



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**EFFECTO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA
ESPERANZA DE VIDA Y PUESTA DE
HUEVOS DEL *C. ELEGANS***

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural

ALUMNO: ALBERTO BRIZ MARTINEZ

TUTOR: DR. ANTONIO MARTINEZ LOPEZ

CO-TUTOR EXTERNO: DR. MARIA DOLORES RODRIGO ALIAGA

DIRECTOR EXPERIMENTAL: DIANA IBAÑEZ PEINADO

Curso académico: 2018-2019

Valencia, Septiembre de 2019

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del quitosano de insecto sobre una población de *Caenorhabditis elegans* desde el punto de vista de su esperanza de vida y su pauta de puesta de huevos.

Se observó que el quitosano de insecto reduce la esperanza de vida ya que, considerando los percentiles 75, 50, 25 y 5 de supervivencia media, se observa que la población de nematodo expuesta al quitosano posee valores de supervivencia más bajos en todos los casos respecto a los tratamientos control (*E. coli* OP50 sin quitosano) y control ácido (*E. coli* OP50 en medio ácido acético al 1%).

Además, los resultados indicaron que el quitosano reduce el promedio de huevos puestos por los nematodos presentando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para el segundo día de puesta de huevos desde el inicio de la actividad, afectando así al total de huevos puestos en dicho tratamiento.

Por lo tanto, y en vista de los resultados, se puede decir que el quitosano de insecto a la concentración 0.15% afecta al comportamiento del *C. elegans* en relación a su esperanza de vida y su puesta de huevos. Resultaría interesante, por tanto, considerar concentraciones menores con objeto de evitar estos efectos indeseables.

Palabras clave: *C. elegans*, Modelo *in vivo*, Quitosano, Esperanza de vida, Puesta de huevos.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA - CSIC), Carrer del Catedratic Agustín Escardino Benlloch 7, 46980 Paterna (Valencia), España.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of insect chitosan on a population of *Caenorhabditis elegans* from the point of view of their life expectancy and their pattern of egg laying.

It was observed that insect chitosan reduced life expectancy because considering 75, 50, 25 and 5 percentiles of average survival, it was observed that the population of nematode exposed to chitosan treatment were lower in relation to control treatment (*E. coli* OP50 without chitosan) and acid control (*E. coli* OP50 in 1% acetic acid medium).

In addition, the results indicated that chitosan reduces the mean number of eggs laid by the nematodes, presenting statistically significant differences ($P < 0.05$) for the second day of laying eggs from the beginning of the reproductive activity of the worm, which also turns out to be the moment of greater activity, thus affecting the total number of eggs laid by this treatment.

Therefore, and in view of the results, it can be said that insect chitosan at 0.15% concentration affects the behavior of *C. elegans* in relation to its life expectancy and egg laying. Therefore, It would be interesting to consider lower concentrations in order to avoid these undesirable effects.

Keywords: *C. elegans*, *In vivo* model, Chitosan, Life expectancy, Egg laying

Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA - CSIC), Carrer del Catedratic Agustín Escardino Benlloch 7, 46980 Paterna (Valencia), España.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	Pág. 1
1.1 El <i>Caenorhabditis elegans</i>	Pág. 1
1.2 La quitina y el quitosano	Pág. 5
2. OBJETIVOS	Pág. 10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 11
3.1 Preparación de medios y cultivos	Pág. 11
3.1.1 Preparación del cultivo de <i>Escherichia coli</i> OP50	Pág. 11
3.1.2 Cultivo y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i>	Pág. 11
3.1.4 Preparación del medio con quitosano de insecto	Pág. 12
3.1.3 Preparación del medio control ácido	Pág. 13
3.2 Procedimiento de trabajo	Pág. 13
3.2.1 Manipulación de <i>Caenorhabditis elegans</i>	Pág. 13
3.2.2 Sincronización de <i>Caenorhabditis elegans</i>	Pág. 13
3.2.3 Descripción de los grupos de estudio	Pág. 14
3.2.4 Estudio de la esperanza de vida	Pág. 14
3.2.5 Estudio de la puesta de huevos	Pág. 15
3.3 Análisis estadístico	Pág. 15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	Pág. 16
4.1 Resultados del estudio de la esperanza de vida	Pág. 16
4.2 Resultados del estudio de la puesta de huevos	Pág. 20
5. CONCLUSIONES	Pág. 22
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 23

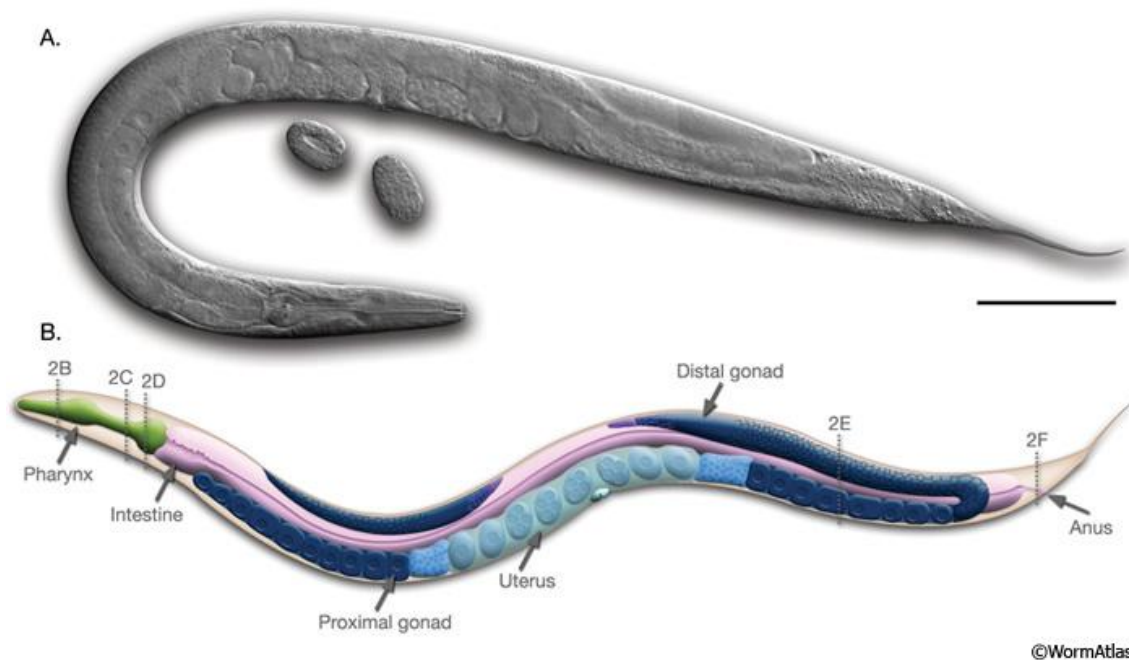
1. INTRODUCCIÓN

La experimentación *in vivo* es importante para poder evaluar el efecto de antimicrobianos en el intestino de animales infectados por microorganismos patógenos. Esta experimentación *in vivo* se puede llevar a cabo mediante el uso de cultivos celulares o a través del nematodo *Caenorhabditis elegans*, entre otros modelos. La ventaja que tiene el uso del *C. elegans* es la sencillez de manipulación en el laboratorio y que los resultados se pueden obtener en un corto periodo de tiempo debido a su rápido ciclo de vida.

1.1 El *Caenorhabditis elegans*

El nematodo *Caenorhabditis elegans* está ampliamente extendido, se puede encontrar en el medio ambiente y se aísla fácilmente de material vegetal en descomposición. Fue el primer organismo eucariota multicelular en tener su genoma secuenciado. Para poder mantenerlo en el laboratorio se utilizan placas de medio *Nematode Growth Media* (NGM) con un césped de *E. coli* ya que su alimentación se basa en bacterias, aunque no se conoce si tiene preferencia por alguna especie concreta (la elección de usar *E. coli* está basada en pruebas empíricas), y también se pueden usar levaduras de las cuales obtiene esteroides necesarios para su correcto desarrollo.

Es ectotermo por lo que su temperatura corporal depende del medio en el que se encuentren. Este modelo vivo tiene capacidad para detectar tanto estímulos físicos (por ejemplo, estímulos mecánicos o térmicos), cualidad que le permite encontrar compañeros, comida o evitar peligros; como estímulos químicos. Esto es posible porque posee al menos 70 neuronas sensitivas capaces de detectar químicos solubles y volátiles, gases, estrés mecánico, temperatura, luz y otro tipo de señales (Kurzchalia 2003; Corsi et al. 2015; Frézal y Félix 2015; Goodman y Sengupta 2019).



©WormAtlas

Figura 1: Anatomía de un adulto (hermafrodita). **A.** Imagen DIC (Microscopía de contraste diferencial) del *C. elegans*. **B.** Dibujo esquemático de estructuras anatómicas. Las letras con líneas representan secciones transversales que pueden verse en la *Figura 2* (Fuente: ©WormAtlas).

Este pequeño animal se ha convertido, en los últimos 50 años, en uno de los modelos animales más utilizados en una gran cantidad de estudios *in vivo* que se enmarcan en el ámbito de investigaciones biológicas y médicas (Frézal y Félix 2015), y de hecho "Durante el tiempo que se lleva trabajando con el nematodo se ha demostrado que es apto para hacer descubrimientos generales sobre las células y el desarrollo biológico" (Corsi et al. 2015).

Tiene un sistema reproductivo particular llamado androdioecia en el que existen dos tipos de individuos, hermafroditas (XX) y masculinos (X0). Esta situación da lugar a dos posibles formas de reproducción dentro de la especie, una autofertilización en el caso de individuos hermafroditas y la cría entre un macho y un hermafrodita; siendo más común la autofertilización. Ambos sexos poseen cinco cromosomas autosomales, diploides para todos, y el cromosoma sexual o cromosoma X. Cuando la cría tiene lugar por autofertilización los individuos hermafroditas producen una pequeña cantidad de esperma, suficiente para fertilizar unos 300 huevos y de éstos surgen tan solo entre un 0.1% y un 0.2% de machos (Frézal y Félix 2015; Corsi et a. 2015).

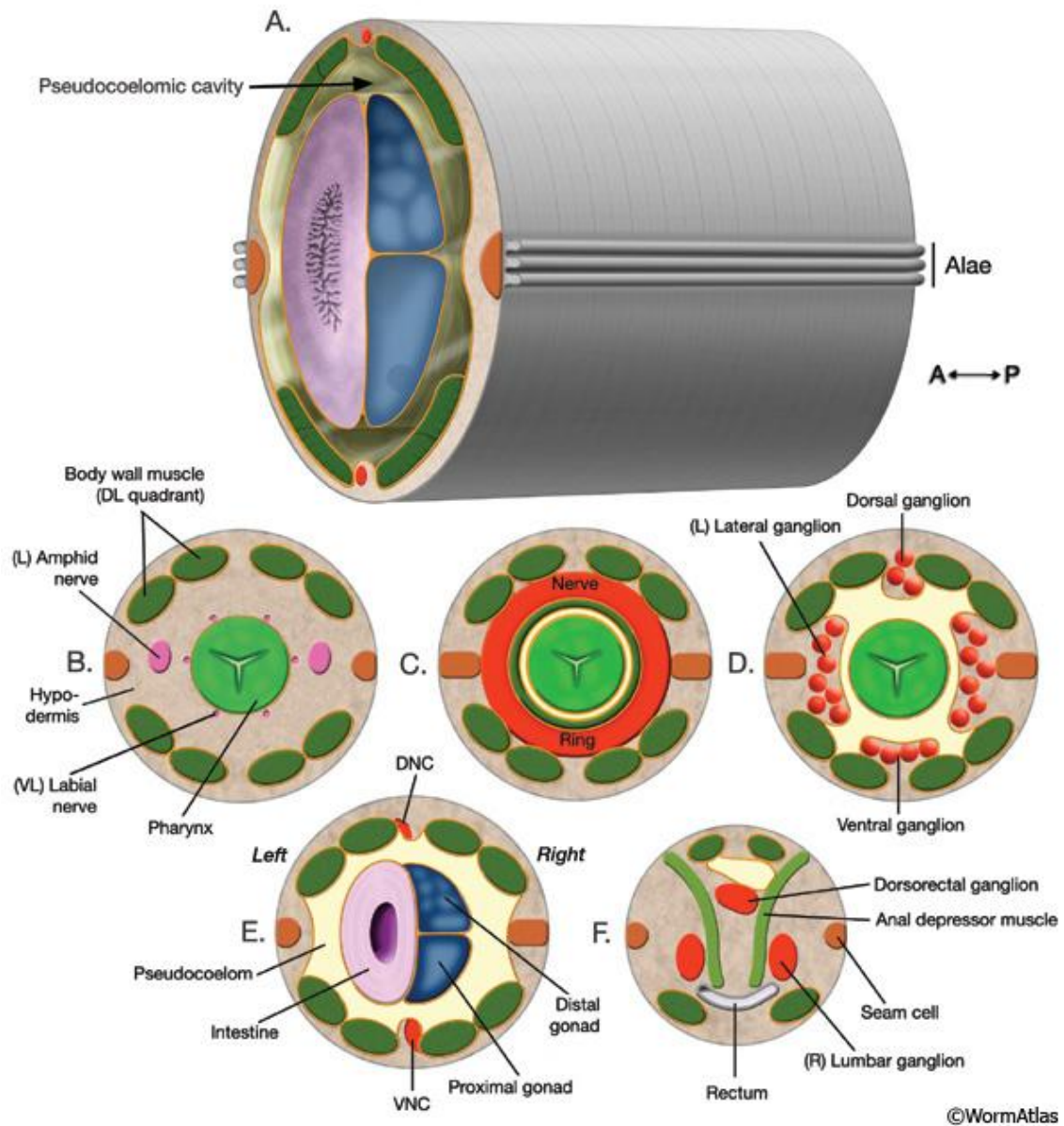
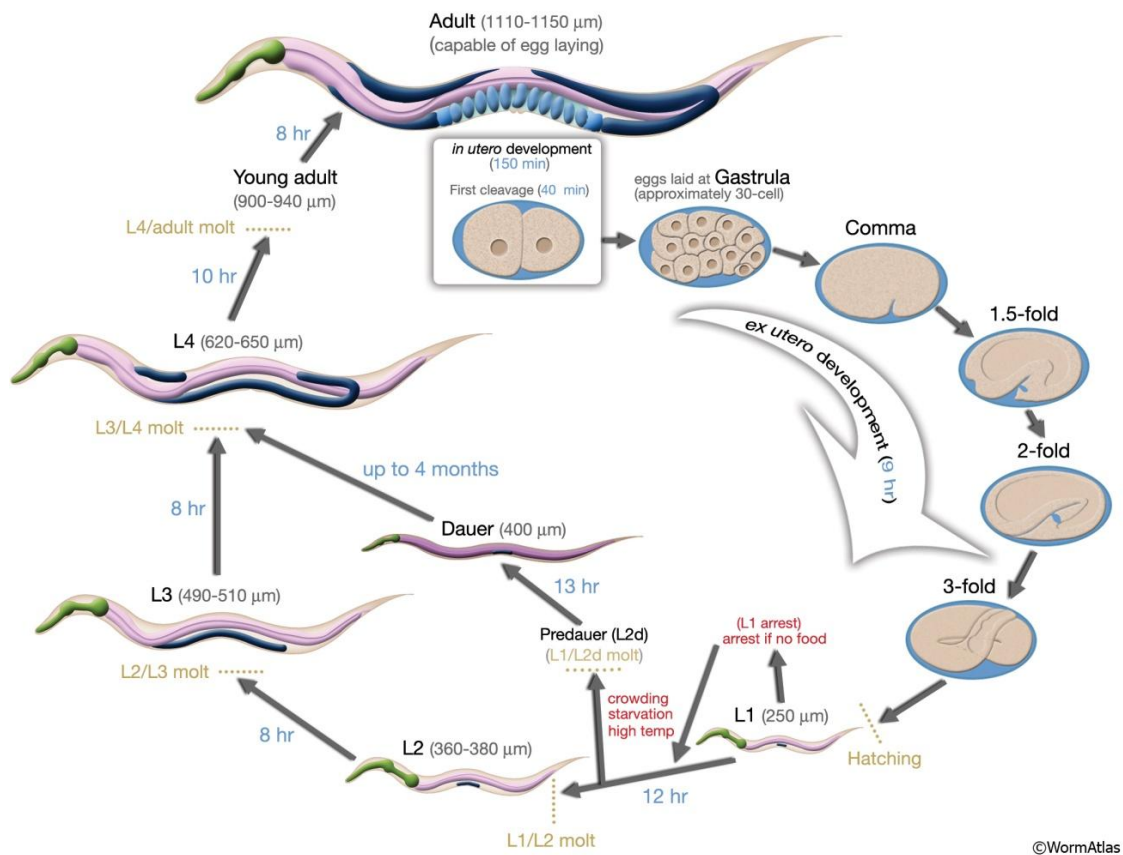


Figura 2: Esquema del plano transversal del cuerpo del nematodo, desde la cabeza a la cola. la sección A corresponde a la región exterior del cuerpo (tubo exterior) que está separada de la región interior (tubo interior) que contiene el sistema alimentario y las gónadas. Las secciones B,C,D, E y F son del tubo interior y se corresponden con las indicadas en la *Figura 1* (Fuente: ©WormAtlas).

Las larvas recién nacidas tienen una longitud de 0.25 mm mientras que los gusanos adultos tienen 1 mm, motivo por el cual es necesario el uso de lupa o microscopio para su observación y manipulación.



©WormAtlas

Figura 3: Ciclo de vida del *C. elegans*

Si en algún momento se acaba el alimento o hay sobrepoblación, las larvas en estadio L1 pueden entrar en una fase L2 alternativa llamada larva "Predauer" y de ésta a otra fase llamada larva "dauer", la cual posee una cutícula especial que rodea completamente a la larva impidiendo que se alimente ("dauer" proviene del alemán y significa perdurable). La cutícula que posee el nematodo en este estadio es muy resistente a agentes químicos y pueden sobrevivir de este modo meses hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser más favorables, momento en el cual continuarán su desarrollo hacia el estadio L4.

Como se ha indicado anteriormente, es un potente modelo de elección en estudios genéticos y estudios *in vivo*, además de poseer muchas ventajas inherentes como modelo de estudio en biología eucariótica. Entre estas ventajas se incluyen su pequeño tamaño y su bajo coste de mantenimiento lo cual conlleva un menor gasto económico, su rápido ciclo de vida tardando unos 3 días a 25°C en pasar de huevo a gusano adulto, ser principalmente hermafroditas autofecundantes con capacidad de poner un gran número de huevos, su fácil cultivo, poder mantenerse a corto plazo en el laboratorio alimentándolos con *E. coli* en placas de NGM y soportar la congelación a -80°C para almacenamiento a largo plazo. Su tejido es transparente lo cual permite

observar procesos internos, tienen un número invariable de células y además no son peligrosos para los humanos debido a que no pueden desarrollarse a la temperatura corporal de los mismos. Aunque otros nematodos como el *Ascaris suum* pueden producir reacciones alérgicas leves, no se han documentado éstos casos con el *C. elegans*.

Aun con todas las ventajas que tiene utilizar este nematodo como modelo de estudio, ningún modelo animal es perfecto para todos los estudios y el trabajo con *C. elegans* tiene algunas limitaciones ya que no posee todos los genes importantes en vertebrados, pero si la mayoría (Corsi et al. 2015; Frézal y Félix 2015).

1.2 La quitina y el quitosano

El quitosano es uno de los derivados de la quitina que se obtiene por desacetilación (DA) y al que se le atribuyen propiedades antimicrobianas y funcionales entre otras.

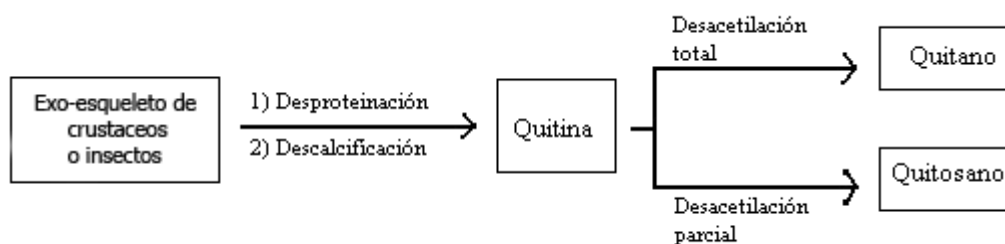


Figura 4: Diagrama de los derivados de la quitina obtenidos por desacetilación (Fuente: LV. Cristóbal 2003).

La quitina (Del griego *chiton* o coraza), ó 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucano, es un compuesto polisacárido formado por la unión de cadenas de N-acetil glucosaminas que forma microfibrillas. Se encuentra fácilmente formando parte del exoesqueleto de artrópodos tales como insectos, crustáceos o arácnidos; así como en la pared celular de los hongos. Este compuesto es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, por detrás de la celulosa con la que comparte una estructura similar, pero con grupos acetamida en la posición del segundo carbono en lugar de grupos hidroxilo (Honarkar y Barikani 2009; Arias 2018).

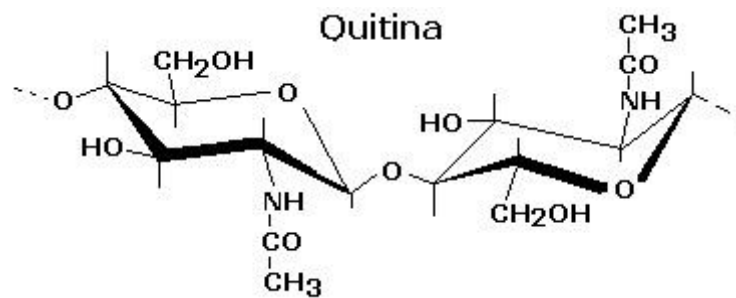


Figura 5: Estructura química de la unidad repetitiva de la quitina (Fuente: LV Cristóbal 2003).

El quitosano, ó 2-amino-2-desoxi- β -D-glucano, es un copolimero lineal formado por unidades de glucosamina y N-Acetil glucosamina mediante enlaces β -(1-4) que se obtiene por DA alcalina de la quitina y es el derivado más importante de la quitina.

Entre sus propiedades encontramos que es insoluble a pH neutro y alto, debido a su estructura molecular y pK_a (6.2 - 7.0) los cuales implican que el quitosano puede ser protonado a pH bajo en disolución acuosa pudiendo usar para este fin soluciones diluidas de ácido acético (1% - 3% v/v) o ácido cítrico (3% -4% v/v) entre otras cosas (Wu et al. 2014).

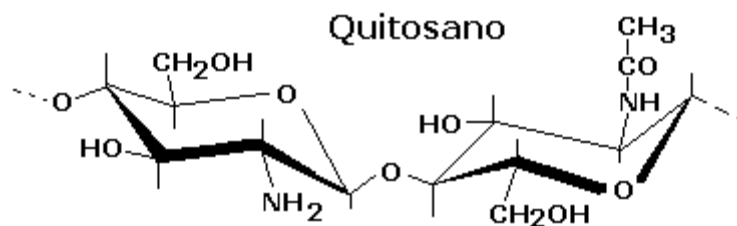


Figura 6: Estructura química de la unidad repetitiva del quitosano (Fuente: LV Cristóbal 2003).

Cuando el grado de DA alcanza el 50%, el compuesto se vuelve soluble en condiciones de pH ácido en disolución acuosa y el quitosano obtenido mediante este proceso puede llegar a un grado de DA de 0.95 (Honarkar y Barikani 2009). Los policatiónes obtenidos por disolución acuosa a pH ligeramente bajo, permiten interacciones electroestáticas fuertes con pequeñas moléculas cargadas negativamente y polianiones; formando diversos tipos de complejos (Ding et al. 2019).

La presencia de grupos amino (NH_2) explica el mayor potencial del quitosano frente a la quitina en su uso para diferentes aplicaciones (Honarkar y Barikani 2009). Es utilizado en una amplia cantidad de campos debido a todas sus propiedades como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antimicrobiana, filmogénica y emulsionante entre otras (Arias 2018).

Es un excipiente con baja o nula toxicidad aprobado para uso farmacéutico ya que prolonga el tiempo de liberación de los medicamentos en el intestino, también está aprobado por la *US Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en apósitos y se permite su uso como aditivo alimentario en Japón, Italia y Finlandia. Además, aunque algunos estudios en ratones presentan una dosis letal media $LD_{50} > 16$ g/Kg de peso corporal, esta cantidad parece ser biodegradable en otros trabajos (Wu et al. 2014). Se puede utilizar en biomedicina y sus derivados solubles también están aprobados por la *European Pharmacopoeia* (4ª edición, 2002). Es bioadherible debido a su carácter policatiónico pudiendo adherirse a epitelio o mucosas y han sido muy estudiados como transportadores de fármacos.

Se considera biodegradable en el metabolismo animal ya que puede ser hidrolizado por muchos enzimas, incluyendo enzimas humanos y también puede ser degradado por bacterias de la microbiota específica del intestino. Se ha comprobado que esta biodegradabilidad depende del grado de DA y del peso molecular del quitosano.

La quitina se puede utilizar para fabricar recubrimientos comestibles que mejoran la calidad y aumentan la vida útil de los alimentos pues es flexible, resistente, impide el paso de oxígeno y dióxido de carbono. Otro campo de aplicación dentro de la alimentación sería como fibra alimentaria en la composición de alimentos funcionales debido a que favorece el desarrollo de la microbiota intestinal y también reduce la absorción de compuestos lipídicos (colesterol y grasa) por formar emulsiones con los mismos (Wu et al. 2014; Arias 2018).

Respecto al quitosano, se pueden crear hidrogeles (redes tridimensionales que se hinchan en agua ó soluciones acuosas) que despiertan interés como moléculas bioactivas y en ingeniería de tejidos (Honarkar Y Barikani 2009).

Recubrimientos comestibles de quitosano preparados con ácido acético pueden funcionar bien como alternativa para la inactivación de varias cepas de *L. monocytogenes* en rábano negro rallado. También películas de gelatina con quitosano, con o sin aceites esenciales, son aptas para la presentación de este vegetal (Jovanovic et al. 2016).

Otro campo en el que tiene aplicación es el de la agricultura. La quitina promueve el crecimiento y desarrollo vegetal cuando se aplica a cultivos, entre otros motivos por el aporte de nitrógeno al ir degradándose. También aumenta la actividad fotosintética, acelera la floración y mejora la germinación.

Resulta interesante su aplicación en el tratamiento de aguas pues el quitosano presenta una gran capacidad coagulante y esta propiedad tiene utilidad en la eliminación de sólidos suspendidos, primer paso en el tratamiento de aguas residuales, dando como resultado la recuperación de un 90% del total de sólidos solubles. También se está empleando en la fabricación de filtros por su actividad antimicrobiana. Gracias a los grupos amino libres puede formar enlaces covalentes con contaminantes químicos e iones metálicos (Plomo, Cobre, Cadmio, Mercurio...) (Lárez 2003; Arias 2018).

Tanto la quitina como el quitosano se han investigado como antimicrobianos contra muchos organismos (algas, bacterias, hongos y levaduras). Los primeros datos que describen la actividad antimicrobiana de la quitina y el quitosano aparecen en la década de 1980-1990 (Goy et al. 2009).

El carácter policationico es el que le da al quitosano una actividad antimicrobiana muy potente frente a bacterias, mohos y levaduras. Ello es debido a que interactúa con las membranas celulares impidiendo su correcto funcionamiento, es capaz de inhibir la actividad de algunas enzimas y podría impedir la síntesis de proteínas si llegara a unirse al material genético del microorganismo.

La acción antimicrobiana depende de factores ambientales como el pH o la temperatura entre otros, no sólo porque únicamente se disuelve a pH ácido si no porque la molécula se convierte en un polication cuando el pH se encuentra por debajo del pKa de la molécula. Concretamente, sus capacidades antibacteriana y antifúngica son mayores cuanto menor sea el pH y mayor sea la temperatura. En cuanto al grado de DA y peso molecular, el efecto bactericida es mayor cuanto mayor sean ambos teniendo una mayor influencia el peso molecular que el grado de DA (Honarkar y Barikani 2009; Kong et al. 2010; Arias 2018).

El modo de actuación del quitosano como antimicrobiano se explica porque provoca cambios en la permeabilidad celular, a causa de la interacción entre los grupos amino del quitosano y la carga electronegativa en la superficie celular, lo cual permite que se liberen proteínas y electrolitos intracelulares. Estos cambios en la permeabilidad

celular vienen dados, principalmente, por tres métodos de interacción entre el polímero y lípidos cargados negativamente de la membrana celular. Por una parte, puede haber uniones de superficie simples debido a atracción entre cargas opuestas y por otra parte está la interacción de cargas sumada a la penetración del polímero en la bicapa lipídica que causa expansión. El tercer método consiste en la ruptura de la membrana celular a causa de la unión del quitosano con los lípidos que la forman con la posible formación de micelas. Adicionalmente, posee una gran capacidad quelante para varios iones metálicos (Níquel, Zinc, Cobre, Hierro, Magnesio y Cobre entre otros), los cuales ayudan a estabilizar la membrana celular de microorganismos cosa que puede estar implicada en su mecanismo de acción (Kong et al. 2010; Jovanovic et al. 2016).

Entre las bacterias sobre las que se ha investigado el efecto antimicrobiano podemos encontrar algunas como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* o *Staphylococcus aureus* (Arias 2018).

Aplicado sólo o combinado con aceite esencial de orégano puede extender la vida útil de filetes de pollo envasados en atmósfera protectora de 6 días a 14 días, enriquecido con aceites esenciales puede prevenir la aparición de mohos grises en fresas. La aplicación de recubrimientos con quitosano puede reducir el número de patógenos en salami entre 1 y 3 unidades logarítmicas. Las pruebas sensoriales revelaron que la aceptación de vegetales frescos rallados depende del aceite esencial utilizado para crear la película siendo, por ejemplo, las muestras preparadas con aceite esencial de tomillo inaceptables para el consumidor pasados tres días, aunque es el que mayor efecto antimicrobiano poseía frente a bacterias. Como alternativa, el aceite esencial de menta junto con el quitosano tiene un buen poder antimicrobiano y teniendo un impacto aceptable en el sabor y aroma (Jovanovic et al. 2016).

Por otra parte, se encontró que la fuerza iónica en el medio puede modificar el efecto antimicrobiano y, con la adición de 0.05 mol/L de magnesio, provocar que el porcentaje de inhibición descienda mucho (Kong et al. 2010).

El quitosano tiene ciertas ventajas frente a los desinfectantes utilizados normalmente debido a su gran espectro de actividad. Actúa más rápido sobre hongos que sobre bacterias y su efecto contra organismos tifoideos es comparable a los antibióticos usados en la práctica clínica (Goy et al. 2009).

Se pueden observar algunas diferencias en la acción antimicrobiana en bacterias Gram positivas y Gram negativas posiblemente debidas a las diferencias entre la parte exterior de las mismas.

La membrana exterior de las bacterias Gram negativas les confiere una superficie hidrófila. El núcleo de los lipopolisacáridos (LPS) está formado por moléculas con grupos aniónicos (fosfato y carboxilo) que contribuyen a la estabilidad de la membrana mediante interacciones electrostáticas con cationes divalentes. Remover éstos cationes por quelación resulta en una desestabilización de la membrana del microorganismo.

La pared celular de las bacterias Gram positivas contiene peptidoglicano (PG) y ácido teicoico (AT). El AT es un polímero policatiónico que atraviesa la pared para comunicarse con una capa de PG o se ancla en la membrana citoplasmática, los grupos aniones son responsables de que el AT estabilice la pared celular y también es crucial para la correcta función de algunos enzimas de membrana. La función del AT en las bacterias Gram positivas sería comparable a los de los LPS en las Gram negativas (Kong et al. 2010).

Sin embargo no se conoce con precisión el efecto que puede tener el quitosano sobre animales vivos. Es importante disponer de esta información antes de abarcar estudios en los que se pretende evaluar el efecto antimicrobiano en organismos infectados.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación es el de estudiar los efectos del quitosano sobre una población del nematodo *Caenorhabditis elegans*, registrando tanto los datos de esperanza de vida como los datos de puesta de huevos del mismo, como paso previo al estudio del efecto de dicho antimicrobiano sobre microorganismos patógenos en el nematodo infectado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de medios y cultivos

3.1.1 Preparación del cultivo de *Escherichia coli* OP50

Para el adecuado mantenimiento del *C. elegans* durante la realización del estudio, se procedió a inocular 500 mL de medio LB (Luria Bernati) (Scharlab Chemie, Barcelona, España) con un vial de *E. coli* OP50 con 5 mL del mismo medio de cultivo. El medio inoculado se incubó en un baño de agitación (Ultronic Orbital C 6001173, J. P. SELECTA S.A.) a 37°C durante 14 horas tras lo que se dividieron los 500 mL en tubos Falcon estériles de 50 mL. Estos tubos fueron centrifugados a 4.000 rpm y 4°C durante 5 minutos (Centrifuga Beckman Avanti J - 25) y los pellets obtenidos se conservaron a -80°C después de eliminar sobrenadantes. Para reactivar cada Falcon, el pellet se resuspendió en 5 mL de medio LB con el fin de obtener una concentración aproximada de 10⁸ UFC. Posteriormente, las placas de alimentación del nematodo se sembrarán con esta resuspensión de *E. coli* OP50.

3.1.2 Cultivo y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Para el desarrollo del nematodo se utilizó el medio *Nematode Growth Media* (NGM) que fue preparado con 975 mL de agua destilada, 17 g de agar bacteriológico (Scharlab Chemie, Barcelona, España), 3 g de cloruro sódico (Scharlab Chemie, Barcelona, Belgium) y 2.5 g de peptona (Peptona bacteriológica, Conda, España). Al medio autoclavado y atemperado se le añadieron 1 mL de cloruro de calcio (1M), 1 mL de sulfato de magnesio (1M) (Magnesium Sulfate, 99% extra puro, Acrós Organics, Belgium), 1 mL de colesterol de colesterol al 0.5% (Colesterol 95% estabilizado, Acrós Organics, Belgium) preparado en etanol al 96% a partir de etanol absoluto (Etanol absoluto, Scharlab, Barcelona, España). Previamente, la disolución de colesterol al 0.5% se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 0.45 µm y 1 mL fue vertido lentamente para evitar su precipitación.

Adicionalmente, se añadieron 25 mL de una solución tampón (1M) elaborada con 60 mL de solución de KH₂PO₄ (Di-hidrogeno fosfato potásico, MerckkgA, Alemania) ajustada a pH 6 con la cantidad suficiente de K₂HPO₄ (Fosfato potásico di-básico, Panreact, España).

Una vez preparado el medio, se homogeneizó y se vertió en placas Petri de 5 cm un volumen de 4 mL con el fin de obtener una capa de agar lo más fina posible para facilitar el trabajo posterior con el nematodo. Además, también se vertió medio en placas de 9 cm que sirvieron para el mantenimiento del nematodo. Todas las placas se sembraron en superficie para poder obtener un césped de *E. coli* OP50, se incubaron a 37°C (Estufa Memmert, Schwabach, Alemania) toda la noche y se almacenaron a 4°C.

Para que el volumen de resuspensión utilizada en la obtención del césped de *E. coli* OP50 contuviera la misma concentración, se utilizó la medida de la absorbancia (Espectrofotómetro Lan Optics, Labolan) y una fórmula empírica obtenida de investigaciones anteriores de modo que se pudo ajustar el volumen necesario para inocular cada placa de 5 cm con la misma concentración bacteriana.

Para calcular el volumen necesario a utilizar en las placas de 9 cm se realizó el ajuste teniendo en cuenta la diferencia de diámetros.

$$0,3 \text{ (nm)} * 30 \text{ (}\mu\text{L)} = \text{absorbancia} * V(\mu\text{L})$$

Los nematodos fueron transferidos cada 48 horas a placas nuevas de NGM con *E. coli* OP50 de modo que se mantuvieran las condiciones óptimas para el estudio y se incubaron a 20°C consiguiendo así mantener a la población de *C. elegans* sana.

3.1.4 Preparación del medio con quitosano de insecto

Se preparó una disolución al 1% de ácido acético a partir de ácido acético glacial al 96% (v/v) (ácido acético 96% v/v Scharlau Chemie, Barcelona, España). Durante dos días se mantuvo en agitación una mezcla de 1% quitosano de insecto procedente de *Tenebrio molitor* (MealFood Europe S.L., Doñinos de Salamanca, Salamanca) (QUITOSANO/CHITOSAN (C 4 H 11 O 4 N) n (pureza 85-95%) en 100 ml de una disolución 1% de ácido acético. Una vez disuelto el compuesto, se filtró mediante filtros de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore Millex-HV, Hydrophilic, PVDF 0.45 μm) y se calculó el volumen necesario para conseguir una concentración de 0.15% (p/v) de quitosano de insecto en 1% de ácido acético glacial a añadir en cada placa de NGM con césped de *E. coli* OP50 destinada al tratamiento, suponiendo una absorción en placa de 1 mm de espesor y diámetro de placa de 5 cm. Dichas placas se conservaron a 4°C después de dejar secar completamente la capa extendida de quitosano en ácido acético sobre ellas, dentro de la cabina de flujo laminar.

3.1.3 Preparación del medio de control ácido

Debido a que el quitosano se disuelve en ácido, es necesario realizar un control ácido de modo que se pueda comprobar si los efectos observados en la esperanza de vida y puesta de huevos del *C. elegans* son debidos a la acción del quitosano o son sólo debidas a la acción del ácido acético, en el caso de que tenga algún efecto.

Como en la preparación de medio con quitosano de insecto se preparó una disolución al 1% de ácido acético a partir de ácido acético glacial al 96% (v/v) (ácido acético 96% v/v, Scharlau Chemie, Barcelona, España), se añadió a cada placa (5 cm de diámetro) el mismo volumen de disolución al 1% de ácido acético que se añadió a las placas del tratamiento con quitosano (suponiendo una absorción en placa de 1 mm de espesor). Después del secado de la capa extendida de ácido sobre las placas de NGM con césped de *E. coli* OP50, las placas se conservaron a 4°C.

3.2 **Procedimiento de trabajo**

3.2.1 Manipulación de *Caenorhabditis elegans*

La manipulación del *C. elegans* se llevó a cabo en ambiente estéril, cerca de un mechero Bunsen, utilizando un hilo de siembra flameado y con la ayuda de un microscopio estereoscópico binocular (XTX - 3C, Comecta S.A, Abrera, Barcelona).

3.2.2 Sincronización de *Caenorhabditis elegans*

En la realización del estudio era necesario disponer de poblaciones de adultos jóvenes y, con este fin se parte de placas de gusanos alimentados en medio NGM con césped de *E. coli* OP50. Cada semana se cultivaron 20 gusanos *C. elegans* adultos jóvenes en placas de NGM con *E. coli* OP50, de 9 cm de diámetro y se incubaron toda la noche a 20°C con el fin de que en este tiempo se produjera una puesta de huevos. Al día siguiente se retiraron los 20 gusanos dejando así en las placas los huevos y larvas tras lo que se volvió a incubar a 20°C durante 28 horas. Pasado este tiempo se dispone de gusanos adultos jóvenes para iniciar los estudios.

3.2.3 Descripción de los grupos de estudio

Para la realización de este experimental se trabajó con tres grupos de estudios distintos los cuales consistían en:

Abreviatura del grupo de estudio	Descripción del grupo de estudio
EC	Nematodos alimentados con <i>E. coli</i> OP50 en placas de NGM
AC	Nematodos alimentados con <i>E. coli</i> OP50 en placas de NGM con ácido acético al 1%
ICH	Nematodos alimentados con <i>E. coli</i> OP50 en placas de NGM con quitosano al 0.15% disuelto en ácido acético al 1%

Tabla 1. Grupos de estudio evaluados.

3.2.4 Estudio de la esperanza de vida

En esta parte de la investigación se estudiaron un total de 750 gusanos, colocando 10 gusanos en cada placa de NGM (5 cm de diámetro) con *E. coli* OP50 (grupo control), *E. coli* OP50 con ácido acético al 1% ó *E. coli* OP50 con 0.15% de quitosano de insecto en ácido acético al 1% y se incubaron en estufa a 20°C. Cada 48 horas se comprobó y anotó cuantos gusanos murieron, cuantos contaban como censurados y aquéllos que seguían vivos se pasaron a placas nuevas del tratamiento correspondiente con el fin de renovar el alimento, así como de evitar la sobrepoblación en el medio. Este proceso se prolongó hasta que todos los gusanos colocados inicialmente en cada placa murieron.

3.2.5 Estudio de la puesta de huevos

En esta parte del experimental se cultivó un gusano por placa de tratamiento y se incubaron a 20°C durante 48 horas. Pasado éste tiempo, los gusanos se traspasaron a placas nuevas de su tratamiento correspondiente con el fin de renovar el alimento y que los nuevos gusanos nacidos en este tiempo no llegasen a poner nuevos huevos. Simultáneamente al traspaso, se realizó el conteo tanto de huevos como de larvas todas procedentes del gusano inicial que fue colocado en la placa de cultivo. En el caso de los gusanos muertos, se realizó también el recuento de huevos y larvas tras lo que se finalizó su seguimiento. Se estudiaron un total de 250 gusanos.

3.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a lo largo del tiempo fueron analizados estadísticamente utilizando el programa *Statgraphics Centurion XV*.

Para el estudio de la esperanza de vida se utilizó el método *Kaplan - Meier* sobre el total de nematodos con el cual se obtuvo la probabilidad de supervivencia y la función de riesgo acumulado para cada tratamiento, así como los percentiles 75, 50, 25 y 5 de supervivencia de cada tratamiento. Para la puesta de huevos se hizo un estudio del análisis de la varianza (ANOVA) de modo que se pudieran detectar diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tres tratamientos empleados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Esperanza de vida

La figura 7 muestra las curvas de supervivencia para el *C. elegans* alimentado en distintos medios. Como se puede apreciar, la tasa de muerte por unidad de tiempo en los nematodos alimentados en un medio que contenía quitosano es mayor que en el control sin quitosano y en el control que contenía ácido acético al 1%.

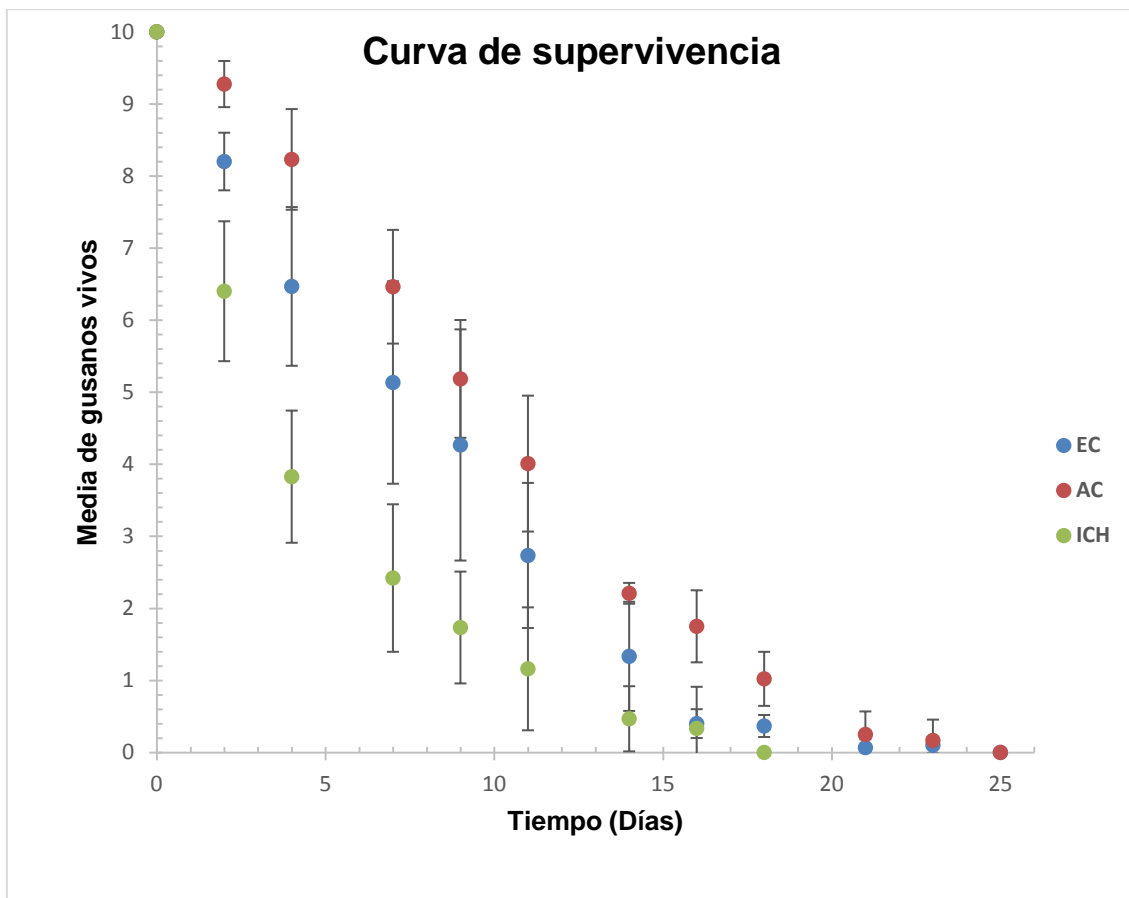


Figura 7: Curva de supervivencia del *C. elegans* para cada uno de los tratamientos.

La función estimada de supervivencia (figura 8) analiza la fracción de supervivientes de las poblaciones estudiadas a lo largo del tiempo.

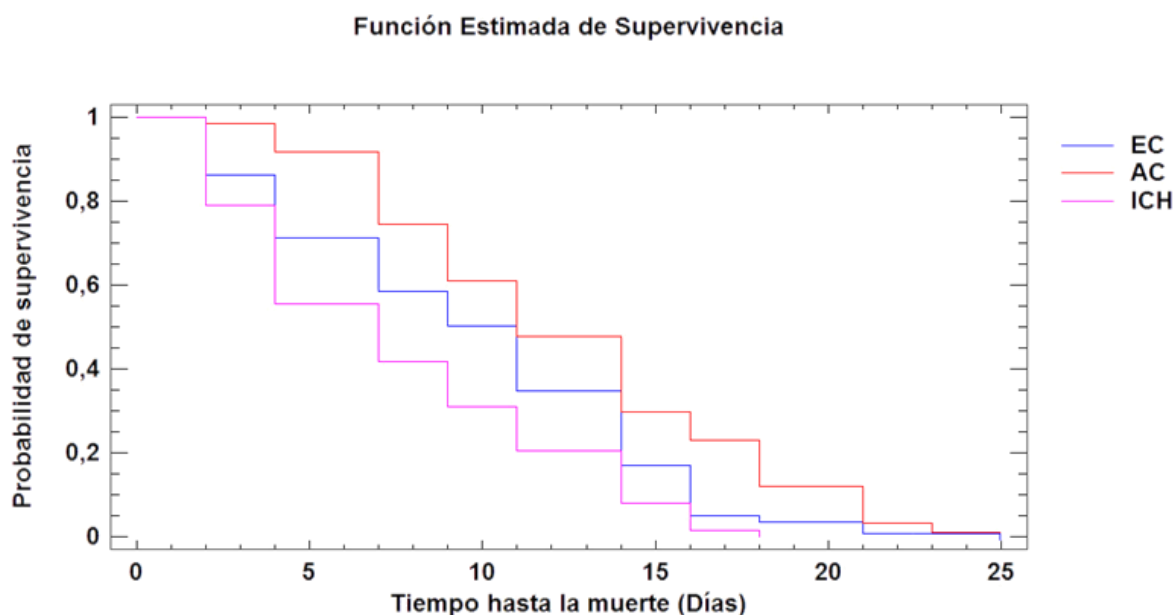


Figura 8: Función estimada de supervivencia del *C. elegans* para cada uno de los tratamientos.

En la figura 8 se puede observar que los distintos tratamientos presentan probabilidades de supervivencia diferentes para los distintos intervalos de días. Los valores de probabilidad de supervivencia coinciden con los días de muerte presentados en la figura 8 (probabilidad=0 para ICH en el día 18, probabilidad=0 para EC en el día 25 y probabilidad=0 para AC en el día 25).

De la figura 9 se puede deducir que el riesgo acumulado de muerte también es ligeramente distinto entre tratamientos, produciéndose un gran aumento en la tasa de mortalidad hacia el final de la vida del nematodo (situación normal al estudiar una población viva), pero sucediendo este aumento en distinto día para cada tratamiento. El máximo riesgo ocurre el día 16 para el tratamiento ICH y el día 23 para los tratamientos de EC y AC por lo que parece existir un mayor riesgo de muerte en presencia de quitosano.

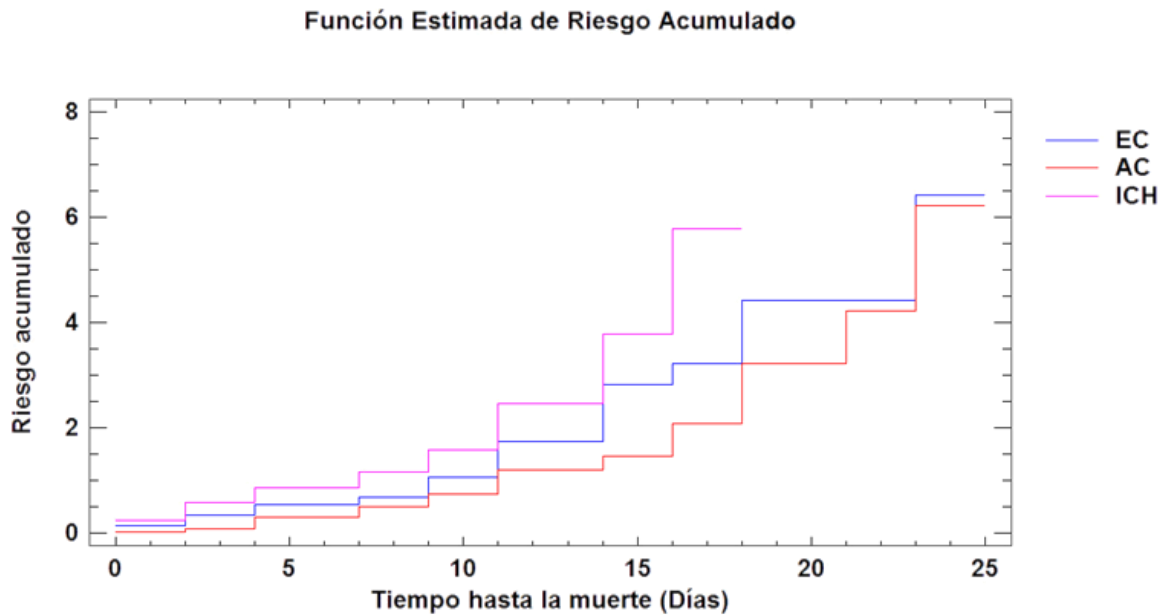


Figura 9. Función estimada de riesgo acumulado del *C. elegans* para cada uno de los tratamientos.

Una vez llevado a cabo el análisis de Kaplan Meyer, se obtuvieron los percentiles de supervivencia de *C. elegans* (Tabla 2) para cada uno de los ensayos de alimentación del nematodo. Estos percentiles se calculan teniendo en cuenta los nematodos que sobreviven en cada tratamiento de modo que, por ejemplo, el percentil 75 indica el número de días que habrán sobrevivido el 75% de los nematodos estudiados, o dicho de otro modo habrán muerto el 25% de los mismos.

Para cualquier percentil, se observa que el número de días que sobreviven un determinado porcentaje de gusanos, es siempre menor para aquellos expuestos a quitosano. Por ejemplo, en el caso del percentil 50, la tabla 2 muestra que en el tratamiento control (tratamiento EC) la mitad de los nematodos consiguieron sobrevivir 8.92 ± 3.54 días; en el tratamiento control con ácido (tratamiento AC) 11.02 ± 1.97 días, mientras que en el tratamiento con quitosano la cifra fue de 6.71 ± 3.30 días.

Tabla 2. Valores de medias de los percentiles de supervivencia, para cada tratamiento, con sus desviaciones estándar.

Tratamiento EC				
Percentil	75	50	25	5
Media de días	5.32	8.92	12.12	16.71
SD	3.94	3.85	2.73	1.57
Tratamiento AC				
Percentil	75	50	25	5
Media de días	8.12	11.02	15.36	20.16
SD	2.30	1.97	1.83	1.81
Tratamiento ICH				
Percentil	75	50	25	5
Media de días	3.84	6.71	9.49	13.95
SD	2.30	3.30	3.97	2.85

Esto implica que, por algún motivo, el quitosano tiene un efecto negativo en la supervivencia del nematodo a lo largo de su vida, de tal manera que la esperanza de vida disminuye respecto al tratamiento EC y al tratamiento AC, hecho que se refleja también en la figura 8 como se indicó anteriormente.

4.2 Puesta de huevos

En el análisis de la puesta de huevos se observó que el segundo y cuarto día de tratamiento fueron los días con mayor actividad en la puesta de huevos, siendo el segundo día en el que mayor tasa de puesta de huevos se observa para el total de la población (250 nematodos). Para el tratamiento control EC, el promedio por gusano es de 148.61 ± 54.34 huevos. Para el tratamiento AC es de 116.52 ± 35.03 , mientras que para el tratamiento ICH es de 16.86 ± 6.62 . A partir del cuarto día de estudio del *C. elegans*, la cantidad huevos puesta disminuye significativamente respecto al día 2 en todos los grupos de estudio.

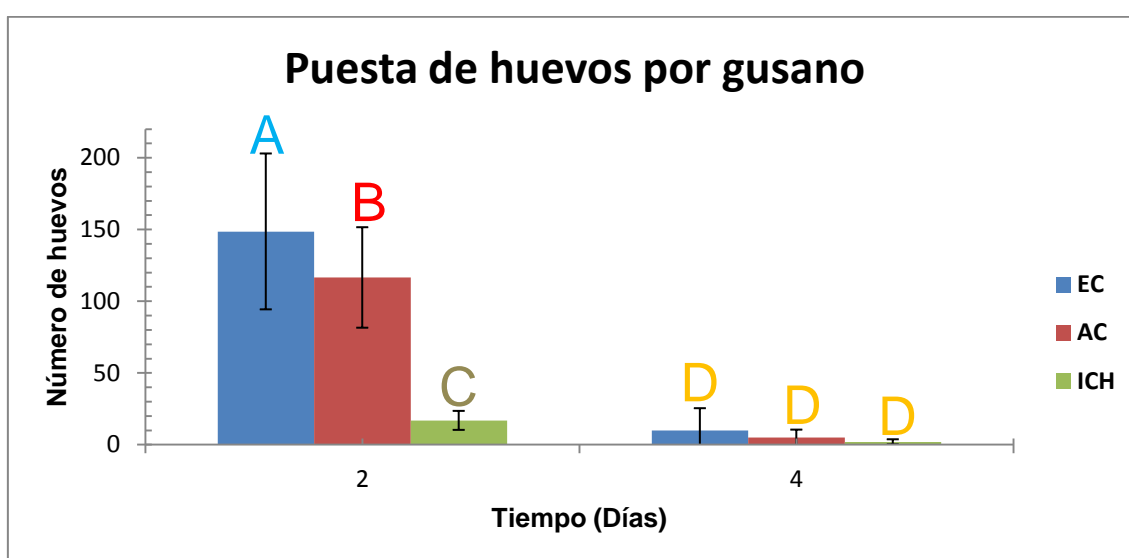


Figura 10: Puesta de huevos por gusano en días 2 y 4 de estudio, por grupo de tratamiento.

Los resultados obtenidos en el análisis ANOVA ponen de manifiesto el hecho de que hay una diferencia estadísticamente significativa entre grupos, con un 95.0% de confianza, en la media de huevos por gusano al segundo día de estudio ya que el P-valor es menor a 0.05 en este tiempo (figura 10). El análisis de rangos múltiples resultante indica que hay diferencias significativas entre todos los grupos estudiados. No obstante, el cuarto día se observa la misma pauta en cuanto a la puesta de huevos, aunque no existen diferencias significativas entre los grupos estudiados. Esto implica que tanto el ácido acético al 1% como el quitosano de insecto al 0.15%(p/v) (1500 mg/L) disuelto en ácido acético al 1% tienen un efecto de reducción del promedio de huevos puestos por nematodo respecto al grupo control.

No hay trabajos publicados en los que se haya estudiado el efecto del quitosano de insecto sobre la esperanza de vida y la pauta de puesta de huevos de *C. elegans*.

No obstante hay estudios *in vitro* usando cultivos celulares donde se vio que el quitosano puede disminuir la viabilidad celular entre un 5% y un 10% con una dosis de 100 µg/mL (Zubareva et al. 2017). Según diversos autores, el quitosano puede penetrar en las células, afectando a la membrana celular, lo que explicaría esta disminución de la viabilidad. La mayoría de modelos estudiados presentaron una concentración inhibitoria media (IC₅₀) aproximada entre 0.2 - 2.0 mg/mL (Matica et al. 2017).

Del mismo modo, se encuentran en la bibliografía estudios *in vivo* que indican que, en función de la concentración de quitosano estudiada, el efecto sobre un organismo vivo puede ser diferente. Hu et al. (2011) expusieron los embriones de pez cebra durante 96 h a nanopartículas de quitosano de distintos tamaños, observándose a concentraciones de 20 mg/L un efecto significativo en la reducción del número de huevos eclosionados y a altas concentraciones (30 mg/L) efectos tóxicos que condujeron a la muerte de los embriones. También se encontraron signos de malformación en el grupo de supervivientes del tratamiento con una dosis de 5 mg/L. En nuestro caso, el *C. elegans* se expuso a una concentración del 1500 mg/L (ó 1.5 mg/mL) , por lo tanto, es plausible que dicha concentración afecte a la esperanza de vida del nematodo.

No obstante existe descrito algún estudio en humanos a los que se les suministró una dosis oral de hasta 6,75 g/día/Kg de quitosano y en el que no se encontraron signos clínicos relevantes (García-Fuentes et al. 2005).

En definitiva, dado el tamaño tan pequeño del nematodo, convendría estudiar dosis más pequeñas de quitosano.

5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, la adición de ácido acético a la concentración necesaria para que se produzca la solubilización del quitosano, no afecta a la esperanza de vida de *C. elegans*. En cuanto a la puesta de huevos, sí que se produce una ligera disminución del número total de huevos puestos al segundo día de estudio.

El quitosano reduce la esperanza de vida y la puesta de huevos en el nematodo de forma significativa.

Como conclusión general, a la vista de los resultados, sería conveniente hacer más estudios con distintas concentraciones de quitosano para poder establecer la más adecuada con objeto de llevar a cabo estudios posteriores tendentes a ver el posible efecto del quitosano en el tracto digestivo del nematodo infectado por un microorganismo patógeno.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, Jorge Poveda. «Quitina: Compuesto natural y práctico». *Investigación Joven* 5, n.º 1 (27 de agosto de 2018): 1-4.
- Corsi, Ann K., Bruce Wightman, y Martin Chalfie. «A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis Elegans». *Genetics* 200, n.º 2 (1 de junio de 2015): 387-407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>.
- Ding, Lan, Yan Huang, XiXi Cai, y Shaoyun Wang. «Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior». *Carbohydrate Polymers* 208 (15 de marzo de 2019): 133-41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.015>.
- Frézal, Lise, y Marie-Anne Félix. «C. elegans outside the Petri dish». *eLife* 4 (30 de marzo de 2015): e05849. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>.
- García-Fuentes, M., C. Prego, D. Torres, y M. J. Alonso. «A Comparative Study of the Potential of Solid Triglyceride Nanostructures Coated with Chitosan or Poly(Ethylene Glycol) as Carriers for Oral Calcitonin Delivery». *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 25, n.º 1 (mayo de 2005): 133-43. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.02.008>.
- Goodman, Miriam B., y Piali Sengupta. «How Caenorhabditis Elegans Senses Mechanical Stress, Temperature, and Other Physical Stimuli». *Genetics* 212, n.º 1 (1 de mayo de 2019): 25-51. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300241>.
- Goy, Rejane C., Douglas de Britto, y Odilio B. G. Assis. «A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan». *Polímeros* 19, n.º 3 (2009): 241-47. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>.
- Honarkar, Hengameh, y Mehdi Barikani. «Applications of Biopolymers I: Chitosan». *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly* 140, n.º 12 (19 de noviembre de 2009): 1403. <https://doi.org/10.1007/s00706-009-0197-4>.
- Hu, Yu-Lan, Wang Qi, Feng Han, Jian-Zhong Shao, y Jian-Qing Gao. «Toxicity Evaluation of Biodegradable Chitosan Nanoparticles Using a Zebrafish Embryo Model». *International Journal of Nanomedicine* 6 (2011): 3351-59. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25853>.

- Jovanovic, Gordana D., Anita S. Klaus, y Miomir P. Nikšić. «Antimicrobial Activity of Chitosan Coatings and Films against *Listeria Monocytogenes* on Black Radish». *Revista Argentina De Microbiologia* 48, n.º 2 (junio de 2016): 128-36. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.02.003>.
- Kong, Ming, Xi Guang Chen, Ke Xing, y Hyun Jin Park. «Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review». *International Journal of Food Microbiology* 144, n.º 1 (15 de noviembre de 2010): 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- Kurzchalia, Teymuras V., y Samuel Ward. «Why Do Worms Need Cholesterol?» *Nature Cell Biology* 5, n.º 8 (agosto de 2003): 684-88. <https://doi.org/10.1038/ncb0803-684>.
- Lárez Velásquez, Cristóbal. «ALGUNOS USOS DEL QUITOSANO EN SISTEMAS ACUOSOS». *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4 (1 de enero de 2003): 91.
- Matica, Adina, Menghiu, Gheorghita, Ostafe, Vasile. «TOXICITY OF CHITOSAN BASED PRODUCTS», *New Frontiers in Chemistry* nº 1 vol. 26 (2017) 65-74.
- «Wormatlas Homepage». Accedido 22 de julio de 2019. <https://www.wormatlas.org/>.
- Wu, Qing-Xi, Dong-Qiang Lin, y Shan-Jing Yao. «Design of Chitosan and Its Water Soluble Derivatives-Based Drug Carriers with Polyelectrolyte Complexes». *Marine Drugs* 12, n.º 12 (diciembre de 2014): 6236-53. <https://doi.org/10.3390/md12126236>.
- Zubareva, Anastasia, Balzhima Shagdarova, Valery Varlamov, Elena Kashirina, y Elena Svirshchevskaya. «Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives». *European Polymer Journal* 93 (1 de agosto de 2017): 743-49. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.021>.