grado para optar por el título de biólogas

Asesora

Laura Sierra Zapata, PhD

Universidad EAFIT

ESCUELA DE CIENCIAS

BIOLOGÍA

MEDELLÍN

2022

Agradecimientos generales

Para nosotras es una gran satisfacción, el haber emprendido un camino académico en la Universidad EAFIT, en la cual no solo fueron de conocimientos prácticos o teóricos, sino también una experiencia enriquecedora, en donde se forjaron algunos vínculos afectivos con docentes y compañeros de los cuales hubo un aprendizaje mutuo.

Queremos agradecerle principalmente a nuestra mentora Laura Sierra por su dedicación, entrega, amor, paciencia, amabilidad, disponibilidad y tranquilidad que tuvo en este proceso tan definitivo para nosotras, en donde nos hizo sentir que no estábamos solas, si no que siempre estuvo para ayudarnos y acompañarnos en cada uno de los momentos. Además, queremos agradecerle por cada uno de los conocimientos y enseñanzas entregadas.

"Quiero dedicar este trabajo a toda mi familia en especial a mi abuela que ya no está, pero siempre fue un apoyo incondicional para mí en todos los momentos especiales y difíciles de mi vida, a mis padres, hermana, y mis demás seres queridos por creer siempre en mí. También quiero agradecerle a mi novio por apoyarme y darme fuerzas siempre."

Susana Arteaga A

"En esta culminación de esta etapa tan importante y en cierta parte tan definitiva para mi vida, fue posible gracias al acompañamiento, apoyo, amor, motivación y compresión incondicional de cada uno de los miembros más importantes en mi vida, como lo es mi mamá, mi papá, mi hermano, mi novio y mis abuelos que a pesar de todo nunca me dejaron caer, sino que, todo lo contrario, me levantaron. Sin embargo, este logro se lo quiero regalar a mis más preciados seres que son mi abuela y mi abuelo, que, aunque no pudieron presenciar este momento de forma física porque partieron antes de tiempo, siguen acá a mi lado, dando las fuerzas para afrontar cada uno de los obstáculos con la mejor actitud."

Geraldinne Ruiz C.

Contenido

1 Resumen 4
2 Introducción 4
2.1 Origen y definición de los probióticos 4
2.2 La microbiota intestinal como fuente de probióticos 6
2.3 Probióticos tradicionales y de nueva generación 6
2.4 Criterios de validación de cepas con potencial probiótico 6
3 Pregunta de Investigación e Hipótesis 10
3.1 Pregunta de investigación 10
3.2 Hipótesis 11
4 Objetivos 11
4.1 Objetivo general 11
4.2 Objetivos específicos 11
5 Metodología 12
6 Alcance de proyecto 15
7 Resultados 15
8 Discusión 44
9 Conclusiones 45
10 Referencias 46
11 Anexos 52
11.1 Tabla de mando ampliada 52
11.2 Estado del arte 52

1 Resumen

Los probióticos, o microorganismos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas otorgan un beneficio a la salud del huésped, han sido principalmente aislados de alimentos fermentados, de la microbiota humana o de otras fuentes naturales. Antes de ser usados para tales fines, deben someterse a pruebas de seguridad y eficacia, y si bien los marcos regulatorios de cada país exigen comprobar estas características antes de permitir el uso de un microorganismo como probiótico, no existe un consenso sobre las pruebas a realizarse, quedando a discreción del equipo científico a cargo, la elección de las pruebas a realizar con base en el estado del arte. Con el fin de evaluar el potencial de cepas de una colección de la Universidad EAFIT provenientes de la microbiota humana, de convertirse en probióticos de nueva generación, el presente proyecto usó la vigilancia tecnológica (VT), para elegir las pruebas y ensayos adecuados para evaluar el potencial probiótico de dichos microorganismos y a su vez conocer, dentro del ecosistema regional, los actores que permiten impulsar la validación preclínica de cepas microbianas a ser usadas como probióticos. Al aplicar la metodología de VT hallamos que la técnica más adecuada para evaluar un potencial probiótico de acuerdo con las capacidades instaladas, la disponibilidad de equipos dentro del ecosistema, y la información que entrega son las evaluaciones *in vitro* de actividad antimicrobiana contra patógenos intestinales, de eficacia, junto con la prueba de evaluación de resistencia a antimicrobianos, esta última de seguridad e igualmente *in vitro*. Se lograron implementar dichas pruebas a la cepa *Lacticaseibacillus rhamnosus M32,* con el fin de demostrar su potencial probiótico. Finalmente, es posible concluir que la metodología de vigilancia tecnológica permite recopilar del estado del arte, las técnicas y ensayos más apropiados para validar cepas probióticas y hallar aliados dentro del ecosistema regional que amplíen las capacidades de investigación y desarrollo en esta área de la nutrición y la microbiota intestinal humana.

2 Introducción

2.1 Origen y definición de los probióticos

Existen ciertos microorganismos vivos que administrados a través de la dieta humana, confieren beneficios a la salud del huésped debido a sus capacidades metabólicas que se convierten en propiedades funcionales (FAO, 2021). Estos deben ser administrados en concentraciones y cantidades adecuadas para

ejercer la función benéfica y se les denomina probióticos (FAO, 2021; Lahtinen et al., 2009; Ma et al., 2021). La historia de estos microorganismos benéficos se remonta a principios de los años 1900, donde el ganador del Nobel Elie Metchnikoff, un científico ruso que trabajaba en el instituto Pasteur en Paris logró demostrar una mayor longevidad en habitantes de Bulgaria rural, debido al consumo de productos lácteos fermentados, como el Yogurt y otros derivados; el agente activo era *Bacillus bulgaricus,* hoy conocido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (Gasbarrini et al., 2016; Zendeboodi et al., 2020). A pesar de su descubrimiento relativamente reciente, los probióticos han sido parte natural de la alimentación del ser humano a lo largo de toda su historia, debido a su alta presencia en alimentos y bebidas fermentadas que se consumían sobre todo en poblaciones rurales y les otorgaba una vida prolongada (Gasbarrini et al., 2016; Zendeboodi et al., 2020). Diversos estudios sugieren que los probióticos desempeñan un papel importante en la regulación de los sistemas inmune, digestivo y respiratorio, y en la disminución de la inflamación sistémica (Cigarran Guldris et al., 2017; Gasbarrini et al., 2016; Icaza-Chávez, 2013; Lahtinen et al., 2009; Ma et al., 2021).

Según el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH), cuando los probióticos, son consumidos y logran colonizar el tracto gastrointestinal o cuando son aplicados al cuerpo y logran colonizar la piel, tienen la capacidad de generar beneficios en la salud del huésped, tales como: la reducción del colesterol, prevención del cancer en el colón y de enfermedades intestinales, entre otros (FAO, 2021; Zendeboodi et al., 2020). Aunque los probióticos se encuentran naturalmente en el yogurt y otros alimentos fermentados, también son consumidos en forma de suplementos dietarios, y productos de cuidado personal (FAO & WHO, 2002; Yisong & Shurtleff, 2019).

Para que un microorganismo se convierta en un probiótico y pueda ser parte de matrices alimenticias o formulaciones, debe someterse a validaciones de seguridad y eficacia, ya que existen barreras fisiológicas como el pH bajo estomacal, las sales biliares, enzimas, entre otras, que pueden afectar la supervivencia de estos, hasta su llegada al sitio de acción (Hill et al., 2014; Roobab et al., 2020). En otros casos, estos microorganismos con rasgos positivos pueden ser simultáneamente causantes de infección y liberar factores de virulencia causando así también enfermedad (Cigarran Guldris et al., 2017; Icaza-Chávez, 2013; Lahtinen et al., 2009; Ma et al., 2021; Vinderola et al., 2017).

Por ende, cualquier cepa microbiana que quiera usarse como un probiótico debe superar pruebas analíticas que evidencien su eficacia para llegar al sitio de acción tales como, supervivencia a sales biliares y pH ácido, adhesión a células intestinales, generación de antioxidantes, entre otros (Naissinger da Silva et al., 2021; Sorokulova, 2008). Además, se deben validar pruebas de seguridad y

ausencia de factores de virulencia o de capacidad de infección, tales como la resistencia a antibióticos, la presencia de genes de resistencia antimicrobiana (ARG), producción de enterotoxinas y producción de factores virulentos (Naissinger da Silva et al., 2021; Sorokulova, 2008).

2.2 La microbiota intestinal como fuente de probióticos

En la actualidad, la riqueza y fuente de probióticos que hay en la microbiota intestinal no se ha comprendido completamente (Cigarran Guldris et al., 2017; Icaza-Chávez, 2013), ya que cerca del 60% de éstas, no han sido cultivadas aún (de Melo Pereira et al., 2018; Terpou et al., 2019) inclusive cuando existen avances en otros campos como las multi-ómicas, a través de las cuales se ha evidenciado una elevada diversidad de bacterias y hongos conviviendo con animales en el tracto gastrointestinal (Gueimonde et al., 2007; Hamilton-Miller & Shah, 2002). Esto evidencia, la necesidad de reforzar el cultivo y aislamiento de individuos de la microbiota intestinal para estudiar su metabolismo, distribución y roles dentro de la microbiota y poder concluir sobre su potencial uso probiótico (Gueimonde et al., 2007; Hamilton-Miller & Shah, 2002).

2.3 Probióticos tradicionales y de nueva generación

La mayoría de los probióticos conocidos y usados actualmente, pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifodobacterium*, los cuales son microorganismos Gram-positivos que no forman esporas y que han sido aislados principalmente de fuentes alimenticias fermentadas (de Melo Pereira et al., 2018; Gueimonde et al., 2007; Hamilton-Miller & Shah, 2002). Sin embargo, recientemente, se han conformado nuevos probioticos pertenecientes a la microbiota intestinal que anteriormente no habían sido aislados, dando paso a una nueva generación de cepas con potencial probiótico que una vez aprobados, pasan a llamarse probióticos de nueva generación o bioterapéuticos microbianos (O'Toole et al., 2017; Torp et al., 2022). Estas nuevas aproximaciones a las intervenciones de la microbiota intestinal, se consideran ingredientes funcionales novedosos, lo cual ha llevado a la implementación de requisitos más estrictos que los tradicionales con el fin de certificar su uso en humanos y animales (Gullot & Ambato, 2021; Hdez et al., 2015).

2.4 Criterios de validación de cepas con potencial probiótico

Lo anterior, ha llevado a establecer, los siguientes criterios para validar una cepa con potencial probiótico o seleccionar un candidato a partir de un grupo de aislados microbianos:

I. Seguridad: la cepa microbiana debe ser segura, tanto en los humanos como en los animales, es decir, no deben presentar factores de virulencia como genes de resistencia a antimicrobianos (ARG), ni presentar rasgos o efectores de patogenicidad, tales como, enterotoxinas producidas especialmente por bacterias del género *Staphylococcus* que pueden producir enfermedades gastrointestinales que causan vómito y diarrea (Burdock & Carabin, 2004; Naissinger da Silva et al., 2021; Sorokulova, 2008). Tampoco deben producir bacteriemia o fungemia (capacidad de las células microbianas de trasladarse a la sangre, especialmente en individuos inmunodeprimidos), ni deben afectar la integridad intestinal (no degradar la barrera epitelial, no aumentar la permeabilidad, no disminuir la cantidad de mucosa intestinal, no promover la vascularización, no afectar la absorción de nutrientes y fortalecer la respuesta inmune dentro del tracto) (Bischoff, 2011; Chelakkot et al., 2018; Lahtinen et al., 2009; Mater et al., 2007).

II. Identificación fenotípica y molecular: esto implica la realización de pruebas fenotípicas basadas en la caracterización enzimática y morfológica de las cepas, identificando sus propiedades bioquímicas y metabólicas (Felis & Dellaglio, 2007; Maleki Kakelar et al., 2019). Otros métodos usados implican la identificación molecular, como hibridación de ADN, ARNr 16S y la secuenciación de genes (Felis & Dellaglio, 2007; Maleki Kakelar et al., 2019). Este paso es fundamental para un futuro proceso de etiquetado en un producto comercial que contenga el probiótico (Felis & Dellaglio, 2007).

III. Eficacia y funcionalidades: la colonización, la adhesión a la barrera intestinal, la tolerancia a pH bajo y sales biliares son criterios fundamentales para validar la eficacia de un probiótico (de Melo Pereira et al., 2018; Marteau & Shanahan, 2003; Williams, 2010). La funcionalidad, a diferencia de la eficacia, se basa en la capacidad metabólica especifica que tiene un microorganismo, es decir el efecto benéfico de una cepa que no tienen otras de su misma especie o de especies cercanas (de Melo Pereira et al., 2018; Marteau & Shanahan, 2003; Williams, 2010). Un ejemplo de esto son ciertas cepas de la especie *Akkermansia muciniphila* que estimulan la regeneración de la barrera intestinal, modulando el equilibrio de ésta y el metabolismo del huésped, además de restaurar las uniones estrechas de las células epiteliales de la

mucosa intestinal, atraves del aumento de ésta, y esto permite el mejoramiento de los trastornos metabólicos (Gullot & Ambato, 2021).

IV. Criterios tecnológicos: esto se refiere a la estabilidad del microorganismo en métodos de procesamiento y almacenamiento, facilidad de escalamiento y buenas propiedades sensoriales (Felis & Dellaglio, 2007; Torp et al., 2022; Vankerckhoven et al., 2008).

Para validar los anteriores criterios, es necesario realizar ensayos *in vitro* y/o *in vivo,* a través de diferentes pruebas que incluyen el uso de líneas celulares, o modelos animales respectivamente, ya que representan herramientas para validar los criterios de seguridad, eficacia y funcionalidad (de Melo Pereira et al., 2018). Además, cuando se busca seleccionar una cepa probiótica a partir de un grupo de candidatos, estas pruebas actúan como filtros o tamices que permiten hallar los mejores candidatos para seguir a estudios clínicos posteriores (Guantario et al., 2018).

Los casos en los que no se hace una correcta validación *in vitro o in vivo*, pueden llevar a la comercialización de cepas probióticas persistentes y con efectos nocivos a largo plazo en el tracto digestivo, llevando a una disbiosis[1] ; lo cual es precisamente lo que se busca corregir al consumirlos (Marteau & Shanahan, 2003). Un ejemplo de este efecto nocivo es el consumo de algunos probióticos como lactobacilos o cepas de bifidobacteria que pueden provocar exceso de la desconjugación de sales biliares o una degradación de la capa del moco intestinal, aunque no se han reportado efectos adversos graves en los ensayos clínicos (Marteau & Shanahan, 2003; Williams, 2010). Por esta razón, se ha hecho necesario que estas propiedades sean investigadas y evaluadas utilizando los ensayos *in vitro* y/o *in vivo.*

Hasta el año 2002, no existían regulaciones internacionales por parte de la FAO o la OMS para demostrar la eficiencia y seguridad de los microorganismos a usar como probióticos (Botta et al., 2014; de Melo Pereira et al., 2018). A partir de dicho año, se adaptaron los marcos regulatorios de cada país o región para comprobar esas características, lo cual tiene como finalidad proteger a los consumidores de productos probióticos con etiqueta engañosa (de Melo Pereira et al., 2018; Koirala & Anal, 2021).

Las pruebas que exigen las regulaciones, se agrupan dentro del término “evaluaciones preclínicas *in vitro* e *in vivo”*, en donde las primeras, no involucran a los seres humanos o animales, sino que se realizan empleando análisis

[1] Disbiosis: producto de un cambio en la estructura de la microbiota intestinal que conlleva a un desequilibrio entre las bacterias benéficas y dañinas (de Oliveira, 2022; Ducatelle et al., 2015).

bioquímicos que simulan el tracto gastrointestinal o las células del tejido donde va a realizarse la intervención, y permiten medir la capacidad de tolerancia al estrés del tracto gastrointestinal, al ambiente ácido del cuerpo y la adhesión a las barreras intestinales, pero también, permite medir la viabilidad y la funcionalidad del producto una vez se exponga a estas condiciones ecosistémicas o nichos (Marteau & Shanahan, 2003; Williams, 2010). Entre los beneficios de estas pruebas, están el no violentar éticamente al animal o a la persona de quienes se obtienen los cultivos celulares y la reducción de costos en el proceso de los análisis (Højelse, 2000; Marteau & Shanahan, 2003; Williams, 2010).

Una vez una cepa supera las pruebas *in vitro*, es necesario evaluarlo en un modelo animal (*in vivo*), ya que no todos los criterios mencionados pueden ser validados *in vitro*, como por ejemplo, las evaluaciones de tolerancia a las sales biliares, ya que la variación en los niveles de sales biliares en el íleon no se puede incorporar en los estudios *in vitro*, debido a que estos varían de acuerdo con las condiciones de estrés que generan los cambios ambientales de temperatura, pH y otras variables (Begley et al., 2005; Byakika et al., 2019; Højelse, 2000). Por lo anterior es necesario comprobar estas condiciones evaluándolas de manera *in vivo*, antes de que el producto o ingrediente probiótico sea probado en pacientes por medio de estudios clínicos (Begley et al., 2005; Byakika et al., 2019; Gueimonde et al., 2007; Højelse, 2000).

En cuanto a los ensayos *in vitro,* se recomienda el uso de células epiteliales intestinales humanas para evaluar su interacción con el microorganismo, de modo que sean capaces de expresar las características de diferenciación morfológica y funcional (Guantario et al., 2018). Respecto a los modelos *in vivo,* son de suma importancia, ya que permiten estudiar las interacciones huésped-probiótico, con el fin de probar los efectos de los microorganismos ingeridos en la fisiología del huésped, y proporcionar conocimientos mecanísticos de los efectos beneficiosos y la eficacia de los probióticos en escala sistémica (Guantario et al., 2018; Navarro Hernandez et al., 2012). Estas acciones es posible medirlas a partir de biomarcadores moleculares en fluidos corporales (Milajerdi et al., 2020). Un ejemplo de la necesidad de realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para cumplir los requerimientos actuales en una cepa con potencial probiótico, es el proyecto financiado por la Unión Europea y titulado PROSAFE (Biosafety Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria Used for Human Consumption), el cual demostró que el 28% de los cultivos probióticos comerciales no fueron evaluados correctamente por sus fabricantes o distribuidores (Huys et al., 2006; Vankerckhoven et al., 2008; Zielińska et al., 2018), acentuando la necesidad de realizar evaluaciones precisas y fiables de los probióticos, para evitar la inclusión de microorganismos potencialmente

patógenos en productos comerciales (Huys et al., 2006; Vankerckhoven et al., 2008).

Aunque existen los dos grupos de pruebas (*in vivo e in vitro)* para evaluar un potencial probiótico, que validen y verifiquen los criterios mencionados anteriormente, los microorganismos identificados dentro de los géneros tradicionales de uso probiótico *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp., no requieren de estas pruebas tan estrictas, ya que son clasificados como seguros. Por su parte, las cepas probióticas de nueva generación, si necesitan ser evaluadas rigurosamente (Borriello et al., 2003; Gullot & Ambato, 2021; Torp et al., 2022). Aún cuando la evidencia actual sugiere que los probióticos son seguros de usar, es preciso advertir que los resultados pueden ser diferentes de acuerdo con los métodos de evaluación que se utilicen bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* (Dunne et al., 2001). Ejemplo de ello, es un estudio realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización mundial de la salud (OMS), en la cual determinaron una falta de consenso respecto a los criterios y técnicas usadas para evaluar la eficacia y seguridad de los probióticos, por lo cual sugieren constantemente hacer una búsqueda sistemática de pruebas que validen estas propiedades (FAO, 2021; FAO & WHO, 2006).

Con base en lo anterior se recurre en este proyecto a la vigilancia tecnológica, la cual consiste en un proceso sistemático de búsqueda, clasificación y análisis de publicaciones y patentes, disponibles en bases de datos científicas y técnicas, para identificar, aproximarse y apropiarse de una técnica de interés (Porter et al., 2004). Nuestra propuesta usó esta herramienta para la elección de una serie de pruebas *in vitro* o de un modelo *in vivo* adecuados para la evaluación de nuevos organismos probióticos, además para identificar las capacidades instaladas del ecosistema de innovación, ciencia y tecnología a nivel nacional que puedan impulsar el desarrollo y validación preclínica de cepas con potencial probiótico. Todo esto, con miras a poder realizar una futura transferencia tecnológica de los microorganismos de las colecciones biológicas del departamento de ciencias biológicas de EAFIT, para ser usados como probióticos o ingredientes biológicos.

3 Pregunta de Investigación e Hipótesis

3.1 Pregunta de investigación

A partir de la vigilancia tecnológica y del entorno nacional ¿Cuáles son las mejores plataformas del ecosistema regional de ciencia, tecnología e innovación

para evaluar el potencial preclínico *in vitro* y/o *in vivo* de aislados de la microbiota intestinal, a ser empleados como probióticos de nueva generación?

3.2 Hipótesis

Se encontrará a través de las metodologías de vigilancia tecnológica al menos una plataforma *in vitro* o una *in vivo* en el ecosistema regional de C+T+i, que permitan validar correctamente los criterios necesarios para pre-clasificar una cepa de la colección de la Universidad EAFIT, aislada de la microbiota intestinal humana, como futuro probiótico de nueva generación.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer por medio de la vigilancia tecnológica el conjunto de pruebas *in vitro* y/o *in vivo* a realizar dentro del ecosistema de ciencia, tecnología e innovación regional, para validar aislados de la microbiota intestinal humana como potenciales probióticos de nueva generación.

4.2 Objetivos específicos

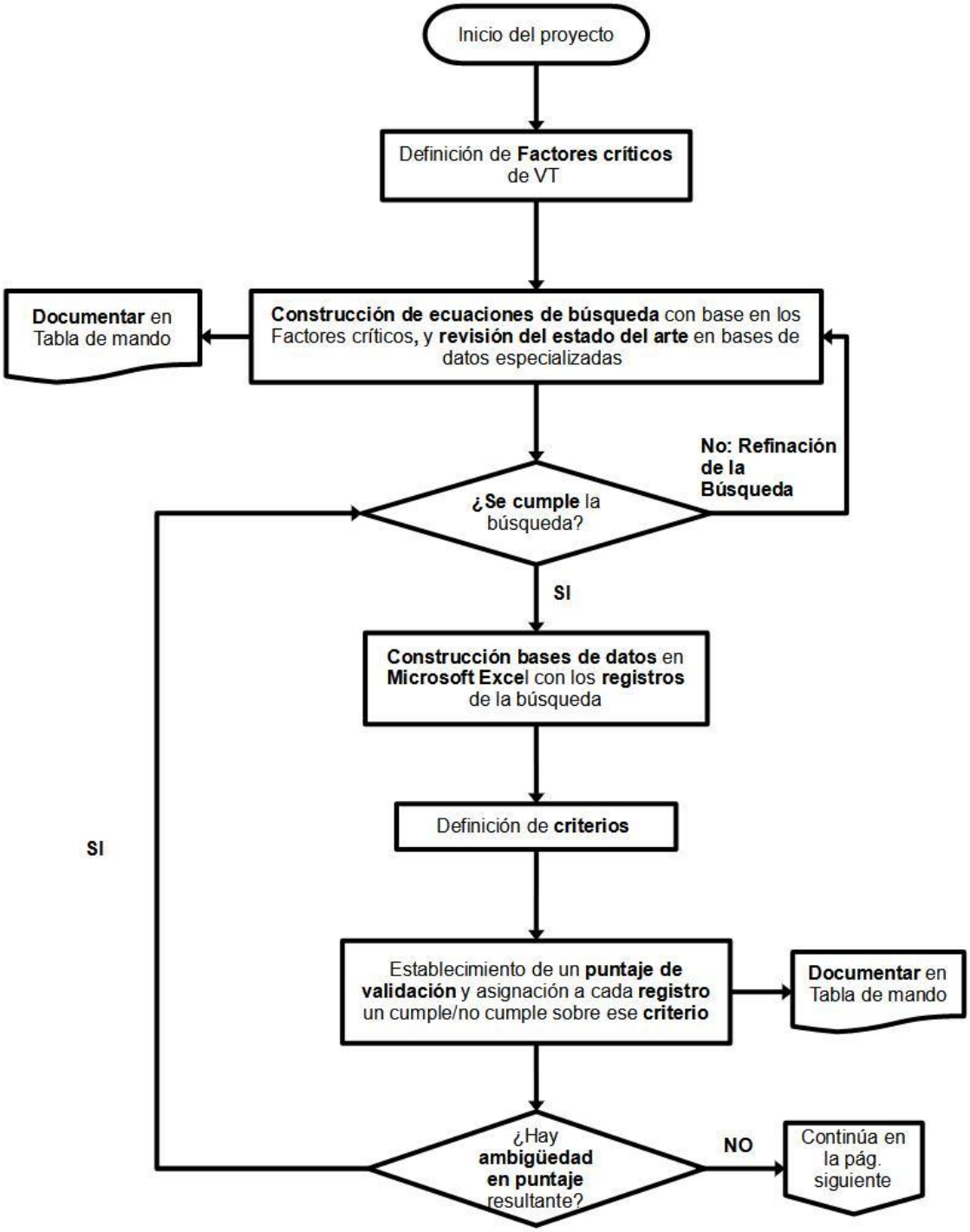
- Realizar una vigilancia tecnológica y del entorno de los modelos *in vitro* e *in vivo* existentes en el estado del arte para validar una cepa de la microbiota intestinal humana como futuro probiótico de nueva generación.
- Establecer una base de datos de aliados del ecosistema regional de ciencia, tecnología e innovación (CTi) que tenga estandarizado al menos uno de los modelos que proporcionó la vigilancia tecnológica y del entorno, y permita validar aislados de la microbiota humana como probióticos de nueva generación.
- Seleccionar racionalmente los modelos *in vitro o in vivo* más adecuados del ecosistema regional de CTi, para enviar a validación un aislado de la microbiota humana perteneciente a las colecciones de la Universidad EAFIT.

5 Metodología

La metodología para el alcance de los objetivos del trabajo de grado se representa mediante un diagrama de flujo**.** La siguiente tabla **(Tabla 1),** específica términos importantes para entender el flujo metodológico (**Figura 1**).

Tabla 1. Explicación de términos de la metodología correspondientes a la **Figura 1**

Término	Descripción
Factores críticos de VT	Palabras o términos clave para construcción de ecuaciones de búsqueda
Búsqueda y revisión del estado del arte	Búsqueda en bases de datos como: Scopus, Google scholar, Science Direct, Pubmed, Scielo, Frontiers, Carrot2, Web of science, Wipo
Documentar	Registro en Informe escrito y/o tabla de mando ampliada de vigilancia tecnológica.
Se cumple la búsqueda: Si	Ecuaciones de búsqueda exitosa: >10 artículos encontrados y artículos >2013 en adelante
Construcción base de datos en Microsoft Excel para registros	Recopilación de información o registros (*in vitro* e *in vivo)* para la evaluación de probióticos.
Registro	Plataforma *in vitro* e *in vivo* asociada o mencionada en un estudio. Se consigna en una línea de la tabla de mando ampliada y se específica los criterios que cumplen/no cumplen y la cita o referencia del estudio.
Criterios	Rasgo de las pruebas (*in vitro* e *in vivo*) que especifica la profundidad de entrega de información, beneficios o desventajas para el objetivo (evaluar la eficacia y seguridad de una cepa microbiana). Se establecieron según los hallazgos de la revisión del estado del arte. **Estos son aquellos que suman para el puntaje de validación**
Puntaje de validación	Resultado de aplicar un si/no a cada criterio de cada registro. Consiste en una una sumatoria de los criterios positivos (se asocian a un beneficio) y una resta de criterios que se asocian a una desventaja.
Puntaje ambigüo	No existe la información suficiente para asignar un puntaje de validación, hay empates o inconsistencias en la información, por lo cual, se regresa a la búsqueda y revisión del estado del arte.
Construcción base de datos en Microsoft Excel de posibles aliados	Recopilación de información de los posibles aliados de la ciudad o el país para contratar el servicio de validación como bioterapéuticos para los aislados de las colecciones de cepas de la universidad EAFIT. + entrevistas a expertos + contactos directos con los centros o agentes del ecosistema CTi.


Inicio del proyecto
Definición de **Factores críticos** de VT
Construcción de ecuaciones de búsqueda con base en los Factores críticos, y **revisión del estado del arte** en bases de datos especializadas
Documentar en Tabla de mando
No: Refinación de la Búsqueda
¿Se cumple la búsqueda?
SI
Construcción bases de datos en **Microsoft Excel** con los **registros** de la búsqueda
Definición de **criterios**
Establecimiento de un **puntaje de validación** y asignación a cada **registro** un cumple/no cumple sobre ese **criterio**
Documentar en Tabla de mando
¿Hay **ambigüedad en puntaje** resultante?
NO
Continúa en la pág. siguiente
SI

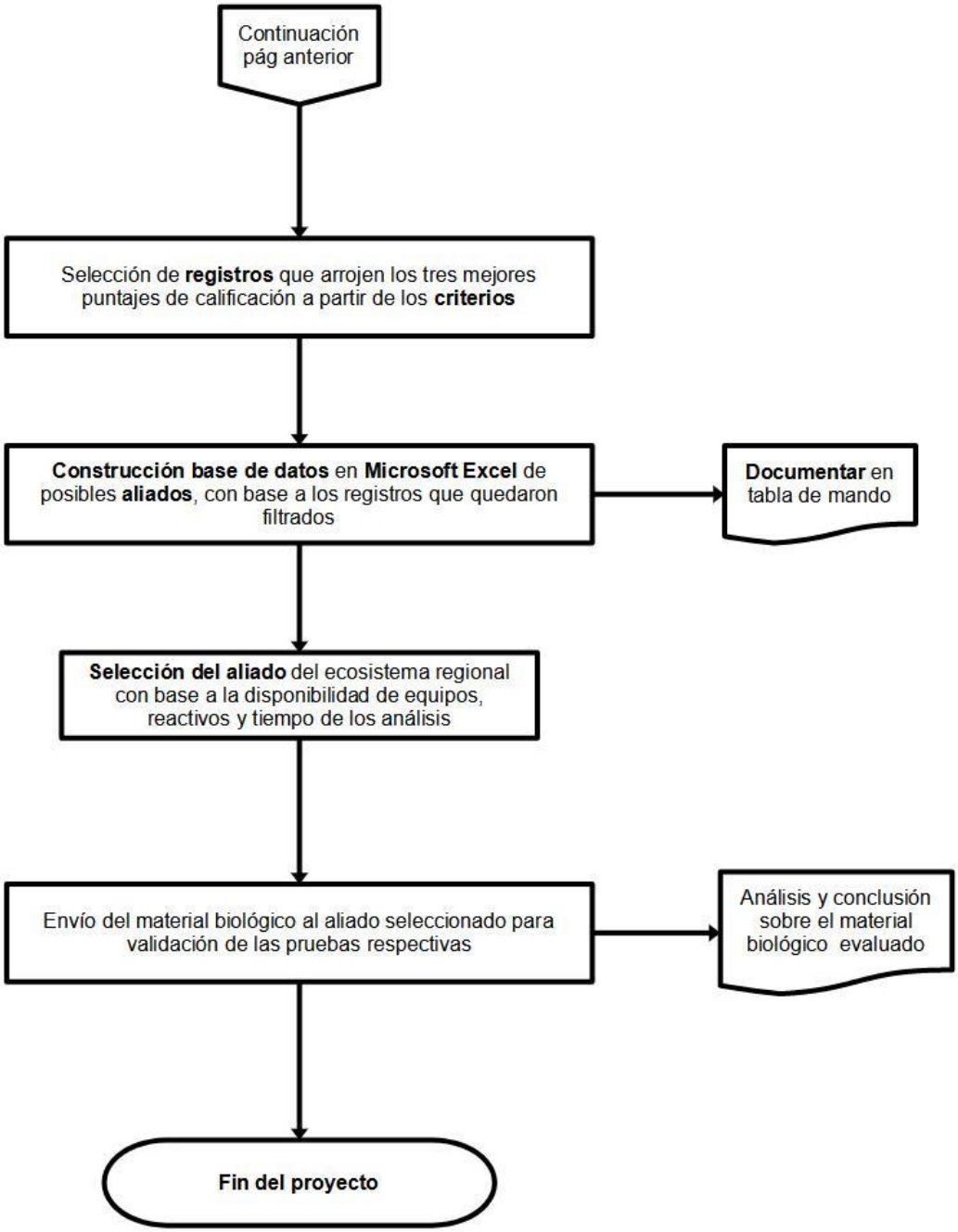


Figura 1. Diseño Metodológico para una Vigilancia Tecnológica

6 Alcance de proyecto

Al finalizar el presente trabajo de grado, se obtendrán los siguientes resultados:

- Cuadro de mando y de preguntas de inteligencia sobre la temática de "validaciones preclínicas *in vitro / in vivo* de microorganismos con potencial probiótico", producto de la vigilancia tecnológica y del entorno.
- Base de datos de los aliados existentes en el ecosistema de CTi regional que tengan capacidades instaladas en las plataformas de validación pre-clínica de probióticos de nueva generación o bioterapéuticos microbianos.
- Selección de una plataforma en el ecosistema regional para enviar a validación un aislado de la microbiota intestinal de la colección de la Universidad EAFIT.
- Validación preclínica parcial de un aislado de la microbiota intestinal de las colecciones de la Universidad EAFIT.

7 Resultados

- **Fase 1: Tabla de diagnóstico de Vigilancia Tecnológica**

Se realizó una primera fase diagnóstica con el fin de identificar cuáles eran las necesidades de la temática (validación preclínica de cepas microbianas como probióticos), lo cual se traduce en frases, términos o palabras clave que permitan acceder a información concreta sobre esta. Además, se determinan cuáles son las mejores bases de datos para el acceso a la información y se planea el proyecto de vigilancia tecnológica, con base en el conocimiento del investigador y en una búsqueda preliminar en el estado del arte. En la **Tabla 2** se reúnen los resultados de esta planeación y se lista una serie de preguntas que enfocan el estudio, con sus respectivas respuestas.

En esta fase se realizaron búsquedas exploratorias con base en el conocimiento general sobre el tema en las bases de datos especializadas como Pubmed, Science Direct, Google scholar, Scopus, Web of Science, Scielo y carrot2; conjuntamente se buscaron patentes en bases de datos especializadas Scopus, WIPO, Google patents, Google Scholar, USPTO y EPO.

Tabla 2. Fase I de la Vigilancia Tecnológica (fase diagnostica)

	TEMATICA: Plataformas preclínicas *in vitro* - *in vivo* para validar aislados de la microbiota humana como probióticos de nueva generación: un acercamiento a través de la vigilancia tecnológica.	
ID	**PREGUNTAS**	**RESPUESTAS generales**
1	¿Cuál es el objeto de la Vigilancia Tecnológica e Inteligencia Competitiva?	Establecer una base de datos de las principales evaluaciones in *vitro* e *in vivo* de cepas con potencial probiótico a través de la vigilancia del estado del arte y de técnicas actuales, producto del desarrollo científico, e identificar las capacidades instaladas del ecosistema de innovación, ciencia y tecnología de la ciudad de Medellín para la realización de estas pruebas, con el fin de impulsar el desarrollo y validación de ingredientes probióticos de la microbiota humana.
2	¿Qué debemos vigilar? ¿Qué informaciones buscar?	Modelos *in vivo e in vitro*, términos clave para el objetivo de vigilancia, conceptos de búsquedas no sistemáticas anteriores
		C. elegans
		Murine OR Rats
		Pig OR Piglet
		Drosophila
		in vitro test
		Chicken
		in vivo test
		Microbiome
		Moth
		Probiotics
3	¿Dónde localizarlas?	Pubmed, Science Direct, Google scholar, Scopus, Web of Science, Carrot2
		Grupos de investigación, páginas web de Universidades
		Ferias, Bases especializadas, Whitepapers, Patentes
4	¿Cómo tratar y organizar la información?	Tablas de Mando de VT y Base de Datos
5	¿A quién comunicar la información en la empresa?	Uso interno de Grupos de investigación, proyectos y Spin off de la universidad EAFIT
6	¿Qué recursos vamos a destinar?	Presupuesto, personal, servicios técnicos

- **Fase 2A: Tabla de Mando y de Factores críticos de vigilancia tecnológica**

En las siguientes tablas y figuras se observa un conjunto de palabras y preguntas que están relacionadas con los términos establecidos en la primera fase. Estas corresponden a los factores críticos de vigilancia o palabras clave que se usan para construir las ecuaciones de búsqueda que, a su vez, se ingresan en los buscadores de las bases de datos especializadas en la Fase 1. Esto enfoca y hace selectiva la búsqueda de información y se denomina **Tabla de Mando** dentro del proceso de vigilancia tecnológica como se observa desde la **Tabla 3** hasta la **Tabla 10**. Allí se establece también una columna de importancia (columna importancia significa un valor de 1-10 a cada criterio que se asigna durante la fase diagnostica de acuerdo con la frecuencia de aparición). Se establecen así mismo, una serie de preguntas de inteligencia o KIQ (Knowledge Intelligence Questions) las cuales son preguntas específicas que se formulan con la finalidad de comprender la temática central, permiten enfocar siempre la búsqueda de la información para responderlas de la manera más precisa, reduciendo así los tiempos de búsqueda. Finalmente, a partir de esta fase, se realizó un análisis y una valoración de la información que se deriva en los productos y los resultados de este proceso de vigilancia tecnológica disponibles en mayor detalle en la tabla de mando ampliada.

Todo esto, se realizó con una frecuencia semanal durante los meses de agosto y septiembre del 2021 como se observa en la **Tabla 3**, **Tabla 4**, **Tabla 5**, **Tabla 6** y en la tabla de mando ampliada, en la búsqueda, se encontraron 183 artículos o registros, de los cuales 145 corresponde al mes de agosto del 2021 y 38 corresponde al mes de septiembre del 2021. El total de búsquedas se describe en el diagrama de flujo **(Figura 2).**

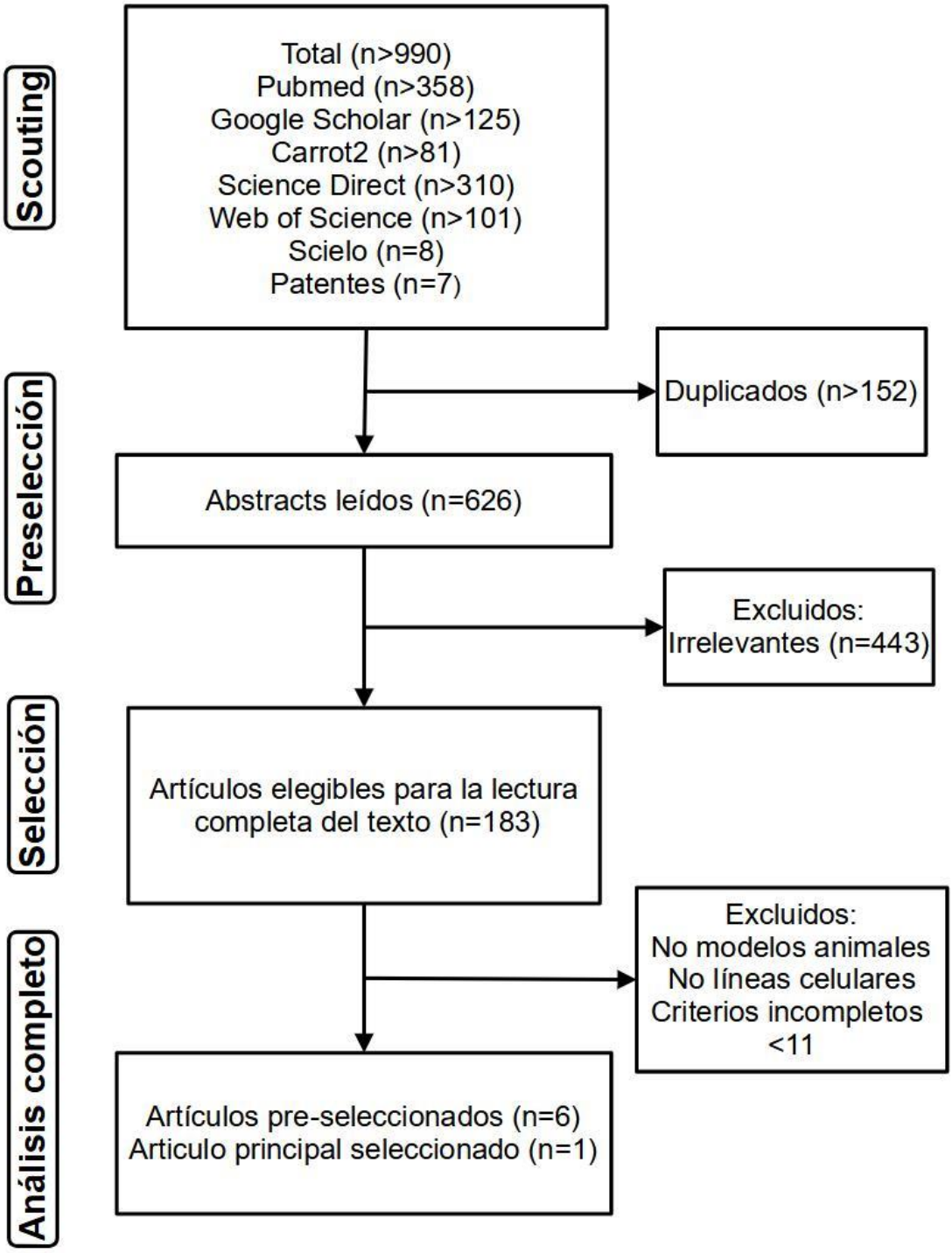


Figura 2. Diagrama de flujo de la búsqueda.

En esta, las expresiones hacen referencia a: **Scouting:** Hallazgo de literatura y documentos técnicos. **Preselección:** Lectura de los abstracts, se excluyen los duplicados y los que tienen información irrelevante respecto a las preguntas de

inteligencias (KIQ) que enmarcan el estudio, años anteriores a 2013; ya que solo pasan los que cumplen con la temática y las KIQ. **Selección:** Se realizan las lecturas completas de los artículos o registros seleccionados y se excluyen los que no contengan ninguna plataforma animal o celular o los que no completen los criterios de evaluación y eficiencia con puntaje <11. **Análisis completo:** Artículos o registros incluidos con el puntaje >11

En la **Tabla 3**, se evidencian los factores críticos del área de vigilancia: *in vivo*, el cual consistía en conocer cada uno de los temas relacionados, basados en búsquedas generales previas, en este caso los posibles modelos animales en donde se realizaban evaluaciones de seguridad y eficiencia de los probióticos, además, se colocó una columna de importancia a cada uno de ellos con base a un valor de 1-10 a cada criterio que se asigna durante la fase diagnostica de acuerdo con la frecuencia de aparición. Se establecen así mismo, una serie de preguntas de inteligencia o KIQ. Posteriormente, se empezó con la creación de la ecuación de búsqueda y sus respectivas derivaciones como se evidencia en la **Figura 3**. Los resultados relevantes *in vivo* fueron con las siguientes ecuaciones de búsqueda como: “Probiotic” AND “murine” OR “rats” con un total de 16 artículos encontrados, “Probiotic” AND “*C. elegans*” con un total de 13 resultados y finalmente “Probiotic” AND “Safety evaluation” con un total de 11 resultados.

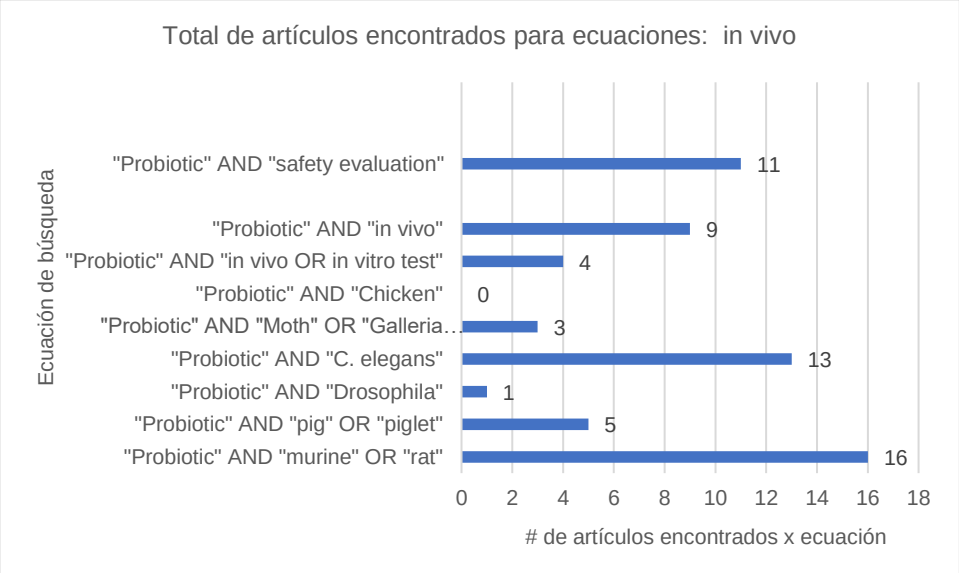


Figura 3. Totalidad de artículos encontrados de acuerdo con la ecuación de búsqueda y según el factor crítico: *in vivo*

Tabla 3. Tabla de factores críticos de vigilancia *in vivo*

Área de Vigilancia	FCV (Factores Críticos de Vigilancia) -Temas	Importancia	KIQ (Knowledge Ingeligent Questions)	Ecuaciones de Búsqueda	Número de Resultados Totales por #Ecuación	Fuentes de Información
In vivo	Animals models	10	What are the latest probiotic products being tested?	"Probiotics" AND "animal model" = (animal model= Murine, pig, moth, chicken, rats, C elegans, Drosophila, and others)	38	Pubmed, Science Direct, Google scholar, Scopus, Web of Science, Carrot2,
	Chicken model	1		"Probiotic" AND "murine" OR "rat"	16	
		10		"Probiotic" AND "pig" OR "piglet"	5	
	Piglet model	4		"Probiotic" AND "Drosophila"	1	
	Test model	10		"Probiotic" AND "C. elegans"	13	
		10		"Probiotic" AND "Moth" OR "*Galleria mellonella*"	3	
	Safety evaluation		What methodologies have being used to evaluate probiotics in vivo?	"Probiotic" AND "Chicken"	0	
	Probiotics	10		"Probiotic" AND *"in vivo* OR in *vitro* test*"*	4	
	Drosophila model	2	What are the most important metabolic functions to evaluate in probiotic strains?	"Probiotic" AND "in vivo"	7	
	C. elegans model	5				
	Rats model	2	What are the most safe and efficient models to evaluate probiotic strains?	"probiotics" AND "safety evaluation"	11	
		10				
	Moth model	2	Which are the criteria to evaluate probiotics safety and efficacy?			
	Pig model	3				
	Murine model	8				

En la **Tabla 4**, se evidencian los factores críticos de vigilancia: *in vitro*, al igual que el anterior consistía en conocer cada uno de los temas relacionados a este factor crítico, en este caso afines con la simulación del tracto gastrointestinal, en donde se realizaban evaluaciones de seguridad y eficiencia de los probióticos como el pH, tolerancia ácida y sales biliares, entre otros; también se colocó una columna de importancia a cada uno de ellos con base a un valor de 1-10 a cada criterio que se asigna durante la fase diagnostica de acuerdo con la frecuencia de aparición. Posteriormente, se empezó con la creación de la ecuación de búsqueda y sus respectivas derivaciones encontradas como se evidencia en la **Figura 4**. El resultado más relevante *in vitro* fue con la ecuación “Probiotic” AND “Safety evaluation” con un total de 60 artículos encontrados.

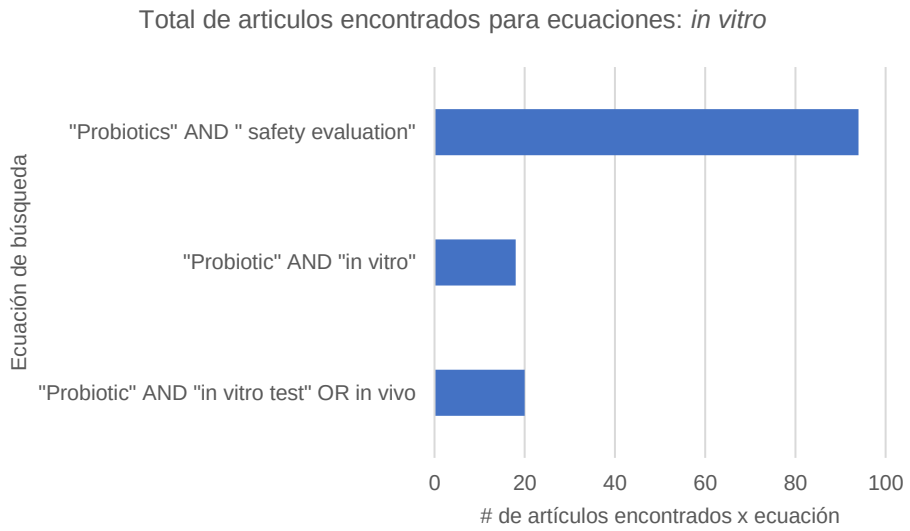


Figura 4. Totalidad de artículos encontrados de acuerdo con las ecuaciones para el factor crítico *in vitro*.

Tabla 4. Factores críticos de vigilancia *in vitro*

Área de Vigilancia	FCV (Factores Críticos de Vigilancia) -Temas	Importancia	KIQ (Knowledge Ingeligent Questions)	Ecuaciones de Búsqueda	Número de Resultados Totales por #Ecuación	Fuentes de Información
In vitro	Safety evaluation	10	What methodologies have being used to evaluate probiotics *in vitro*?	"Probiotic" AND "*in vitro* test" OR *in vivo*	20	Pubmed, Science Direct, Google scholar, Scopues, Web of Science, Carrot2, Scielo, Frontiers
	in vitro	9	What is the cell line most used to evaluate *in vitro*?	"Probiotic" AND "*in vitro*"	18	
	Gut	5	What are the most safe and efficient *in vitro* test ?	"Probiotics" AND " safety evaluation"	60	
	pH	4				
	Intestine´s Colonization	2	Which are the criteria for the probiotics safety and evaluation?			
	Stress tolerance capacity	3				
	Adherence capacity	7				
	In vitro test	10				

En la **Tabla 5.** Factores críticos de vigilancia en patentes., se evidencian los factores críticos de vigilancia de las patentes, en este caso se tuvieron en cuenta los temas de los factores críticos anteriores (*in vitro* e *in vivo*), por lo cual en este caso abarcaba los posibles modelos o metodologías patentadas, en las cuales se realizaban evaluaciones de seguridad y eficiencia de los probióticos. Por lo tanto, dichos factores se derivaron en ecuaciones de búsqueda similares a los dos casos anteriores que se evidencian en la **Figura 5.** Se observa que el resultado más relevante para la búsqueda de patentes fue con la ecuación “Probiotic” AND “Safety evaluation” con un total de 2 artículos funcionales encontrados.

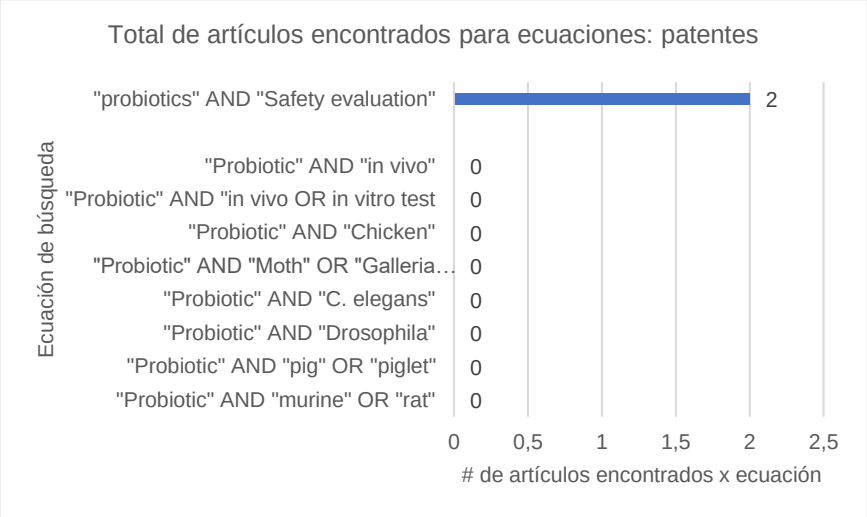


Figura 5. Totalidad de artículos encontrados de acuerdo con las ecuaciones para la búsqueda de patentes.

Tabla 5. Factores críticos de vigilancia en patentes.

Área de Vigilancia	FCV (Factores Críticos de Vigilancia) -Temas	Importancia	KIQ (Knowledge Ingeligent Questions)	Ecuaciones de Búsqueda	Número de Resultados Totales por #Ecuación	Fuentes de Información
Patentes	Animals models	10	What are the latest probiotic products being tested?	"Probiotic" AND "murine" OR "rat"	0	Scopus, WIPO, Google patents, Google Scholar, USPTO, EPO
	Chicken model	1		"Probiotic" AND "pig" OR "piglet"	0	
	In vitro test	10		"Probiotic" AND "Drosophila"	0	
	Piglet model	4		"Probiotic" AND "C. elegans"	0	
	Test model	10		"Probiotic" AND "Moth" OR "Galleria mellonella"	0	
	Safety evaluation	10		"Probiotic" AND "Chicken"	0	
	Probiotics	10	What methodologies have being used to evaluate probiotics in vivo?	"Probiotic" AND "*in vivo* OR *in vitro* test	0	
	Drosophila model	2	What are the most important metabolic functions to evaluate in probiotic strains?	"Probiotic" AND "*in vivo*"	0	
	C. elegans model	5		"probiotics" AND "safety evaluation"	2	
	Rats model	2	What are the most safe and efficient models to evaluate probiotic strains?			
	In vivo test	10	Which are the criteria to evaluate probiotics safety and efficacy?			
	Moth model	2				
	Pig model	3				
	Murine model	8				

Basados en los criterios establecidos para la selección de artículos y reviews se filtraron aquellos de los últimos 8 años, es decir, del año 2013 hasta 2021 como lo ejemplifica en la **Figura 6**, cabe aclarar que esta investigación se realizó en el 2021 y solo se elegían si cumplían con estudios *in vivo* o *in vitro* para humanos y se excluyeron los que se evaluaban para acuicultura, equinos, animales de granja y probióticos de levadura.

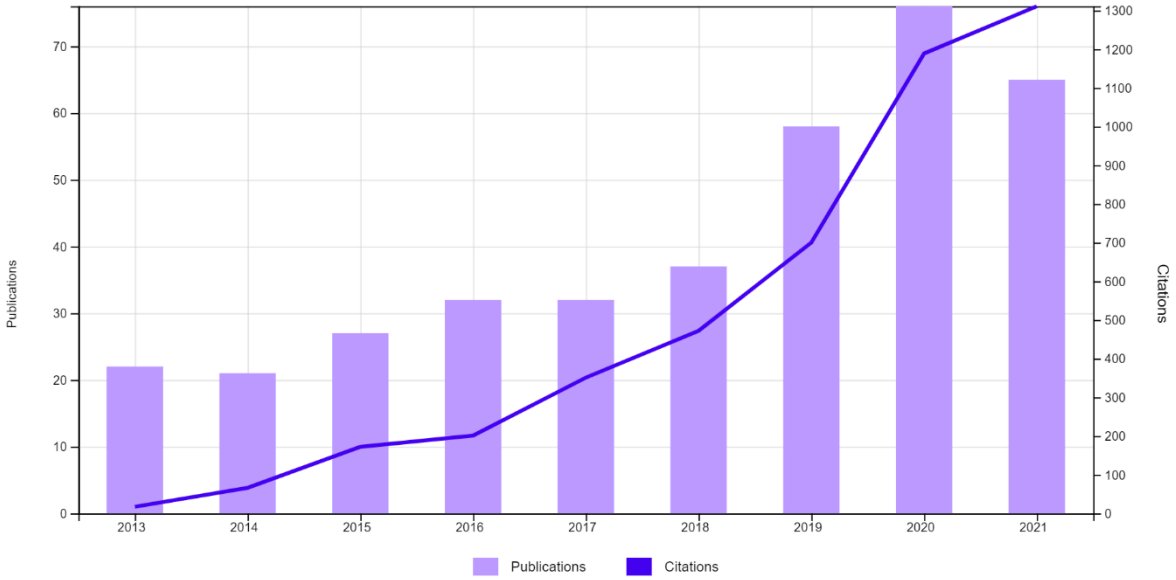


Figura 6.Gráfica de Análisis de datos de WoS con la ecuación: probiotic AND safety evaluation

De acuerdo con la **Figura 6,** se obtuvo un análisis de datos del repositorio Web of Science, en la cual se registra principalmente la ecuación “Probiotic” AND “Safety evaluation”, ya que esta fue la ecuación con más resultados de artículos obtenidos en cada uno de los ítems. Además, se observa que el año en que más publicaciones hubo corresponde al año 2020,en donde se podría deducir que en este tiempo los científicos hayan tenido otras preocupaciones como es la situación actual del COVID 19, por otro se observa que desde el año 2020 al año 2021 se disminuyó la cantidad de publicaciones con respecto a los probióticos y sus evaluaciones seguramente porque aun no había finalizado el año 2021. Además, se tuvo en cuenta este repositorio como métrica principal, debido a que esta muestra facilidad para dar seguimiento puntual a las publicaciones, citas, índice- H, entre otras, y con esto tener una idea del alcance y la cobertura que se tiene en este tema.

Posteriormente, los artículos seleccionados se analizaron en detalle con el fin de tener plataformas elegibles a partir de los criterios de evaluación exigidos por la FAO y OMS (FAO & WHO, 2002), entre los cuales se destacan los siguientes estudios: Byakika et al., 2019a; Cozzolino et al., 2020; de Melo Pereira et al.,

2018b; Koirala & Anal, 2021b; I. Sorokulova, 2008b; Trukhachev et al., 2021), que tratan sobre los siguientes criterios que califican las plataformas:

- Tolerancia al ácido y las sales biliares – pH bajo
- Hidrofobicidad de la superficie celular
- Adhesión a las células epiteliales, por ejemplo Caco-2 o HT-29
- Auto y co - agregación
- Actividad antimicrobiana
- Susceptibilidad y resistencia a antibióticos
- Actividad de la BHS (Hidrolasa de las sales biliares)
- Actividad hemolítica
- Producción de aminas biogénicas
- Actividad inmunomodulatoria

En la **Figura 7** se evidencian algunas bases de datos y el número de artículos encontrados. Inicialmente se buscaron en las bases datos que se encuentran descritas en la **Tabla 2**, sin embargo, previamente se descartaron algunas como Scielo, ya que en esta no se encontró ningún artículo de interés para esta temática. Además, a través de la búsqueda y como se observa en la **Figura 7**, fue posible conocer cuáles son las bases de datos especializadas que contienen información relevante que están relacionados con el tema de probióticos, especialmente las evaluaciones de seguridad y eficiencia. A partir de esta podemos deducir que Pubmed y Science Direct son las mejores bases de datos para obtener información necesaria sobre los temas mencionados anteriormente, y de esta manera nos facilitó conocer el ecosistema para dicho fin y para futuras vigilancias tecnológicas.

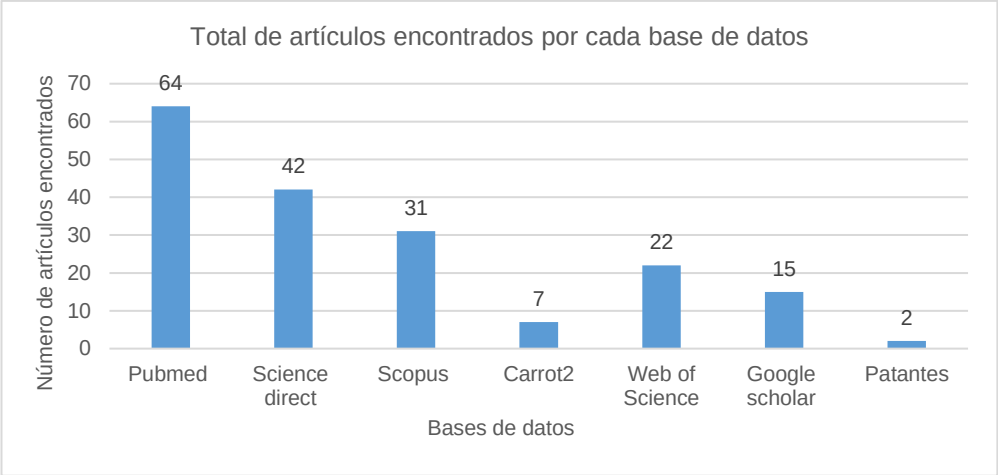


Figura 7. Métricas con base en la Tabla de Mando de VT e IC en los meses de agosto y septiembre del 2021.

Posteriormente, se crearon ecuaciones de búsqueda y sus derivados como se evidencia en la **Figura 8,** además de la creación de la base de datos de posibles aliados (la lista de los posibles aliados se encuentran en la tabla de mando ampliada en la pestaña Fase I- Aliados). En la **Tabla 6**, se evidencian los factores críticos de vigilancia de posibles aliados, la cual consistía en conocer cada uno de los potenciales actores del ecosistema regional de ciencia, tecnología e innovación (CTi), que pueden evaluar las plataformas preseleccionadas. En el ambiente regional se tuvo en cuenta especialmente el Valle de Aburrá, sin embargo, se realizaron búsquedas alternas en otras ciudades fuera del departamento de Antioquia. De acuerdo con la literatura encontrada se tomaron en cuenta factores críticos acordes a universidades, institutos, laboratorios, centros de investigación, entre otras, que contengan espacios con los equipos y reactivos necesarios para la realización de evaluaciones de seguridad y eficiencia de los probióticos. A cada uno se le asignó un valor de importancia, con base en la utilidad de la información que ofrecía la metodología del aliado, y que tanto estaba acorde con las metodologías previamente identificadas en las fase anteriores del ejercicio de VT. Como ejemplo, algunos artículos evaluaban los criterios en animales como cerdos, por lo cual se añadió granja como factor crítico.

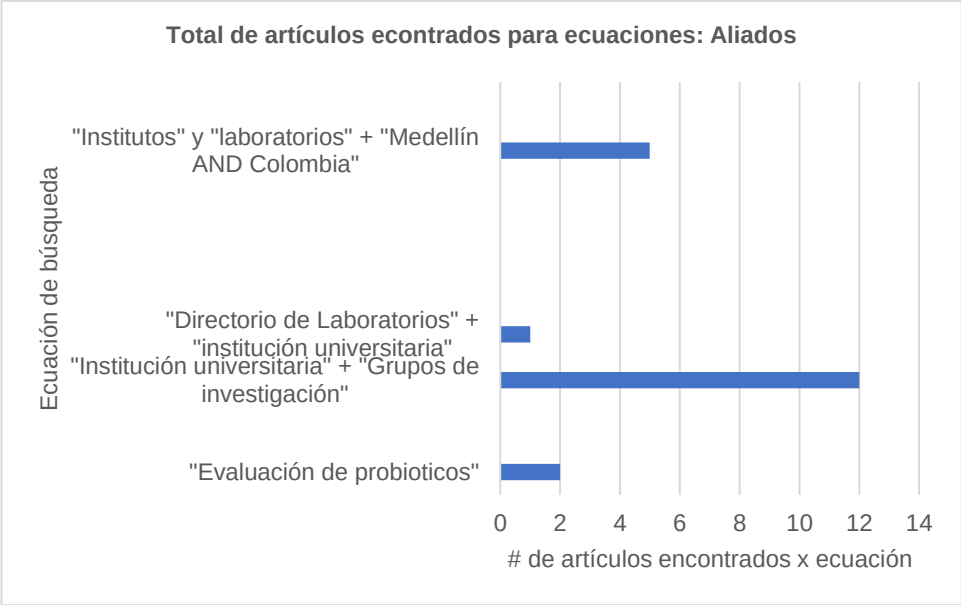


Figura 8. Totalidad de artículos encontrados de acuerdo con las ecuaciones de búsqueda y sus posibles aliados.

Tabla 6. Factores críticos de vigilancia de los posibles aliados

Área de Vigilancia	FCV (Factores Críticos de Vigilancia) -Temas	Importancia	KIQ (Knowledge Ingeligent Questions)	Ecuaciones de Búsqueda	Número de Resultados Totales por #Ecuación	Fuentes de Información	Responsable	Frecuencia
Aliados	Universidades	10	Which company can evaluate this probiotics?	"Evaluación de probioticos"	2	GrupLac (MinCiencias)	Susana y Geraldinne	1 mes
	Centros de investigación	9						
	Grupos de investigación	9		"Institución universitaria" + "Grupos de investigación"	12	Buscador de universidades (UPB, CES, UNal, UdeA, ColMayor, EAFIT)		
	Laboratorios	8	Who company can provide the service if animal models or cell cultures to evaluate probiotics?	"Directorio de Laboratorios" + "institución universitaria"	1			
	Granjas	1						
	Parques tecnológicos	2		"Institutos" y "laboratorios " + "Medellín AND Colombia"	5	Buscador Google		
	Empresas alimentarias o farmacéuticas	5						

- **Recopilación de información de acuerdo con las ecuaciones de mejor puntaje en cuanto a los criterios de evaluación, con su respectivo resumen metodológico.**

Se creó una tabla de mando ampliada con los artículos elegidos que cumplen con los criterios de evaluación de potencial probiótico, allí se hizo un registro de las cepas probióticas, con el fin de conocer cuáles eran las que más se evaluaban, sin embargo, más adelante no se tuvieron en cuenta para la elección de la mejor plataforma, debido a que la información de la cepa no era de suma relevancia para el proceso de evaluación. No obstante, esto fue de utilidad para algunos análisis y observaciones. También se registró el tipo de prueba (*in vitro* o *in vivo)*, los criterios de evaluación y seguridad basados en la literatura que se menciona anteriormente, título del articulo y referencia.

En las **Tabla 7 y Tabla 8** se muestra una representación de cómo se dispusieron los datos. Allí se pueden observar en detalle, los criterios de evaluación de potencial probiótico, para el cual se utilizó el comando **CONTARA** de **Microsoft Excel**, éste se encarga de sumar cada uno de los criterios designados. Es decir, a cada registro, se le asignaba una X (suma +1) cuando cumplía un criterio al cual se le asocia como un beneficio o por el contrario no se asignaba una X (resta -1) cuando este criterio no se cumplía y por tanto, se le asocia como una desventaja; de esta forma se le daba un puntaje a cada artículo o registro.

Posteriormente, se seleccionaron los mejores artículos referentes a cada ecuación de búsqueda (se puede observar en detalle en la tabla de mando ampliada. Cada uno de los resúmenes se encuentran por el nombre de la ecuación en las diferentes pestañas)**.** A éstos se les realizó un resumen, con el fin de tener una información metodológica más contundente para más adelante permitirnos tener un mejor modelo o plataforma de selección, a partir de cada una de las ecuaciones de búsqueda.

Tabla 7. Representación de los criterios para la evaluación y seguridad, designados para cada registro en la tabla de mando ampliada. Nota: La X en cada fila son los criterios que evaluaban algunos artículos, los cuales más adelante se sumaban con el comando **CONTARA** para darle un puntaje o valor de importancia significativo

In vivo / In vitro	**Línea celular / Modelo animal**	**Tolerancia al ácido gástrico**	**Tolerancia a la bilis**	**Hidrofobicidad**	**Adhesión a células epiteliales**	**Autoagregación**	**Coagregación**	**Actividad antimicrobiana**	**Actividad inmonomodulatoria**	**Susceptibilidad a antibiótico**	**Resistencia a antibiótico**	**Actividad hemolítica**	**Producción de aminas biogénicas**	**pH**	**Actividad BSH**
in vitro	MRS	X	X	X		X	X	X				X		X	
in vitro	Caco-2	X	X	X	X	X		X		X		X		X	X
in vitro	Caco 2	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		X	

Nota: para mayor visualización, observar en tabla de mando ampliada en la pestaña- Base de datos

Tabla 8. Continuación de la tabla anterior, la cual muestra una representación de los artículos o registros asentados en la tabla de mando ampliada, con el valor de importancia designado según el comando **CONTARA** de Excel.

Título del artículo	**Referencia**	**Base de datos**	**Valor de importancia**	**Ecuación de búsqueda**

Probiotic potential and safety assessment of Lactobacillus isolated from yaks	Liu, J., Wang, Y., Li, A., Iqbal, M., Zhang, L., Pan, H., Liu, Z., & Li, J. (2020). Probiotic potential and safety assessment of Lactobacillus isolated from yaks. Microbial Pathogenesis, 145, 104213. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104213	Science Direct	8	Probiotic AND *in vivo*
Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests	Rolim, F. R. L., Freitas Neto, O. C., Oliveira, M. E. G., Oliveira, C. J. B., & Queiroga, R. C. R. E. (2020). Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests. *Trends in Food Science and Technology*, *100*, 138–154. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.008	Science Direct	7	
In vivo assessment of possible probiotic properties of *Bacillus subtilis* and prebiotic properties of levan	Hamdy, A. A., Elattal, N. A., Amin, M. A., Ali, A. E., Mansour, N. M., Awad, G. E. A., Farrag, A. R. H., & Esawy, M. A. (2018). In vivo assessment of possible probiotic properties of Bacillus subtilis and prebiotic properties of levan. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 13, 190–197. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.001	Science Direct	4	

Nota: para mayor visualización, observar en tabla de mando ampliada en la pestaña- Base de datos

- **Recopilación de los mejores artículos pre- seleccionados**

Se realizó una filtración de artículos registrados en la tabla de vigilancia tecnológica ampliada, en donde se tuvieron en cuenta los puntajes 11, 12 y 13 que fueron los más altos, los cuales dieron como resultado un total de 11 artículos o registros. Luego se consideró descartar los que no contaban con adhesión a las células epiteliales, ya que es un criterio importante para la evaluación de eficiencia y seguridad de las cepas probióticas, resultando un total de 6 artículos. Esto se hizo con la finalidad de que podamos elegir el mejor modelo con los criterios requeridos para las pruebas del potencial probiótico (**Tabla 9**).

El mejor artículo según la calificación dada por el puntaje se titula:“Potentiated *In Vitro* Probiotic Activities of *Lactobacillus fermentum* LfQi6 Biofilm Biomass Versus Planktonic Culture” (Berkes et al., 2020) , con un total de 13 criterios de seguridad evaluados, como lo es tolerancias acidas y biliares, pH bajo, hidrofobicidad, adhesión a las células epiteliales, auto y co- agregación, resistencia y susceptibilidad a antibióticos, actividad antimicrobiana, actividad hemolítica, producción de aminas biogénicas y actividad BSH. Por otro lado, se realizó un análisis detallado de los 6 artículos pre-seleccionados, con el fin de corroborar las evaluaciones y de este modo poder tener mayor claridad para la selección de un posible aliado.

Tabla 9. Registros con mejor calificación de acuerdo con los criterios (preseleccionados).

In vitro o in vivo	Modelo animal o línea celular	Resumen metodológico	Nombre del artículo	Referencia	Ecuación
in vitro	Caco 2	Las cepas de Lactobacillus fueron aisladas del microbioma humano en un estudio anteriormente realizado, a partir de este se realizaron pruebas filogenéticas con secuencias de ARNr 16s de estas cepas, por medio de herramientas que permiten la alineación de los genomas; se realizaron también pruebas simuladas del tracto gastrointestinal humano con el fin de evaluar la resistencia ácida, tolerancia a las sales biliares, la actividad de BSH. Además, se realizó la medición del colesterol, determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular entre otros ensayos de auto y co-agregación y ensayos de la adherencia de la línea celular Caco-2. También se evaluó la actividad antimicrobiana de cada una de las células, la actividad de FEA y ensayos de microplaca clorimétrica de glutatión, entre otras pruebas para evaluar la seguridad se realizaron estudios de la susceptibilidad a antibióticos, actividad enzimática, ensayos hemolíticos, producción de aminas biogénicas, degradación de la mucina y finalmente ensayos de la concentración mínima de inhibición.	Potentiated In Vitro Probiotic Activities of Lactobacillus fermentum LfQi6 Biofilm Biomass Versus Planktonic Culture	Berkes, E., Liao, Y. H., Neef, D., Grandalski, M., & Monsul, N. (2020). Potentiated In Vitro Probiotic Activities of Lactobacillus fermentum LfQi6 Biofilm Biomass Versus Planktonic Culture. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 12(3), 1097–1114. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09624-8 (Berkes et al., 2020)	Probiotic AND safety evaluation
in vitro	Ileón de pollo	Las cepas de LAB fueron aisladas y caracterizadas a partir de leche fresca de cabra y de vaca a través de reactivos, medios y condiciones de cultivo, además se evaluaron algunas propiedades probióticas como la actividad antagonista, la simulación del tracto gastrointestinal como supervivencia simulada al jugo gástrico, tolerancia a las sales biliares y fenol, además de la adherencia a las células epiteliales del íleon de pollo y otras habilidades agregadas de la cepa como auto y co-agregación, ensayos de hidrofobicidad, actividad inhibitoria de la alfa-glucosidasa, caracterización de sustancias antimicrobianas y otros análisis de seguridad relacionadas con actividades hemolíticas, resistencia a antibióticos.	Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties	Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, A. S. M. R. U., & Jahid, I. K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. Journal of Dairy Science, 103(2), 1223–1237. https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17092 (Reuben et al., 2020)	Probiotic AND safety evaluation

In vitro	Caco 2	Las LAB fueron aisladas a partir de salami artesanal, granos de cacao fermentados y pasto elefante, por medio de agares y reactivos; además se realizaron simulaciones del tracto gastrointestinal, las cuales involucran el pH ácido y las sales biliares; otras pruebas fueron caracterizaciones genotípicas de las cepas aisladas a partir del ADN genómico a través de kits y PCR, análisis filogenéticos utilizando bases de datos como GenBank. También evaluaron la desconjugación de las sales biliares, actividad antibacteriana y otras evaluaciones asociadas con la seguridad están las investigaciones sobre la actividad de la gelatinasa, lipasa, actividad de la DNasa, actividad hemolítica y producción de aminas biogénicas; a parte de la determinación de la hidrofobicidad, actividad de la agregación, la adhesión a la línea celular Caco-2.	Isolation, Identification, and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Species of Forage Plants, Cocoa Beans, and Artisanal Salami	dos Santos Leandro, E., Ginani, V. C., de Alencar, E. R., Pereira, O. G., Rose, E. C. P., do Vale, H. M. M., Pratesi, R., Hecht, M. M., Cavalcanti, M. H., & Tavares, C. S. O. (2020). Isolation, Identification, and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Species of Forage Plants, Cocoa Beans, and Artisanal Salami. Probiotics and Antimicrobial Proteins 2020 13:1, 13(1), 173–186. https://doi.org/10.1007/S12602-020-09679-Y (dos Santos Leandro et al., 2020)	
in vitro	Caco-2	Las muestras recolectadas fueron por medio de cuatro razas de camellos mediante el método de ordeño tradicional, en donde posteriormente se realizó un análisis fisicoquímico que dependía de ciertas condiciones, cada una de las muestras fueron aisladas de la leche por medio del caldo MRS. Luego se realizó una caracterización e identificación por medio de kits. Después de realizó algunos ensayos para la detección de las cepas bacterianas seleccionadas de acuerdo con las directrices de FAO/OMS. Posteriormente, se realizaron algunas pruebas de seguridad del potencial probiótico como la simulación al tracto gastrointestinal por medio de las tolerancias acida y sales biliares, la actividad BSH, la hidrofobicidad a la superficie celular, la susceptibilidad a los antibióticos, actividad antimicrobiana, actividad de actividad hemolítica, producción de aminas biogénicas, ensayo a la adhesión celular in vitro de la línea celular Caco-2.	Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk	Sharma, A., Lavania, M., Singh, R., & Lal, B. (2021). Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(3), 1622–1632. https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.062 (Sharma et al., 2021)	Probiotic AND safety evaluation
In vitro	Caco 2	Las cepas de *Lactobacillus plantarum* fueron aisladas e identificadas a partir de fuentes alimentarias, y fecales por medio de métodos moleculares, se realizron pruebas para evaluar el potencial probiótico las cuales incluyen la simulación de la supervivencia de las células en la digestión gástrica y pancreática, degradación de la mucina, hidrofobicidad al xileno, auto y co-agregación, actividad antimicrobiana, adhesión a las células colorrectal humano (Caco-2), entre otras evaluaciones relacionadas con las propiedades antioxidantes, producción de exopolisacaridos. Otras pruebas de seguridad como susceptibilidad a antibióticos, actividad hemolítica, por medio de reactivos, kits y software.	Characterization of Riboflavin-Producing Strains of Lactobacillus plantarum as Potential Probiotic Candidate through in vitro Assessment	Bhushan, B., Sakhare, S. M., Narayan, K. S., Kumari, M., Mishra, V., & Dicks, L. M. T. (2020). Characterization of Riboflavin-Producing Strains of Lactobacillus plantarum as Potential Probiotic Candidate through in vitro Assessment and Principal Component Analysis. Probiotics and Antimicrobial Proteins 2020 13:2, 13(2), 453–467. https://doi.org/10.1007/S12602-020-09696-X	Probiotic AND safety evaluation

			and Principal Component Analysis	(Bhushan et al., 2020)	
In vivo e in vitro	Mice	Las cepas aisladas de B. coagulans se realizaron en unas condiciones de cultivo específicas, además se realizó pruebas relacionadas con la seguridad, las cuales incluían análisis genómicos de genes relacionados con las cepas, es decir, secuenciación del genoma completo, análisis filogenéticos, el uso de factores de virulencia y resistencia a antibióticos, predicción de la estabilidad del genoma: producción de aminas biogénicas y producción de lactato; también se realizaron otras pruebas relacionadas con la seguridad que incluyen actividad hemolítica, enzimática, susceptibilidad a antibióticos, producción de aminas biogénicas y medición de lactato. Se hicieron pruebas para evaluar la toxicidad, las cuales incluyen la citotoxicidad y la toxicidad aguda en ratas. Además de otras pruebas relacionadas con simulaciones del tracto gastrointestinal como lo es patrones de fermentación de carbohidratos, tolerancia al calor, ácido y biliar, hidrofobicidad y autoagregación.	Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of Bacillus coagulans IDCC 1201 isolated from green malt	Bang, W. Y., Ban, O.-H., Lee, B. S., Oh, S., Park, C., Park, M.-K., Jung, S. K., Yang, J., & Jung, Y. H. (2021). Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of Bacillus coagulans IDCC 1201 isolated from green malt. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 48(5–6), 26. https://doi.org/10.1093/JIMB/KUAB026 (Bang et al., 2021)	Probiotic AND murine OR rats

- **Búsqueda y Resultados de Aliados del Ecosistema Regional**

Como resultados de la búsqueda de aliados se tuvo en cuenta el resumen metodológico de cada uno de los artículos preseleccionados, revisando los materiales y los equipos que utilizaron, con la finalidad de tener una idea del espacio físico que se requería para dichas evaluaciones. Los 6 mejores artículos se seleccionaron para contactar a los aliados del ecosistema, con el fin de que, si no se encontraran laboratorios afines con el espacio o la disponibilidad de pruebas, se tuvieran más opciones para evaluar dicho potencial.

Con base en lo anterior, cada uno de los casos es diferente por lo que se tuvo que hacer una búsqueda general, en donde se conocieran los servicios y las líneas de investigación, con el fin de saber los procesos que se realizaban. Se utilizó el repositorio del ministerio de ciencias (Gruplac), que contiene registrado los grupos de investigación del país, allí se utilizó una de las ecuaciones de búsqueda establecidas (**Figura 8**) con la palabra *"evaluación de probióticos" o "probióticos"*, encontrando solo 2 laboratorios que cumplían con el espacio físico, las evaluaciones y los equipos para posible evaluación.

Luego se tuvo en cuenta principalmente universidades del Valle de Áburra por lo que se hizo una búsqueda en Google con la ecuación "Institución universitaria" + "Grupos de investigación" la palabra institución universitaria era reemplazada por (UPB, CES, EAFIT, UDEA, etc.), también se utilizó la ecuación de búsqueda *"Directorio de Laboratorios" + "institución universitaria" OR "Institutos" y "laboratorios " + "Medellín" AND "Colombia".* Los resultados relevantes se obtuvieron con la ecuación "institución universitaria" + "grupo de investigación" con un resultado de **12 sitios** encontrados (**Figura 8**). Posteriormente, se estableció el contacto con los aliados encontrados, vía correo electrónico, a través de entrevistas por vía telefónica o reuniones en video llamada donde se obtuvo información de cotización y sobre los diversos procesos que se podían llevar a cabo para dicha evaluación (**Tabla 10**).

Los dos aliados del ecosistema regional del Valle de Áburra considerados para llevar a cabo las evaluaciones, fueron el laboratorio LACMA de la institución universitaria Colegio Mayor de Antioquia para dos pruebas, actividad antimicrobiana, y suscetibilidad/resistencia a antibióticos, y el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad CES, para realización de todas las pruebas, sin embargo, este último no fue posible debido a que los análisis tenían una duración mayor al tiempo requerido (2 meses).

Tabla 10. Muestra parcial de la Tabla de mando ampliada para la Fase 1 de Aliados

Breve descripción de la técnica y requerimientos (equipos, reactivos, personal especializad, instalacione)	Laboratorios o Centros Aliados Ecosistema regional de ciencia, tecnología e innovación (CTi)	Ciudad	Contacto	Correo	Teléfono	Descripción servicio	Líneas de investigación	Respuesta/ evaluación	Tiempo de entrega de R	$$	$$ total
Horno incubadora, espectrofotómetro, pHmetro, PCR, transiluminador UV autoclave.	GRUPO BIOCIENCIAS (ColMayor), LACMA	Medellín, Antioquia	Beatriz Elena Valdés Duque, Mayra Alejandra Fuentes Vanegas	beatriz.valdes@colmayor.edu.co; lacma@colmayor.edu.co	444 56 11 ext. 160-136, 137, 140	Grupo investigativo especializado en áreas de microbiología, biotecnología, bioquímica clínica y hematología y banco de sangre, mediante la consolidación de líneas de investigación que permitan la interacción con comunidades científicas, el sector de salud y el productivo.	Producción y purificación de compuestos bioactivos.	Si/ prueba antimicrobiana susceptibilidad o resistencia a antibióticos	10 días hábiles	437500+60000	497501
	Grupo de Investigaciones Microbiológicas - UR (GIMUR) (Universidad del Rosario)	Bogotá, Cundinamarca	Juan David Ramírez	juand.ramirez@urosario.edu.co	571-2970200	Enfermedades patógenas y estudios de microorganismos	Diagnóstico de enfermedades infecciosas Ecología y Evolución de Enfermedades Epidemiología Molecular y Genómica Genética y genómica poblacional de vectores Microbiomas	Si/ prueba antimicrobiana y susceptibilidad o resistencia a	No aplica	No aplica	No aplica

								antibióticos			
pHmetro, filtros esterilizadores, agitador rotatorio, incubadora, centrífuga, vórtex, cabina de flujo laminar.	Aoxlab	medellín, Antioquia	Andi Rendon Arroyave	comercial@aoxlab.com	(604) 6047454 – 3108338768 - 3128743291 - 3148671547	Autorizados por la seccional de salud de Antioquia para prestar servicios de análisis con una infraestructura de 4.000 pies cuadrados, donde reunen equipos completamente automatizados para el análisis de alimentos.	Análisis Microbiológico	Si/ prueba antimicrobiana	6 días hábiles	80300+ IVA (15257) =	95557
	Instituto de Medicina tropical (UCes)	Sabaneta, Antioquia	Giovanny Torres Lindarte	gtorres@ces.edu.co	305 35 00 ext: 2533	Prestación de servicios en microbiología y el desarrollo conjunto de proyectos de investigación. Además, ofrecen análisis a producto terminado, materias primas, empaques, ambientes, superficies, manipuladores y agua potable, para la industria de alimentos, cosmética, higiene personal y la limpieza domestica e industrial.	Microbiología convencional: Evaluación microbiológica de materias primas, Evaluación de actividad antimicrobiana, Evaluación microbiológica de agua, y de ambientes (superficies, aire). Biología Molecular, Secuenciación y análisis de genoma completo (microorganismos) o marcadores específicos. detección o cuantificación	Si/ todas las pruebas	2 meses	No aplica	No aplica

Nota: para mayor visualización ir a la tabla de mando ampliada-pestaña Fase I Aliados

- Fase 2B: Preguntas de inteligencia KIQ (Knowledge Intelligence Questions)

Para esta fase, se tuvo en cuenta la información de las dos plataformas consultadas (*in vitro* e *in vivo*). Esta consistía en responder las preguntas iniciales que orientan y enmarcan todo el ejercicio de VT, relacionadas al tema principal de probióticos. De esta manera, se reune toda la información necesaria y común que tienen los artículos y registros encontrados, permitiendo conocer y seleccionar la mejor plataforma según las valoraciones de este estudio, y a partir de esta, tomar decisión adecuadas de evaluación de cepas en su potencial probiótico. Estas preguntas formuladas deben ser de carácter critico ya que proporcionan la base para generación de nuevo conocimiento, que en este caso está enfocado a la evaluación de probióticos.

A continuación, se muestra la **Tabla 11.** KIQ (Knowledge Intelligence Questions) para la plataforma *in vitro* e *in vivo*

Tabla 11. KIQ (Knowledge Intelligence Questions) para la plataforma *in vitro* e *in vivo*

KIQ	Respuesta Precisa/conclusión *In vitro*	Respuesta Precisa/conclusión *in vivo*
¿Cuáles son las últimas cepas probióticas que se están probando? / What are the latest probiotic strains being tested?	El hallazago principal de la VT es que se emplean todavía cepas tradicionales del genero Lactobacillus y Bifidobacterium (*L. casei , L. plantarum, L. fermentum, L. paracasei y B. animalis)*, y muy pocas son nuevas cepas probioticas.	
¿Qué metodologías se han utilizado para evaluar probióticos in vitro? / What methodologies are being used to evaluate probiotics in vitro?	Las publicaciones se basan de acuerdo a las directrices de FAO/OMS, en estas generalmente se realizan algunas pruebas de seguridad del potencial porbiótico como la simulación al tracto gastrointestinal por medio de las tolerancias ácidas y sales biliares, la actividad de la BSH, la hidrofobicidad a la superficie celular, la susceptibilidad a los antibióticos, actividad antimicrobiana, actividad hemolítica, producción de aminas biogénicas, ensayo a la adhesión celular in vitro de líneas celulares intestinales o en algunos casos pruebas bioquimicas en donde se pueda simular al tracto gastrointestinal.	Generalmente en estas pruebas se combinan algunas pruebas *in vitro* para evaluar la eficacia y seguridad, como por ejemplo simulaciones del tracto gastrointestinal, patrones de fermentación de carbohidratos, tolerancia al calor, ácido y biliar, hidrofobicidad y autoagregación, pero suelen ser algunas y no todas.En estos ensayos *in vivo se* utilizan para evaluar otras propiedades como toxicidad, las cuales incluyen la citotoxicidad y la toxicidad aguda, además para mirar las interacciones huésped-probiótico y probar los efectos de los microorganismos ingeridos en la fisiología del huésped y proporcionar conocimientos mecánicos . Nota: no suelen ser evaluaciones completas.
¿Cuáles son las funciones metabólicas más importantes a evaluar en las cepas probióticas? / What are the most important metabolic functions to evaluate in probiotic strains?	Principalmente se evalua la adhesión a las celulas epiteliales intestinales ya que se puede demostrar las características de diferenciación morfológica y funcional que tendría la cepa probiotica con el intestino humano, además determinan los efectos directos que tiene el producto sobre un fenotipo celular y su proliferación a través de esas líneas celulares o cultivos de células primarias y de esta forma se sabria si tendria buena receptividad en la parte digestiva y por ende propiedades inmunologicas como entre otros beneficios.	Para este ensayo se evaluan principalmente pruebas de toxicidad y ensayos de inmunidad, por ende se enfocan principalmente en la salud inmunologica.
¿Cuáles son los modelos más seguros y eficientes para evaluar cepas probióticas? / What are the most safe and efficient models to evaluate probiotic strains?	En este tipo de ensayos generalmente utilizan lineas celulares intestinales similares a las del humano, como por ejemplo Caco-2, HT-29, HT-29 MTX, MDCK, entre otras.	Modelos animales comunes: ratones y el nematodo *C. elegans*
¿Cuáles son los criterios para evaluar la seguridad y eficacia de los probióticos? / Which are the criteria to evaluate probiotics safety and efficacy?	La colonizacion del tracto gastro intestinal, la adhesion a la barrera intestinal, la tolerancia al pH bajo y sales biliares, ademas de la seguridad de las cepas que no tengan factores de virulencia y efectores de patogenicidad.	La colonizacion del tracto gastro intestinal, toxicidad, la tolerancia al pH bajo y sales biliares, ademas de la seguridad de las cepas que no tengan factores de virulencia y efectores de patogenicidad.

- **Evaluación de la cepa con potencial probiótico *Lacticaseibacillus rhamnosus* M32 con el aliado seleccionado: Colegio Mayor de Antioquia, para validar su potencial probiótico.**

Basados en la información obtenida de criterios de evaluación e información del ecosistema regional, se tuvo en cuenta la realización de una evaluación parcial de la cepa *L. rhamnosus M32* con ensayos de actividad antimicrobiana y resistencia/susceptibilidad a antibióticos que fueron llevados a cabo, en el labarotarorio LACMA del Colegio Mayor de Antioquia.

En este aliado seleccionado se identificaron contratiempos en cuanto a la gestión de entrega de muestras para la evaluación del potencial probiótico, una de las razones puede estar asociada a la comunicación entre el equipo investigador y el personal de los laboratorios, ya que no se cuenta con un procedimiento establecido desde ninguna de las partes para que se llevara a cabo el proceso, y además aún falta desarrollar, apropiar técnicas y protocolos estandarizados que agilicen dichos tramites.

De acuerdo a lo anterior, para llevar a cabo estas evaluaciones, previamente el equipo investigador (**Figura 9**) hizo la preparación de la cepa a través del agar BHI para un medio de cultivo solido, con el fin de realizar las pruebas de susceptibilidad/resistencia a antibióticos y actividad antimicrobiana y a su vez, un medio MRS para preparar la muestra en un extracto libre de celulas con neutralización del pH a 6, basados en el articulo (Vanegas Fuentes et al., 2017), para este ultimo procedimiento. Lo anterior era necesario, debido a que la técnica principalmente usada por el aliado requería de este medio, esta fue realizada mediante el método de difusión en pozos frente a los patógenos *Escherichia coli, Enterobacter* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Salmonella, Shigella, Aeromonas*.

Además para la Susceptibilidad/resistencia a antibióticos usaron la técnica de Kirby Bauer con los siguientes antibióticos: Gentamicina, Clindamicina Ciprofloxacina, Ampicilina, Eritromicina y tetraciclina. Para esta prueba, el aliado seleccionado tuvo que hacer estandarización del inoculo porque en los artículos investigados y entregados para estos procedimientos específicos, no clarifican la información acerca de la concentración necesaria. Por otro lado, los antibióticos que tienen en la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia son principalmente para docencia, por lo que no poseían suministros nuevos que cumplieran con estos protocolos ya que no cuentan con una fecha vigente, además la interpretación de los artículos no especifica como se debe medir el punto de corte por zona de diámetro para poder clasificar esta prueba como sensible, intermedio o resistente, por lo que tuvieron que recurrir a otras fuentes. Debido a los inconvenientes de estandarización no fue posible que fueran entregados en los tiempos acordados. (Es importante resaltar toda esta

información en detalle para que más adelante se pueda tener en cuenta para futuros estudios).

Por otro lado, para la prueba de actividad antimicrobiana, se iban a estandarizar los metodos de dos formas, la primera fue mediante el extracto libre de células, en la cual no hubo actividad antimicrobiana por medio de la tecnica de difusión en pozos frente a los patógenos, posiblemente por fallas al encontrar una estandarización adecuada, debido a lo anterior se evaluó con la técnica de mancha en agar a partir de los cultivos sólidos para verificar resultados. Finalmente con este ultimo tampoco se evidenció actividad antimicrobiana.

En cuanto a la prueba de susceptiblidad/resistencia a antibióticos, los resultados otorgados mostraron que el tamaño del halo formado no mostraba sensibilidad pero tampoco resistencia con ninguno de los antibióticos.

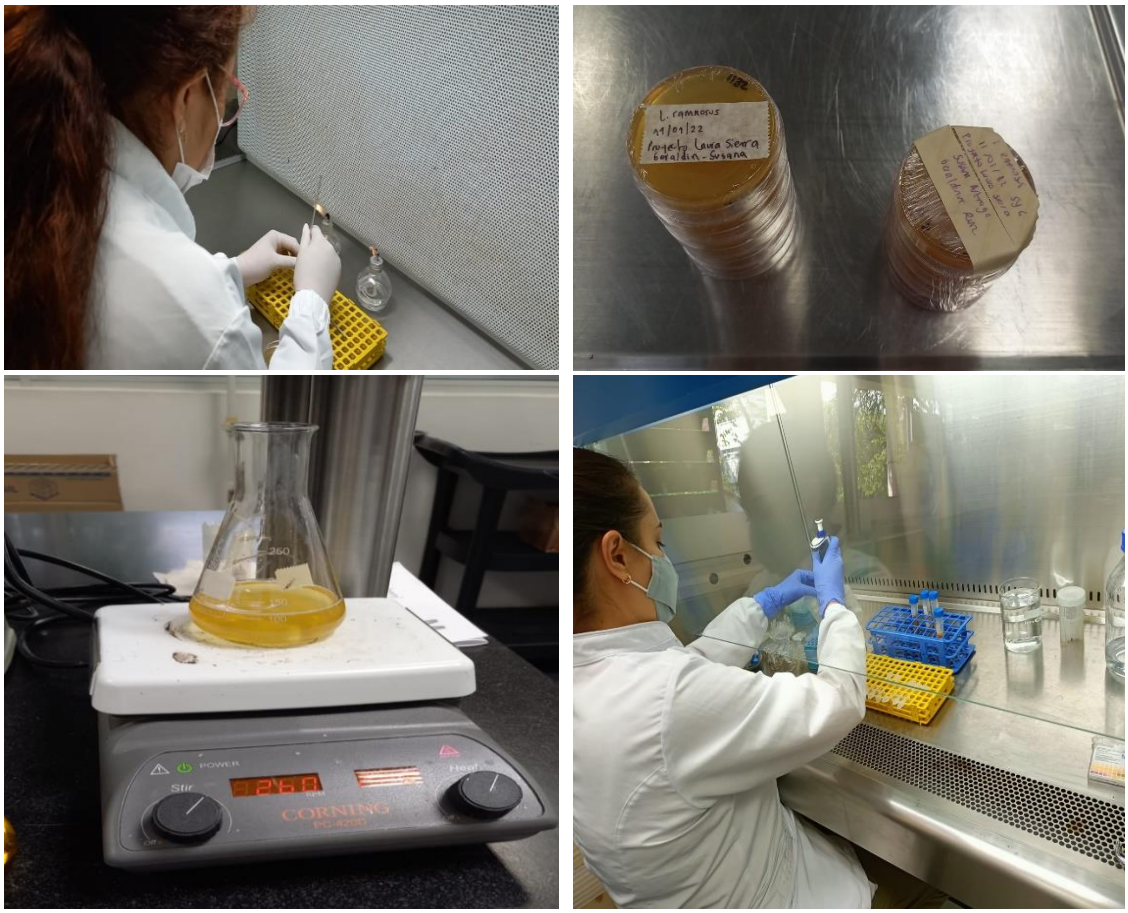


Figura 9. Preparación cultivo de cepas y extracto libre de celulas.

8 Discusión

De acuerdo con nuestros resultados, el proceso de vigilancia tecnológica nos permitió determinar de manera sistemática y categórica, que el mejor modelo para evaluar una cepa con potencial probiótico se describe en el artículo: "Potentiated In Vitro Probiotic Activities of *Lactobacillus fermentum LfQi6* Biofilm Biomass Versus Planktonic Culture" de (Berkes et al., 2020), su evaluación fue a través de ensayo *in vitro* con plataforma de línea celular Caco-2, esta selección se debió a que previamente según el comando CONTARA utilizado en Microsoft Excel demostró que era la que más criterios de evaluación contenía, con un puntaje de 13 y finalmente para una mejor elegibilidad se hicieron lecturas completas de manera tal, que nos permitió corroborar que este era el más completo y él que contaba con los criterios más importantes que exigen la FAO y la OMS entre ellos la hidrolasa de las sales biliares y la adhesión a las células epiteliales. Cabe resaltar que debido a lo que anteriormente se menciona, una desventaja es que el usar líneas celulares en vez de un modelo *in vivo*, es que son células cancerosas y pueden reaccionar de forma distinta a las células epiteliales normales humanas como lo menciona (Fontana et al., 2013; Kos et al., 2003). Además, en otros estudios se menciona que, al no haber circulación sanguínea en estas líneas celulares, podría alterar de forma significativa, las respuestas de los tejidos a las técnicas que se someten para dicha evaluación (Byakika et al., 2019).

Por otro lado, la ecuación con más resultados obtenidos en cuanto artículos encontrados fue "Probiotic" AND "Safety evaluation" representado en la **Figura 6** además se puede observar el año en que más publicaciones hubo, el cual es el 2020, sin embargo, consideramos que en la actualidad se evalúan muy pocos probióticos de nueva generación ya que se siguen evaluando cepas tradicionales como probióticos potenciales, quizá porque los de nueva generación requieren de más análisis, en consecuencia, podrían ser más costosos al necesitar más rigurosidad en el proceso. Además, basándonos en los requerimientos que exigen la FAO; se pudo corroborar con esto que las evaluaciones de seguridad siguen siendo muy desactualizadas e incompletas.

Deducimos que lo anterior, puede ser debido a que estos ensayos *in vitro* se siguen replicando posiblemente como ya se ha mencionado, debido a su fácil reproducibilidad, bajos costos y por su sencillez en cuanto al manejo, a diferencia de los *in vivo* que son más costosos y requieren de más servicios (Dornell, 2021; Verhoeckx et al., 2015). En consecuencia, ambos suelen ser de larga duración y por ende se convierten en obsoletos. Por este motivo, consideramos que una forma de acelerar este proceso de evaluación para potenciales probióticos puede ser el de utilizar las pruebas ómicas moleculares, las cuales se basan en la

identificación molecular a través de marcadores moleculares específicos, estas pruebas tienen como ventaja la alta precisión y rápida respuesta (Baugher & Klaenhammer, 2011; Castro-López et al., 2021), por consiguiente se podría reemplazar estas pruebas tradicionales, además a su vez también, podría usarse para diseñar otros tipos de ensayos *in vitro* que sean mucho más reproducibles y sencillos, y de esta forma se podría facilitar la evaluación de probióticos de nueva generación.

En cuanto a los resultados de la búsqueda de aliados pudimos obtener información de las evaluaciones que se podían realizar en la región, en esta ocasión solo se pudo evaluar dos criterios de forma *in vitro,* los cuales son actividad antimicrobiana, susceptibilidad/resistencia a antibióticos que son de igual importancia, ya que estos son los primeros requisitos que se deben tener en cuenta para que una cepa sea comercial como probiótico. Este resultado es debido a que no tuvimos respuesta de todos los laboratorios o instituciones que cumplían con ciertos requerimientos para dichas pruebas, algunos solo disponían de ciertos equipos, por lo que solo podían realizar una o dos evaluaciones y también se tuvo en cuenta el tiempo de los análisis que por duración no daba para culminar este proyecto a tiempo. Sin embargo, con la información conseguida y las observaciones que pudimos obtener, consideramos que a pesar de que no se pudo hacer una evaluación completa como se pensaba inicialmente, y basados en nuestro articulo principal; igual fue posible alcanzar los objetivos planteados en este estudio. Además, se tienen en cuenta otros laboratorios que cumplían los requisitos, pero por temas de tiempo que requerían los análisis y los procesos para realizar convenios o alianzas, no fue posible que se llevara a cabo en el marco de este proyecto. No obstante, nuestro interés finalmente era conocer los debidos procesos que se deben tener en cuenta para la evaluación de potenciales probióticos, el ecosistema regional y los posibles aliados que se encuentran disponibles para seguirlo llevando a cabo en futuros estudios.

9 Conclusiones

- La Vigilancia tecnológica es una estrategia idónea para identificar el problema a trabajar y la información que se necesita para resolver dicho problema.
- La VT permite realizar un buen análisis y sistematización del proceso de búsqueda e investigación, logrando cumplir los objetivos propuestos.
- Un estudio de VT permite mejorar la toma de decisiones al momento de seleccionar una buena plataforma de análisis biológico, en este caso para

evaluar preliminarmente una cepa con potencial probiótico. Además de conocer el panorama del ecosistema regional del país y el Valle de Aburrá.

- En el ecosistema regional de Antioquia hay pocos laboratorios que cuentan con todos los requerimientos para llevar a cabo estas pruebas *in vitro*, además, basados en la literatura lo ideal sería evaluarlo de ambas formas, es decir, *in vitro* e *in vivo*.
- Los altos costos que se generan en equipos y reactivos implicadas en estas plataforma *in vitro /in vivo* o a las regulaciones éticas en el caso de los modelos animales, dificultan el acceso a las pruebas en el ecosistema
- Es de alta importancia continuar desarrollando e invirtiendo en el área de la ciencia, tecnología e innovación a nivel nacional para futuras investigaciones o en espacios como bioterios, especialmente para nuevas cepas probióticas. Además, fortalecer la infraestructura para este tipo de pruebas biológicas.
- Para avanzar en la inserción de nuevos ingredientes probióticos al mercado se deben establecer nuevas metodologías basadas en pruebas ómicas, debido a que aun cuando son de mayor costo, son más sencillas, precisas y de menos duración comparadas con las *in vitro e in vivo*.

10 Referencias

Bang, W. Y., Ban, O.-H., Lee, B. S., Oh, S., Park, C., Park, M.-K., Jung, S. K., Yang, J., & Jung, Y. H. (2021). Genomic-, phenotypic-, and toxicity-based safety assessment and probiotic potency of Bacillus coagulans IDCC 1201 isolated from green malt. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *48*(5–6), 26. https://doi.org/10.1093/JIMB/KUAB026

Baugher, J. L., & Klaenhammer, T. R. (2011). Invited review: Application of omics tools to understanding probiotic functionality. *Journal of Dairy Science*, *94*(10), 4753–4765. https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4384

Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(4), 625–651. https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2004.09.003

Berkes, E., Liao, Y. H., Neef, D., Grandalski, M., & Monsul, N. (2020). Potentiated In Vitro Probiotic Activities of Lactobacillus fermentum LfQi6 Biofilm Biomass Versus Planktonic Culture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *12*(3), 1097–1114. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09624-8

Bhushan, B., Sakhare, S. M., Narayan, K. S., Kumari, M., Mishra, V., & Dicks, L. M. T. (2020). Characterization of Riboflavin-Producing Strains of

Lactobacillus plantarum as Potential Probiotic Candidate through in vitro Assessment and Principal Component Analysis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins 2020 13:2*, *13*(2), 453–467. https://doi.org/10.1007/S12602-020-09696-X

Bischoff, S. C. (2011). "Gut health": A new objective in medicine? *BMC Medicine*, *9*. https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24

Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., & Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, *36*(6), 775–780. https://doi.org/10.1086/368080

Botta, C., Langerholc, T., Cencič, A., & Cocolin, L. (2014). In vitro selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. *PLoS ONE*, *9*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094457

Burdock, G. A., & Carabin, I. G. (2004). Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicology Letters*, *150*, 3–18. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.07.004

Byakika, S., Mukisa, I. M., Byaruhanga, Y. B., & Muyanja, C. (2019). A Review of Criteria and Methods for Evaluating the Probiotic Potential of Microorganisms. In *Food Reviews International* (Vol. 35, Issue 5, pp. 427–466). Taylor & Francis. https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815

Castro-López, C., García, H. S., Guadalupe Martínez-Ávila, G. C., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2021). Genomics-based approaches to identify and predict the health-promoting and safety activities of promising probiotic strains – A probiogenomics review. *Trends in Food Science & Technology*, *108*, 148–163. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.12.017

Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine 2018 50:8*, *50*(8), 1–9. https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x

Cigarran Guldris, S., González Parra, E., & Cases Amenós, A. (2017). Microbiota intestinal en la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, *37*(1), 9–19. https://doi.org/10.1016/J.NEFRO.2016.05.008

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, *36*(8), 2060–2076. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003

de Oliveira, G. L. V. (2022). Intestinal Dysbiosis in Autoimmune Diseases. *Reference Module in Food Science*, 545–563. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00038-3

Dornell, J. (2021, July 1). *In Vivo vs In Vitro: Definición, Pros y Contras | Redes de tecnología*. News Courier. https://www.news-courier.com/cell-science/articles/in-vivo-vs-in-vitro-definition-pros-and-cons-350415

dos Santos Leandro, E., Ginani, V. C., de Alencar, E. R., Pereira, O. G., Rose, E. C. P., do Vale, H. M. M., Pratesi, R., Hecht, M. M., Cavalcanti, M. H., & Tavares, C. S. O. (2020). Isolation, Identification, and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Species of Forage Plants, Cocoa Beans, and Artisanal Salami. *Probiotics and Antimicrobial Proteins 2020 13:1*, *13*(1), 173–186. https://doi.org/10.1007/S12602-020-09679-Y

Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2015). A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*, *9*(1), 43–48. https://doi.org/10.1017/S1751731114002584

Dunne, C., O' Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O' Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O' Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). Findings, In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo. *American Society for Clinical Nutrition*, *73*, 92s-386s.

FAO. (2021). *Food safety and quality: Probióticos*. Probiotics. http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/es/

FAO, & WHO. (2002). Probitics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In *Health of a Joint FAO/WHO* (Vol. 85). https://doi.org/10.1097/JPN.0000000000000375

FAO, & WHO. (2006). *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO FOOD AND NUTRITION PAPER*. *85*, 4–56.

Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In *Current Issues in Intestinal Microbiology* (Vol. 8, Issue 2, pp. 44–61). Curr Issues Intest Microbiol. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17542335/

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, *109*(S2), S35–S50. https://doi.org/10.1017/S0007114512004011

Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *50*, S116–S119. https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697

Guantario, B., Zinno, P., Schifano, E., Roselli, M., Perozzi, G., Palleschi, C., Uccelletti, D., & Devirgiliis, C. (2018). In Vitro and in Vivo selection of potentially probiotic lactobacilli from nocellara del belice table olives. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAR), 595. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00595

Gueimonde, M., Debor, L., Tölkkö, S., Jokisalo, E., & Salminen, S. (2007). Quantitative assessment of faecal bifidobacterial populations by real-time PCR using lanthanide probes. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(4), 1116–1122. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03145.x

Gullot, C. C., & Ambato, M. (2021). Nueva bioterapéutica: probióticos de próxima generación. *Revista Cubana de Pediatria*, *93*(1), 1–20. https://orcid.org/0000-0001-9925-5211

Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. (2002). Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements [1]. *International Journal of Food Microbiology*, *72*(1–2), 175–176. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00703-6

Hdez, A. H., Rodríguez, C. C., Zamorano, M. M., & Herrera, C. Q. (2015). Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatria Integral*, *19*(5), 337–354.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(8), 506–514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66

Højelse, F. (2000). Preclinical safety assessment: In vitro - in vivo testing. *Pharmacology and Toxicology, Supplement*, *86*(1), 6–7. https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2000.d01-2.x

Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., & Swings, J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in Microbiology*, *157*(9), 803–810. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.006

Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, *78*(4), 240–248. https://doi.org/10.1016/J.RGMX.2013.04.004

Koirala, S., & Anal, A. K. (2021). Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods*, *3*, 100013. https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100013

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Sĭmpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(6), 981–987. https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2003.01915.X

Lahtinen, S. J., Boyle, R. J., Margolles, A., & Frias, R. (2009). Safety Assessment of Probiotics. *Springer Science+ Business Media*, *31*, 44.

Ma, T., Jin, H., Kwok, L. Y., Sun, Z., Liong, M. T., & Zhang, H. (2021). Probiotic consumption relieved human stress and anxiety symptoms possibly via modulating the neuroactive potential of the gut microbiota. *Neurobiology of Stress*, *14*, 100294. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100294

Maleki Kakelar, H., Barzegari, A., Hanifian, S., Barar, J., & Omidi, Y. (2019). Isolation and molecular identification of Lactobacillus with probiotic potential from abomasums driven rennet. *Food Chemistry*, *272*, 709–714.

https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.08.081

Marteau, P., & Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, *17*(5), 725–740. https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00055-6

Mater, D. D. G., Langella, P., Corthier, G., & Flores, M. J. (2007). A probiotic Lactobacillus strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *14*(1–3), 123–127. https://doi.org/10.1159/000106091

Milajerdi, A., Mousavi, S. M., Sadeghi, A., Salari-Moghaddam, A., Parohan, M., Larijani, B., & Esmaillzadeh, A. (2020). The effect of probiotics on inflammatory biomarkers: a meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Nutrition*, *59*(2), 633–649. https://doi.org/10.1007/S00394-019-01931-8

Naissinger da Silva, M., Tagliapietra, B. L., Flores, V. do A., & Pereira dos Santos Richards, N. S. (2021). In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science*, *4*, 320–325. https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.04.006

Navarro Hernandez, J. A., Ramírez Ojeda, R. A., & Villagrán Vélez, C. (2012). *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales* (Samsara (ed.); 1st ed.).

O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., & Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology*, *2*(April), 1–6. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57

Porter, A. L., Ashton, W. B., Clar, G., Coates, J. F., Cuhls, K., Cunningham, S. W., Ducatel, K., van der Duin, P., Georgehiou, L., Gordon, T., Linstone, H., Marchau, V., Massari, G., Miles, I., Mogee, M., Salo, A., Scapolo, F., Smits, R., & Thissen, W. (2004). Technology futures analysis: Toward integration of the field and new methods. *Technological Forecasting and Social Change*, *71*(3), 287–303. https://doi.org/10.1016/j.techfore.2003.11.004

Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Rubayet Ul Alam, A. S. M., & Jahid, I. K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*, *103*(2), 1223–1237. https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17092

Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, *32*, 17–28. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003

Sharma, A., Lavania, M., Singh, R., & Lal, B. (2021). Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(3), 1622–1632. https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.062

Sorokulova, I. (2008). Preclinical testing in the development of probiotics: A regulatory perspective with Bacillus strains as an example. *Clinical Infectious Diseases*, *46*(SUPPL. 2), S92–S95. https://doi.org/10.1086/523334

Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, *11*(7). https://doi.org/10.3390/NU11071591

Torp, A. M., Bahl, M. I., Boisen, A., & Licht, T. R. (2022). Optimizing oral delivery of next generation probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, *119*, 101–109. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.11.034

Vanegas Fuentes, M., Londoño Zapata, A., Durango Zuleta, M., Gutiérrez Buriticá, M., Ochoa Agudelo, S., & Sepúlveda Valencia, J. (2017). Capacidad Antimicrobiana De Bacterias Ácido Lácticas Autóctonas Aisladas De Queso Doble Crema Y Quesillo Colombiano. *Biotecnoloía En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *15*(1), 45. https://doi.org/10.18684/bsaa(15)45-55

Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vael, C., Klare, I., Romond, M. B., Entenza, J. M., Moreillon, P., Wind, R. D., Knol, J., Wiertz, E., Pot, B., Vaughan, E. E., Kahlmeter, G., & Goossens, H. (2008). Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science and Technology*, *19*(2), 102–114. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2007.07.013

Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (2015). The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4

Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L., & Salminen, S. (2017). Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, *68*, 83–90. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.08.005

Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *67*(6), 449–458. https://doi.org/10.2146/ajhp090168

Yisong, W., & Shurtleff, D. (2019, August). *Probiotics: What You Need To Know*. NIH. https://www.nccih.nih.gov/health/probiotics-what-you-need-to-know

Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, *32*, 103–123. https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.03.009

Zielińska, D., Sionek, B., & Kołożyn-Krajewska, D. (2018). Safety of probiotics. *Diet, Microbiome and Health*, 131–161. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811440-7.00006-5

11 Anexos

11.1 Tabla de mando ampliada

Se adjunta enlace para ingresar al archivo completo de tabla de mando ampliada que complementa a la fase II de factores críticos, allí se encuentra depositada toda la información de la búsqueda requerida para este proceso de vigilancia, esta se encuentra dividida en multiples pestañas de Excel cada una con su respectivo nombre, además se puede observar en detalle la tabla de VT de sistematización que corresponden a la fase I diagnostica para la identificación de necesidades y en la fase II de factores críticos con las preguntas de inteligencia: KIQ (knowledge intelligence question)

https://sites.google.com/view/tabla-de-mando-vt/inicio

11.2 Estado del arte

En el siguiente vinculo se puede encontrar mayor información sobre el estado del Arte

https://sites.google.com/view/estadodelarte-probiticos