

## Seguridad biológica de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC con potencialidad probiótica

### Biological safety of *Lactobacillus plantarum* 22 LMC with probiotic potential



<https://eqrcode.co/a/11ryLL>

 Lilian Sánchez Miranda <sup>1\*</sup>, Ronald Vera Mejía <sup>2</sup>, Félix Agüero <sup>1</sup>, Ernesto Vega Cañizares <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA); Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad Técnica de Manabí (UTM), Avenida Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

**RESUMEN:** El objetivo del presente trabajo fue evaluar la seguridad biológica de una cepa de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC con potencialidades probióticas, aislada de la mucosa del ciego de cerdos criollos. Se realizó un estudio preclínico para evaluar el efecto del candidato a probiótico en un modelo agudo oral a dosis única  $10^{12}$  UFC mL<sup>-1</sup>. Se emplearon ratas *Sprague Dawley* hembras y machos divididas en grupos de cinco animales de cada sexo por tratamiento durante 14 días: (1) células viables de *L. plantarum*, (2) células inactivadas por calor del mismo microorganismo y (3) solución salina como control negativo. Posteriormente, se procedió a la eutanasia. Se realizaron los estudios anatomopatológicos y microbiológicos de los principales órganos. Se determinaron algunos índices hemáticos y de la bioquímica sanguínea. No se encontraron efectos tóxicos atribuibles a la administración del probiótico; el peso corporal se mostró característico para la especie y no hubo alteraciones en el peso de los órganos. No se observaron variaciones macroscópicas, histopatológico y de translocación bacteriana en los órganos evaluados. Los estudios hematológicos y de la bioquímica sanguínea mostraron valores normales para la especie. Se concluye que la cepa de *L. plantarum* 22 LMC demostró su seguridad biológica en la dosis única evaluada.

**Palabras clave:** toxicidad aguda oral, *Lactobacillus plantarum*, probiótico.

**ABSTRACT:** This work was aimed at evaluating the biological safety of a *Lactobacillus plantarum* 22 LMC strain with probiotic potential, isolated from the caecum mucosa of Creole pigs. A pre-clinical study was conducted to evaluate the effect of the probiotic candidate in an acute oral single-dose model  $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup>. Female and male Sprague Dawley rats were used divided into a group of five animals of each sex per treatment (3): viable *L. plantarum* cells (1), heat-inactivated cells of the same microorganism (2) and saline solution as a negative control (3) for 14 days; subsequently proceeded to euthanasia. Pathological and microbiological studies of the main organs were carried out. Some hematological and biochemical indices were determined. No toxic effects attributable to the administration of the probiotic were found; body weight was shown to be characteristic for the species and there were no alterations in organ weight. No macroscopic, histopathological and bacterial translocation variations were observed in the organs evaluated. The hematological and blood biochemical studies showed normal values for the species. It is concluded that the *L. plantarum* 22 CML strain was shown to be biologically safe at the single evaluated dose.

**Key words:** acute oral toxicity, *Lactobacillus plantarum*, probiotic.

\*Autor para la correspondencia: Lilian Sánchez Miranda. E-mail: [lilian@censa.edu.cu](mailto:lilian@censa.edu.cu)

Recibido: 14/02/2020

Aceptado: 03/06/2020

## INTRODUCCIÓN

El género *Lactobacillus* se puede encontrar en hábitats tan variados como bebidas fermentadas, leche, carne y sus derivados. Son reconocidos por ser microorganismos inoos, debido a su relación con los alimentos, forman parte de la microbiota de la boca, tracto intestinal y vaginal del ser humano y los animales, y se reporta su bajo potencial patógeno (1). Sin embargo, algunas cepas de lactobacilos se asocian a infecciones en humanos inmunodeprimidos.

Se recomienda realizar estudios de seguridad a todas las cepas probióticas que se utilicen como aditivos y evaluar los posibles efectos tóxicos (Toxicidad/Patogenicidad/Infectividad) que se puedan producir en los animales de experimentación (2,3). El estudio de seguridad se realiza a través del análisis clínico, microbiológico y anatomopatológico, posterior a la administración por vía oral de una dosis única de la cepa de *L. plantarum* candidato a probiótico.

En estudios previos de Vera *et al.* (4) se seleccionó la cepa de *L. plantarum*, denominada 22 LMC, como candidata a probiótico mediante pruebas *in vitro* por ser con la que se obtuvo mejores resultados. El objetivo de este trabajo fue evaluar la seguridad biológica de *L. plantarum* 22 LMC en animales de experimentación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el área de experimentación animal del laboratorio de Farmacología y Toxicología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), de acuerdo con las guías generales para los ensayos de pesticidas microbianos de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, de sus siglas en inglés Environmental Protection Agency) (5), de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) establecidos por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (6) (Tabla 1).

### Declaración de conformidad con el bienestar de los animales

Se conformaron tres grupos experimentales de cinco animales, separados según el sexo, mantenidas en las condiciones de tenencia,

manejo y alimentación descritas previamente hasta finalizar el experimento. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio (7) y la aprobación del Comité de Ética del CENSA (Tabla 2).

### Grupos de experimentación

La suspensión bacteriana se obtuvo a partir colonias de *L. plantarum* 22 LMC cultivadas en medio Mann Rogosa Sharp (MRS, Difco™ EUA) bajo condiciones de anaerobiosis, según lo descrito por Vera *et al.* (4). Se inocularon en dos frascos con tapas de roscas con 400 mL de caldo MRS y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 7500 g y la biomasa resultante se resuspendió en solución salina a 0,8 %; se ajustó la concentración mediante el conteo de colonias correspondiente a 10<sup>12</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. La dosis 10<sup>12</sup> UFC mL<sup>-1</sup> se seleccionó según lo referido por Jin *et al.* (8), como la máxima que se le suministra como probiótico a los animales.

El preparado bacteriano se recepcionó 48 horas antes del experimento, de tal manera que se garantizó su poder germinativo y capacidad de infección al conservarlo a 4-8°C. Para el control de la viabilidad y de la inactivación por calor de las suspensiones, se sembró 0,2 mL de las suspensiones bacterianas (10<sup>12</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) en placas de agar MRS durante 24 a 48 horas, para corroborar el crecimiento en las placas. Una vez liberadas las suspensiones bacterianas, antes de la inoculación en las ratas se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- El alimento se retiró entre 12 y 18 horas antes de la aplicación.
- Se suministró el alimento a las ratas pasadas tres horas del tratamiento.
- Se registraron diariamente los signos clínicos, así como la ocurrencia de muertes.

### Sacrificio

Concluido el tiempo de evaluación (14 días), se sacrificaron todos los animales según los procedimientos descritos por Close *et al.* (9).

**Tabla 1.** Condiciones experimentales para la evaluación de toxicidad aguda oral en ratas tratadas con *L. plantarum* 22 LMC. / *Experimental conditions for the evaluation of acute oral toxicity in rats treated with L. plantarum* 22 LMC.

Aspectos a evaluar	Especificaciones
<b>Evaluación preexperimental</b>	Siete días: se seleccionó al azar el 10 % de los animales y se realizó el control de salud de los mismos
<b>Duración del experimento</b>	14 días
<b>Dosificación</b>	Única administración. Inicio del experimento
<b>Nivel de dosis</b>	10 <sup>12</sup> UFC/animal
<b>Tamaño de los grupos</b>	10 (cinco de cada sexo)
<b>Vía de administración</b>	Oral con cánulas
<b>Frecuencia de la observación clínica</b>	Diaria, dos veces al día
<b>Animales y condiciones de mantenimiento</b>	
<b>Especie y línea</b>	Ratas <i>Sprague Dawley</i>
<b>Edad</b>	7-8 semanas
<b>Procedencia de los animales</b>	CENPALAB
<b>Peso vivo promedio</b>	160-170 g (hembras) 180- 200 g (machos). Hembras nulíparas, no grávidas.
<b>Método de distribución</b>	Al azar
<b>Alimento</b>	Alimento concentrado para la especie
<b>Ubicación</b>	Individual en caja de polipropileno con cobertura de malla metálica y viruta de madera esterilizada en su interior.
<b>Otras sustancias químicas en la sala de experimentación</b>	Ninguna
<b>Condiciones ambientales</b>	Temperatura: 17- 23°C Humedad relativa: 30-70 % Ciclos luz-oscuridad: 12 x 12 h

**Tabla 2.** Distribución de los animales en los diferentes grupos experimentales. / *Distribution of the animals in the different experimental groups.*

Grupos	Tratamientos	N/sexo	
		Machos	Hembras
<b>A (Control negativo)</b>	Solución salina al 0,8 %	5	5
<b>B (Células viables)</b>	Células viable de <i>L. plantarum</i> 22 LMC	5	5
<b>C (Células inactivadas)</b>	Células inactivadas de <i>L. plantarum</i> 22 LMC inactivada a 121°C 10 min	5	5

**Se evaluaron los siguientes parámetros:**

1. Signos clínicos
2. Efecto sobre el peso corporal
3. Análisis macroscópico de los órganos
4. Peso de los órganos
5. Microbiología de los órganos y tejidos
6. Análisis histopatológico de los órganos
7. Exámenes de hematología y de bioquímica sanguínea

Los diferentes sistemas evaluados incluyeron ojos, mucosas visibles, piel y pelos, sistema circulatorio, sistema respiratorio, así como patronas de conducta, actividad motora, signos de incoordinación, convulsiones, salivación, sedación, estado de síndrome diarreico, muerte u otras alteraciones clínicas.

**Análisis microbiológico**

Posterior al sacrificio, se desarrolló el estudio de infectividad en los órganos mediante la siembra y la identificación bacteriológica de las

muestras tomadas de animales inoculados con el probiótico de ensayo.

Se tomaron muestras de todos los animales del estudio, de los cuales se analizaron por examen bacteriológico los siguientes órganos y tejidos: corazón, riñón, bazo, hígado, pulmón, nódulos linfáticos y sangre. Las muestras se colocaron en placas de Petri estériles y se flameó la superficie; luego, con tijeras y pinzas estériles, se realizó un corte para efectuar la impronta en los medios de cultivo.

Las muestras se sembraron en agar sangre, agar Sabouraud y agar MRS líquido. Se realizaron dos réplicas. Las placas se incubaron en condiciones aeróbicas y para la anaeróbica se empleó una incubadora (ESCO CelCulture®, EUA) con una atmósfera de CO<sub>2</sub> de 10 % a 37°C.

Se realizó el examen de los cultivos a las 24, 48, 72, 96 horas para describir las características culturales del crecimiento, pruebas tintoriales y bioquímicas y para crecimiento de lactobacilos, como se describe por Sánchez *et al.* (10).

### **Análisis anatomopatológico**

Se realizó el análisis macroscópico de los órganos corazón, riñón, bazo, hígado y pulmón para todos los animales. Posteriormente, se tomaron muestras para el estudio histopatológico, las que se procesaron por la técnica clásica de inclusión y cortes en bloques de parafina, previa fijación en formol neutro a 10 %; se colorearon con hematoxilina y eosina (Merck KGaA, Alemania).

Se analizaron 266 bloques de parafinas. Los fragmentos de pulmón, hígado, riñón, corazón y bazo, embebidos en parafina, se cortaron con el micrótopo (*Leica RM2255*, Alemania). Los cortes se extendieron en láminas y a continuación se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina (11).

El estudio histológico incluyó el 100 % de los animales investigados. La identificación de las muestras fue única para cada animal y en todos los casos se mantuvo la identificación inicial de los bloques.

### **Exámenes hemáticos y de bioquímica sanguínea**

Los animales se anestesiaron con éter dietílico y las muestras de sangre se extrajeron de la comisura interna del ojo (seno orbital) mediante pipetas Pasteur. La sangre se colectó en viales con EDTA (10 µL de EDTA/mL de sangre) para su posterior procesamiento hematológico. Para la determinación de los parámetros bioquímicos se colectó sangre sin anticoagulante en viales de 2 mL; se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 6000 g en una centrífuga Eppendorf durante 10 minutos; posteriormente se colectó el suero.

Mediante el empleo del Contador electrónico de células Micros ABX de la firma ABX Diagnostic Systems, en el hemograma completo se determinaron la concentración de hemoglobina (HB), el conteo de eritrocitos (ETO), hematocrito (HCT), conteo de plaquetas (PLT), el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y los leucocitos totales (LEUC).

El conteo diferencial de leucocitos incluyó conteo de neutrófilos (N), linfocitos (L), monocitos (M), eosinófilos (E) y basófilos (B); se determinó mediante técnica tradicional de extensión de sangre periférica; los resultados se expresan en valores relativos y absolutos.

Mediante el empleo de un analizador Automático Hitachi 704 de la Boehringer Mannheim con juego comercial de la misma firma, se determinaron los siguientes indicadores bioquímicos: Albúmina (Alb), Proteínas totales (PT), Glucosa (Gluc), Colesterol total (Chol-T), Triglicéridos (TG).

### **Análisis estadístico**

Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico IBM® SPSS versión 21 (12). Como prueba de bondad de ajuste, para comprobar la normalidad de los datos, se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (DE) y se analizaron por ANOVA (análisis de varianza de una vía), seguido de la prueba de Dunnett para

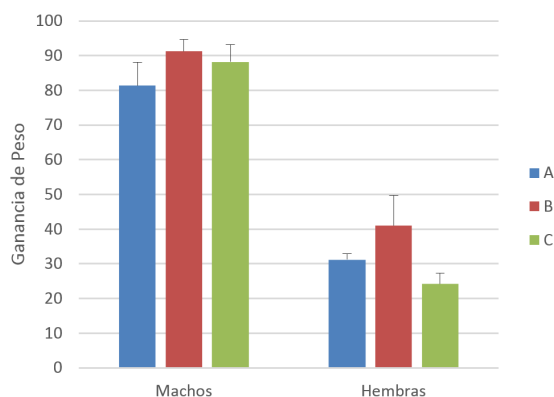
determinar las diferencias significativas entre los grupos tratados y el control negativo. Un valor de  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la evaluación preexperimental los animales no evidenciaron alteraciones clínicas, por lo que se procedió a la realización del estudio. Durante el periodo de evaluación los animales no presentaron signos clínicos indicativos de toxicidad. No se evidenció muerte en los diferentes grupos estudiados.

El análisis de la variación del peso corporal constituye uno de los parámetros fundamentales a tener en cuenta dentro de un estudio toxicológico, debido a que sus alteraciones son un indicador sensible de la toxicidad causada por el producto a evaluar (13).

El peso de los animales se comportó con una tendencia ascendente durante el periodo de observación. Este comportamiento es esperado para los animales en estas edades. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los valores medios de peso corporal entre animales controles y tratados, tanto para los machos como para las hembras (Fig. 1).



**Figura 1.** Comportamiento del peso promedio corporal de ratas machos y hembras en el estudio de infectividad/patogenicidad/toxicidad aguda oral. **A:** Control negativo; **B:** Grupo tratado con células viables de *L. plantarum* 22 LMC; **C:** Grupo tratado con células inactivadas de *L. plantarum* 22 LMC. /Behaviour of average body weight of male and female rats in the infectivity/pathogenicity/acute oral toxicity study. **A:** Negative control; **B:** Group treated with viable cells of *L. plantarum* 22 LMC; **C:** Group treated with inactivated cells of *L. plantarum* 22 LMC.

Todos los valores se presentan como media  $\pm$  DE (n=6). \* No hay diferencias significativas con respecto al grupo control (Prueba de Dunnett).

## Peso relativo de los órganos

Al analizar el peso de los órganos de los animales en estudio, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados para el mismo sexo (Figs. 2 y 3).

En el examen macroscópico del corazón, pulmones, bazo, hígado y riñones, no se evidenciaron lesiones indicativas de toxicidad debido a la administración oral del producto.

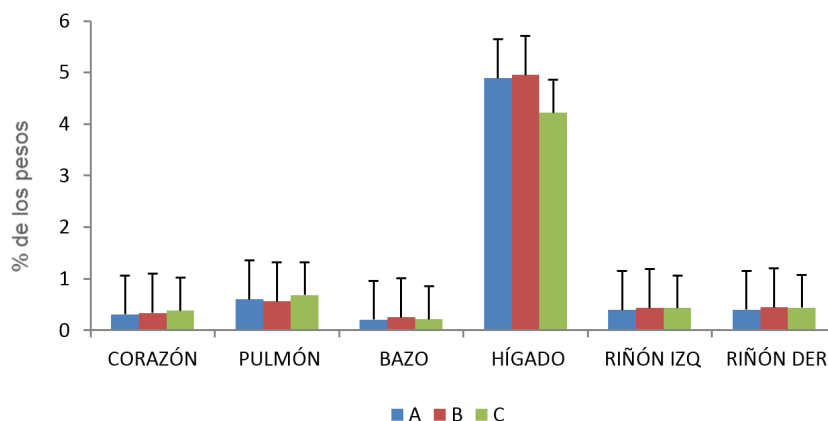
En el examen histopatológico del pulmón, en todos los casos se observó una morfología normal. En la porción respiratoria se observaron apropiadas formaciones infundibuliformes que se resuelven en conductos alveolares, atrios, sacos alveolares y alvéolos. Todas estas estructuras desde el bronquiolo respiratorio hasta el alvéolo, conjuntamente con los vasos sanguíneos y nervios, no presentaron alteraciones. Tal estado califica a la unidad respiratoria del pulmón desde el punto de vista histológico y funcional estereotipado.

En el hígado de los animales evaluados se observó integridad estructural en la unidad histológica de este órgano (acino de Rappaport), con adecuada forma, tamaño y armonización de los hepatocitos (formación de cordones celulares alrededor de la vena central), morfología normal del sinusoides, así como de los canales que forman el espacio porta (arteria hepática, rama porta y conductos biliares).

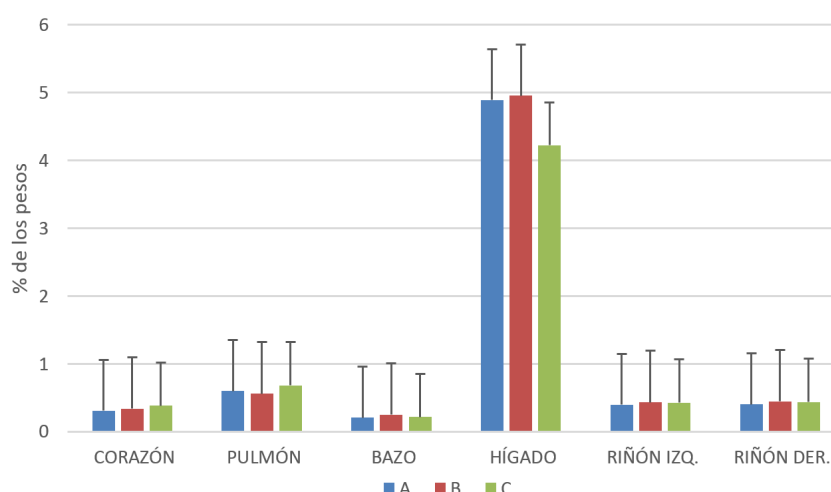
En el bazo de cinco animales del ensayo, que pertenecen a los tres grupos de animales tratados, se observó ausencia de los centros germinativos, que no fue atribuible al producto de ensayo. En el resto de los órganos evaluados (riñón y corazón) no se mostraron cambios, por lo que en los animales estudiados no se mostraron alteraciones a nivel histológico asociadas al candidato probiótico de *L. plantarum* 22 MLC.

La toxicidad oral es una de las pruebas más utilizadas para determinar la inocuidad de cepas probióticas; a su vez, la translocación bacteriana es un indicador importante de la toxicidad, debido a que constituye el primer paso en el





**Figura 2.** Pesos relativos de los órganos de ratas hembras en el estudio de infectividad/ patogenicidad/toxicidad aguda oral. **A:** Control negativo; **B:** Grupo tratado con células viables de *L. plantarum* 22 LMC; **C:** Grupo tratado con células inactivadas de *L. plantarum* 22 LMC. /Relative organ weights of female rats in the infectivity/pathogenicity/acute oral toxicity study. *A:* Negative control; *B:* Group treated with viable cells of *L. plantarum* 22 LMC; *C:* Group treated with inactivated cells of *L. plantarum* 22 LMC.



**Figura 3.** Pesos relativos de los órganos de ratas machos en el estudio de infectividad/ patogenicidad/toxicidad aguda oral. **A:** Control negativo; **B:** Grupo tratado con cepa viables de *L. plantarum*; **C:** Grupo tratado con células inactivadas de *L. plantarum*. / Relative organ weights of male rats in the infectivity/pathogenicity/acute oral toxicity study. *A:* Negative control; *B:* Group treated with viable cells of *L. plantarum* 22 LMC; *C:* Group treated with inactivated cells of *L. plantarum* 22 LMC.

proceso de patogénesis de muchos microorganismos oportunistas habitantes del intestino (5). En los órganos evaluados no se observó crecimiento de bacterias, lo que permite plantear que los animales estudiados resultaron negativos a la translocación microbiana.

Los resultados coinciden con estudios previos, en los cuales varias dosis de diferentes cepas de lactobacilos, potencialmente probióticos, se administraron a ratones BALB/c durante semanas

o meses (14) y no se observó translocación bacteriana en estos órganos de los ratones. En contraste, otros estudios reportan que las bacterias ácido lácticas pueden inducir la translocación de microbiota normal al hígado y bazo solo en dosis altas (15).

Sobre la base de los resultados del presente estudio, se considera inocua la cepa de *L. plantarum* 22 LMC para las ratas, teniendo en cuenta los criterios previamente expuestos sobre

los estudios anatomopatológicos e histológicos, así como la ausencia de colonización de bacterias intestinales a nivel extraintestinal en el modelo *in vivo* evaluado.

En la [Tabla 3](#) se muestra que no se observaron diferencias significativas entre los grupos; cuando se comparan los valores hematológicos con los referenciados para la especie, estos están dentro de lo reportado por León *et al.* (16) para ratas *Sprague Dawley*.

En la [Tabla 4](#) se presentan los estudios de la bioquímica sanguínea de ratas *Sprague Dawley* inoculadas por vía oral con el candidato a probiótico de *L. plantarum* 22 LMC seleccionado. Existen diferencias significativas entre los grupos tratados y controles. Hay que destacar los resultados encontrados en los valores del colesterol de los grupos tratados, los cuales fueron inferiores con respecto al grupo control; sin embargo, están dentro de los valores normales referenciados para la especie.

La adición de probióticos en la alimentación animal puede reducir el colesterol. Algunos autores, como Jurado *et al.* (18) y Dlamini *et al.* (19), propusieron que ciertos lactobacilos probióticos, con actividad de sal biliar hidrolasa, pueden disminuir los niveles de colesterol en sangre al desconjugar enzimáticamente los ácidos biliares, pues aumenta su tasa de excreción y con ello disminuyen la solubilidad y la absorción de los lípidos en el intestino.

Diferentes autores refieren que las pruebas realizadas de toxicidad dependen de la utilización final del probiótico (20). La estandarización de los criterios de evaluación de la funcionalidad y la seguridad de los probióticos, así como el establecimiento de correlaciones entre los ensayos de evaluación *in vivo* e *in vitro*, constituyen hasta el momento un gran reto para la comunidad científica, los productores y los órganos reguladores. Las medidas adoptadas armonizaron los criterios de comercialización de los alimentos funcionales y, entre ellos, los que contienen probióticos (21). El uso de modelos de experimentación animal resulta muy útil para evaluar *in vivo* la seguridad y los efectos de la administración de altas dosis (22).

En el presente trabajo se evaluó la dosis propuesta de  $10^{12}$  UFC/ animal de la cepa de *L. plantarum* 22 LMC, aislada del intestino de cerdos, sobre la base de los estudios de translocación bacteriana, comportamiento de los indicadores anatomopatológicos (macroscópicos y microscópico de los órganos), hemáticos y bioquímicos, los que no evidenciaron efecto tóxico asociado a la aplicación del probiótico en los grupos evaluados. Estos resultados avalan la continuidad de las investigaciones relacionadas con el efecto del probiótico en indicadores productivos y de salud en la especie diana. Se concluye que la cepa de *L. plantarum* 22 LMC es segura en el modelo animal evaluado.

**Tabla 3.** Valores hematológicos de ratas *Sprague Dawley* tratadas con *L. plantarum* 22 LMC. / *Hematological values of Sprague Dawley rats treated with L. plantarum* 22 LMC.

Grupos	HB (g/dL)	ETO (x10 <sup>12</sup> c/L)	HCT (L/L)	VCM (fL)	HCM (g/dL)	PLT (x10 <sup>9</sup> c/L)	LEUC (x10 <sup>9</sup> c/L)	Neut %	Linfoc %	Monoc %
<b>A Control</b>	13,27a	7,17a	41,18a	57,33a	18,48a	637,17a	4,63a	8,17a	90,83a	0,50a
<b>B Células viables de <i>L. plantarum</i></b>	13,27a	7,18a	41,17a	57,17a	18,62a	595,33	4,67a	0,50a	91,67a	0,33a
<b>C Células inactivadas de <i>L. plantarum</i></b>	14,25a	7,72a	44,17a	57,67a	18,45a	549,33a	4,20a	9,50a	89,83a	0,33a
±EE	0,18	0,11	0,56	0,39	0,19	16,10	0,40	0,62	0,72	0,14
<b>Valores referenciales (17)</b>	12,64	6,03	32,7	48,6	18,2	438	3,84	14,5	83,51	0-2,5
	15,52	8,10	41,0	56,2	22,2	916	10,74		97,3	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Leyenda: hemoglobina (HB), conteo de eritrocitos (ETO), hematocrito (HCT), conteo de plaquetas (PLT), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), y leucocitos totales (LEUC)

Medias con letras comunes no difieren estadísticamente ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabla 4.** Exámenes de bioquímica sanguínea de las ratas *Sprague Dawley* tratadas con una cepa de *L. plantarum* 22 LMC. / *Blood chemistry tests of Sprague Dawley rats treated with a strain of L. plantarum* 22 LMC.

Grupos	Albúmina g/L	Proteínas g/L	Colesterol (mmol/L)	Glucosa (mmol/L)	Triglicéridos (mmol/L)
A- grupo control	48,88 <sup>a</sup>	67,53 <sup>a</sup>	2,83 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a</sup>
B- Células viables de <i>L. plantarum</i>	50,82 <sup>a</sup>	69,42 <sup>a</sup>	2,10 <sup>b</sup>	3,43 <sup>a</sup>	1,13 <sup>a</sup>
C Células inactivadas de <i>L. plantarum</i>	52,62 <sup>a</sup>	70,68 <sup>a</sup>	2,05 <sup>b</sup>	3,30 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>
E+E	1,19	1,31	0,12	0,18	0,12
Valores de referencia (17)	29,4-52,20	59,4-82	1,36-2,64	2,7-5,06	0,6-1,4

Medias con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ).

## REFERENCIAS

1. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. April 30 and May 1. London Ontario, Canada. 2012. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
2. WHO/FAO Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization, London Ontario Canada. 2002; 8. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
3. FAO/OMS. Programa conjunto sobre normas alimentarias comisión del Codex alimentarius 29<sup>a</sup> período de sesiones Ginebra (Suiza). Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. 2006. Mérida. p. 91.
4. Vera R, Ormaza J, Muñoz J, Arteaga MF, Sánchez L. Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. *Rev Salud Anim.* 2018;40(2):1-12
5. EPA Microbial pesticide test guidelines OPPTS 885.3050, acute oral toxicity/pathogenicity the Office of Prevention. Pesticide and Toxic Substance United States Environmental Protection Agency, USA. 1996. p. 10
6. HASSLER, Stephan, et al. Good Laboratory Practice (GLP)-guidelines for the acquisition and processing of electronic raw data in a GLP environment. *The Quality Assurance Journal for Pharmaceutical, Health and Environmental Professionals.* 2006;(1):3-14.
7. Clark J, Gebhart G, Gonder J., Keeling M, KohnD. The 1996 guide for the care and use of laboratory animals. *ILAR J.* 1997;38(1):41-48.
8. Jin LZ, Marquar RR, Zhoe X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterocoligenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4200.
9. Close MB, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 2. *Laboratory Animals.* 1997;31(1):1-32.
10. Sánchez L, Vichi J, Llanes M, Castro E, Soler DM, Espinosa I, et al. Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidatos a prebióticas. *Rev Salud Anim.* 2011;33(3):154-160.
11. Sánchez L, Vichi J, Llanes M, Castro E, Soler DM, Espinosa I, et al. Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidatos a prebióticas. *Rev Salud Anim.* 2011;33(3):154-160.
12. Luna LG. Manual of histology staining methods of the Armed forces institute of pathology. EUU. 1968. p. 35.
13. Taanila A. IBM SPSS Statistics 21. Haettu. 2013;14.
13. Frizzo L, Peralta C, Zbrun MV, Bertozzi E, Soto L, Marti E, et al. Respuestas de ratones



- inoculados con bacterias lácticas de origen bovino a un desafío con salmonella dublin. Revista FAVE. Sección Ciencias Veterinarias. 2005;4:1-2.
14. Soto JAC, Almario T, León C, Moreno S, Domínguez LC, Garzón JR. Bacteremia secundaria a una traslocación bacteriana, una complicación de la obstrucción intestinal mecánica. Universitas Médica. 2016; 57(2): 193-211.
  15. Moreno R, Salas EJ, Pérez-Maldonado C, Jiménez J. Inocuidad de lactobacilos potencialmente probióticos aislados de heces de lactante y leche materna. Acta Bioclínica. 2013;5(3):149.
  16. Diniz D, Peluzio MD, Pérez T, Cañizares E, Sánchez L, Dorbigny BM, et al. Evaluation of the subchronic toxicity of kefir by oral administration in Wistar rats. Nutricion Hospitalaria. 2014;29(6):1352-1359.
  17. León GA, Blanco D, Peña A, Ronda M, González BO, Arteaga ME, et al. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cerp: SPRD. RedVet. 2011;12(11):1-10.
  18. Jurado GH, Jarrín JV. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. Biosalud. 2015;14(2):49-62.
  19. Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI. Effects of probiotics on growth performance, blood parameters, and antibody stimulation in piglets. South African J Anim Sci. 2017;47(6):765-776.
  20. Curbelo A, Figueroa T, Acosta E, Gutiérrez M, González C, Rivero Y, et al. Evaluación de la toxicidad aguda oral y de sensibilización cutánea de Microorganismos Eficientes. Retel/ n° 55 [https://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=list\\_pages\\_subcategories&scid\\_listado=164](https://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=list_pages_subcategories&scid_listado=164) O [https://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/55003.pdf](https://www.sertox.com.ar/img/item_full/55003.pdf) Consultado Julio 2019
  21. Castillo I, Escandón V, Fernández MSG, Cueto WMC, Montfort GRC. Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2019;22(1):1-17.
  22. Rodríguez JM. Probióticos: del laboratorio al consumidor. Nutrición hospitalaria. 2015; 31(1):33-47.

**Contribución de los autores:** Lilian Sánchez Miranda: conformó el diseño del trabajo, realizó las evaluaciones microbiológicas y la escritura del artículo. Ronald Vera Mejía: realizó las evaluaciones anatomopatológicas de las ratas y el análisis estadístico de los resultados. Félix Agüero: realizó los análisis clínicos de las ratas en estudio. Ernesto Vega: diseñó los estudios hematológicos y la bioquímica sanguínea de las ratas y realizó la revisión del artículo.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)